

Aus der Abteilung für Klinische Chemie der Klinik und Poliklinik für
Innere Medizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. C. Wagener

**Detektion von Prostata Spezifisches Antigen (PSA-)
mRNA exprimierenden Zellen im peripheren Blut
mittels Reverse-Transcription Nested
Polymerasekettenreaktion (RT-nested-PCR)**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Parviz Ahmad-Nejad
aus
Teheran

Hamburg 2002

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 15. Juli 2002 Letzte mündl. Prüfung 08.08.2002

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Dekan: Prof. Dr. C. Wagener

Referent: Prof. Dr. M. Neumaier

Korreferent: Prof. Dr. C. Wagener

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Daten zum Prostatakarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie des Prostatakarzinoms	1
1.1.2	Histologie und Metastasierung	1
1.1.3	Klinische Routinediagnostik des Prostatakarzinoms	2
1.1.4	Erkennung von Mikrometastasen durch immunhistochemischen Nachweis gewebsspezifischer Antigene	3
1.2	Prostata-spezifisches Antigen (KLK-3)	3
1.2.1	PSA-Gen	4
1.2.2	PSA-Protein-Molekül	4
1.2.3	Das Prostata-spezifische Antigen als Tumormarker	5
1.2.4	PSA-Grenzwerte	6
1.2.5	Alternative PSA-Assays	7
1.2.5.1	PSA-Density (PSAD)	7
1.2.5.2	Bestimmung des Quotienten von freien und komplexgebundenen PSA (Q- PSA)	7
1.2.5.3	PSA im Zeitverlauf (PSA-velocity, PSAV)	8
1.2.5.4	RT-PCR auf gewebsspezifische mRNA	8
1.3	Verwandte, homologe Proteine und weitere Marker des PCa	10
1.3.1	Pankreatisches glanduläres Kallikrein (KLK-1)	10
1.3.2	Humanes glanduläres Kallikrein (KLK-2)	10
1.3.3	Prostata-spezifisches Membran-Antigen (PSM)	12
1.3.4	Prostata-spezifische saure Phosphatase (PAP)	13
2.	Zusammenfassende Problemstellung und Ziel der Arbeit	14
3.	Allgemeine Arbeitsmethoden	15
3.1	Puffer, Lösungen und Medien	15
3.2	Sterilisation und Silanisierung von Arbeitsmaterialien	16
3.3	Radioaktivitätsmessungen	16
3.4	Absorptionsmessungen	17

3.5	Computerunterstützte Datenerfassung	17
3.6	Zellkultur	17
3.6.1	Verwendete Zelllinien	17
3.6.2	Nährmedien und Puffer	18
3.6.3	Kultivierung von LNCAP und MDA 231	18
3.6.4	Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen	18
3.6.5	Zellzählungen	19
3.7	Ausgangsmaterial	19
3.7.1	Standardisierung und Qualitätskontrolle	
	Aufarbeitung des Ausgangsmaterials	19
3.7.2	Herstellung der Verdünnungsreihen und Sensitivkontrollen	20
3.7.3	Herstellung der Negativkontrollen	21
3.7.4	Aufarbeitung des Ausgangsmaterials der Patienten	21
3.8	Molekularbiologische Arbeiten	22
3.8.1	RNA-Extraktionsmethoden	22
3.8.1.1	RNA-Extraktion aus peripherem Blut	22
3.8.1.2	RNA-Extraktion aus Zellkultur	23
3.8.2	Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen	24
3.8.3	Zusätzliche Reinigung von Nukleinsäuren	25
3.8.3.1	Phenolextrationen	25
3.8.3.2	Alkoholische Fällungen	25
3.8.3.3	Präparation von DNA aus Agarose Gelen	25
3.8.4	Quantitative und qualitative Analyse der RNA	25
3.8.5	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	26
3.9	Assaydesign - Aufbau und Durchführung des PCR-assay zum Nachweis PSA- exprimierender Zellen	26
3.9.1	Auswahl und Herstellung der Oligonukleotidprimer	27
3.9.2	Amplifikation von Nukleinsäuren-Durchführung der RT-PCR	32
3.9.2.1	Reverse Transkription	32
3.9.2.2.	I. PCR (PSA1)	33
3.9.2.3	II-"Nested" PCR (PSA2)	34
3.9.2.4	Nachweis der PCR-Produkte	35
3.9.3	Qualitätskontrolle	36
3.9.3.1	Aspekte der Qualitätskontrolle in der PCR	36
3.9.3.2	Kontroll-PCR	38
3.10	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	40
3.10.1	Restiktionsverdau der PCR-Produkte	40

3.10.2	DNase-Verdau	40
3.10.3	Markierung von Gensonden	40
3.10.3.1	Markierung von Oligonukleotiden	40
3.10.3.2	Digoxigenierung von Oligonukleotiden	41
3.11	Southern Blot Analysen	42
3.11.1	Sequenzspezifische Hybridisierungen – Hybridisierung mit Oligonukleotiden	43
3.12	Sequenzierung des PCR-Produktes	44
3.13	Versuche am ES 300	44
3.14	Patientenproben	46
4.	Ergebnisse	49
4.1	Gewinnung der kernhaltigen Zellen aus der Zellkultur	49
4.2	RNA-Extraktion von nukleären Zellen aus peripheren Blutproben	49
4.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	52
4.3.1	Primerwahl	52
4.4	Reverse Transkription	55
4.5	PCR	56
4.6	Ergebnisse der Patientenproben und – daten	62
4.6.1	Nested RT-PCR für PSA mRNA bei Patienten mit Prostatakarzinom	62
4.6.2	Poisson Verteilung	66
4.7	ES-300 Ergebnisse	68
4.7.1	Oligonukleotidhybridisierung: Kombination von Bedingungen	68
4.7.2	Beeinträchtigung der immunenzymatischen Reaktion von der Salzkonzentration	70
4.7.3	Einfluß von Oligonukleotidlänge und Hybridisierungstemperatur am ES-300	71
4.7.4	Oligonukleotidhybridisierung (5'DIG-17mer): Sondenkonzentration und Signal	73
4.7.5	Streptavidinbindungskinetik von beidseitig 5'-markierten PCR-Fragmenten	74
4.7.6	Denaturierungsbedingungen für den Nachweis des genomischen PSA-Fragments (1,9 kb)	75
4.7.7	Vergleich der Detektionssysteme	76

5.	Diskussion	78
5.1	RT-PCR in der Tumordiagnostik - ein neues diagnostisches Fenster	78
5.2	Standardisierung der RT-nested-PCR	79
5.3	Bisherige RT-PCR zum Nachweis PSA-exprimierender Zellen	81
5.4	Die Expression-PSAmRNA ist nicht Prostata-spezifisch	84
6.	Zusammenfassung	87
	Literaturverzeichnis	88
	Danksagung	98
	Lebenslauf	99

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	-	Abbildung
ACT	-	Alpha-1-Antichymotrypsin
AFP	-	Alpha-Fetoprotein
AMG	-	Alpha-2-Makroglobulin
AS	-	Aminosäuren
bp	-	Basenpaare
BPH	-	benigne Prostatahyperplasie
BSA	-	Bovines Serum Albumin
c-DNA	-	komplementär DNA
CEA	-	Carcinoembryonales Antigen
CK	-	Zytokeratin
CML	-	Chronisch myelotische Leukämie
ddH ₂ O	-	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	-	Deoxynukleotide
DIG-Oligo	-	Digoxin markiertes Oligonukleotid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DRE	-	digitale rektale Untersuchung
EDTA	-	Ethylenediaminetetraaminsäure
ELISA	-	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	-	Fetales Kälber Serum
GITC	-	Guanidinium-Isothiocyanat
hK	-	humanes Kallikrein
kb	-	Kilobasen
KLK	-	humanes Kallikrein
LCR	-	Ligase-Chain Reaction
LNCAP	-	humane Prostatakarzinomzelllinie
Lnex	-	Lymphadenektomie
MCF 7	-	humane Mammakarzinomzelllinie
MDA 231	-	humane Mammakarzinomzelllinie
mRNA	-	messenger Ribonukleinsäure
NASBA	-	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification
OD	-	optische Dichte
Oligo	-	Oligonukleotid-Primer
PCa	-	Prostatakarzinom
PCR	-	Polymerasekettenreaktion

PSA	-	Prostata spezifisches Antigen
PSMA	-	Prostata spezifisches Membranantigen
RNA	-	Ribonukleinsäure
RT-PCR	-	reverse-Transkription Polymerasekettenreaktion
RPE	-	Radikale Prostatektomie
sPSA-assay	-	supersensitiver PSA-assay
Tab.	-	Tabelle
TURP	-	transurethrale Prostata Resektion
TRUS	-	transrektale Ultraschallsonographie
UTR	-	untranslated region

1. Einleitung

1.1 Daten zum Prostatakarzinom

1.1.1 Epidemiologie des Prostatakarzinoms

Das Prostatakarzinom (PCa) ist unter den urologischen Tumoren die häufigste Todesursache und zugleich ab dem 80. Lebensjahr die häufigste tumorbedingte Todesursache bei Männern überhaupt (Hölzel D, 1991). Das PCa zeigt bezüglich der Inzidenz in Abhängigkeit zur Abstammung starke Unterschiede. 1987 gab es 90 000 neue Fälle des PCa in den Vereinigten Staaten, wobei die Inzidenz unter der afroamerikanischen Bevölkerung deutlich höher lag, als unter der kaukasischen (95 Fälle auf 10^5 unter Afroamerikanern und 58 auf 10^5 Weiße). Die jährliche Neuerkrankungsrate steigt in Deutschland je 100.000 Männer mit dem Alter stark an von etwa 50 auf 10^5 bei 60-jährigen bis auf mehr als 400 auf 10^5 bei einem Lebensalter zwischen 75 und 85 Jahren. Beachtenswert sind auch Autopsiebefunde, nach denen mit zunehmendem Alter gut differenzierte Adenokarzinome gefunden werden, in 10% bei 50-jährigen und in 70% bei 80-jährigen (Sheldon et al. 1980). In einer Studie wurden sogar 34% latente Karzinome in der fünften Lebensdekade gefunden (Sakr et al, 1993).

Bei einer Wahrscheinlichkeit von 6% bis zum 80. Lebensjahr an einem Prostatakarzinom erkrankt zu sein, bedeutet dies, dass über 90% dieser latenten Karzinome klinisch nicht manifest werden. Diese Tatsachen lassen auf ein langes Intervall zwischen Initiierung und klinischer Manifestation dieses Karzinomtyps schließen.

Neben rassischen Unterschieden und dem Alter scheinen auch geographische Faktoren die Inzidenz des PCa zu beeinflussen. Während, wie erwähnt, unter der afroamerikanischen Bevölkerung eine hohe Inzidenz herrscht, findet sich unter der afrikanischen Bevölkerung eine geringe Inzidenz. Vergleichbar hierzu herrscht unter ostasiatischer Bevölkerung ebenfalls eine geringe Inzidenz, wogegen sie bei in die USA emigrierten Asiaten ansteigt (Muir et al, 1991 und Shimizu et al, 1991).

1.1.2 Histologie und Metastasierung

Histologisch handelt es sich in über 90% der Fälle um Adenokarzinome, welche sich überwiegend in den peripheren Abschnitten der Drüse entwickeln. Die mit Abstand häufigsten Metastasen dieses Karzinomtyps sind Knochenmetastasen mit 91,5% bei primärer Metastasierung (88,3% bei Metastasierung im Verlauf), gefolgt von juxta-regionären Lymphknoten mit 7,1% (9,9%), Lebermetastasen 2,9% (7,9%), Metastasen in Lunge oder Pleura 3,1% (9,3%) und ZNS-Metastasen mit 0,8% primär (1,5% im Verlauf) (Hölzel et al. 1991).

Klinische Symptome sind im Frühstadium häufig nicht zu erheben, im Spätstadium können Miktionsbeschwerden wie bei einer benignen Prostatahyperplasie (BPH) auftreten. Dabei können obstruierende Symptome von Harnstau bis zur Urämie vorkommen. Seltener führen auch Hämaturie oder metas-

tasenbedingte Symptome, wie vor allem Knochenschmerzen, zur Konsultation des Arztes und damit zur Diagnose des PCa.

1.1.3. Klinische Routinediagnostik des Prostatakarzinoms

Die obligate Diagnostik des PCa umfaßt u.a. die digitale rektale Untersuchung (DRE), die transrektale oder perineale Stanzbiopsie bzw. Feinnadelaspirationszytologie, die Restharnbestimmung, die transrektale Ultraschallsonographie (TRUS) oder Magnetresonanztomographie und den Röntgen-Thorax in zwei Ebenen.

Die fakultative Diagnostik umfaßt ein Knochenszintigramm (insb.bei PSA >10 ng/ml), Uroflowmessung, Infusionsurogramm, Computertomographie, freies PSA, Zystoskopie, Oberbauch-Sonographie und, sofern neurologische Symptome vorliegen, ein CCT.

Die Ungenauigkeit des klinischen Stagings, welches die Grundlage zur Festlegung der zu folgenden Therapie darstellt, ist für die adäquate Behandlung des Prostatakarzinoms problematisch.

Der klinische Routinebetrieb beinhaltet die histopathologische Beurteilung von Operationspräparaten mit Beurteilung der Resektionsränder sowie der intraoperativ resezierten regionalen Lymphknoten als sensitive Methodik. Technisch gesehen kann sie als eine Methode zur morphologischen Detektion einer potentiellen Mikrometastasierung angesehen werden. Beispielsweise ist klinisch relevant, dass bis zu 20% der Fälle, welche in Routineresektionen als Lymphknoten-negativ angesehen werden, bei Feinschnitten eine maligne Infiltration aufweisen (Gusterson, 1991).

Trotz jüngster Fortschritte in bildgebenden Verfahren, wie Computertomographie (CT), Magnet Resonanz Tomographie (MRT) und Transrektaler Ultraschall Sonographie (TRUS), werden ca. 50% aller lokalbegrenzten Erkrankungen zum Zeitpunkt des Stagings falsch negativ, d.h. zu niedrig eingestuft. Bei vielen Patienten zeigt sich ein mikroskopisch invasives Wachstum in die Samenbläschen oder eine Penetration des malignen Prozesses durch die Prostatakapsel ins periprostatische Fettgewebe (Catalona et al, 1990; Wahle et al 1990; Epstein et al 1993).

Innerhalb der präventiven Vorsorgeuntersuchungen erhöht die PSA-Bestimmung insbesondere in Kombination mit der digitalen rektalen Untersuchung (DRE) die Neuentdeckungsrate gegenüber der DRE allein auf das etwa 4-fache (Catalona WJ et al 1991). Andererseits liegt die Rate der falsch positiven Diagnose bei Verwendung dieser Kombination bei 40-70%, je nach Grenzwert für das PSA. Darüber hinaus werden auch einige "insignifikante" Karzinome entdeckt, die für das Leben des Patienten keine Bedrohung darstellen (Catalona et al 1991; Gerber et al, 1991; Hinman, 1991).

Es ist jedoch gesichert, dass durch PSA-Screening mehr frühe, organbegrenzte Karzinome entdeckt werden als bei einem "Palpations-Screening" (Brendler et al. 1993; Catalona et al, 1993; Oesterling et al, 1993; Scaletsky et al, 1993). Catalona fand bei 266 Männern mit suspektem Palpationsbefund 59 Karzinome, von denen 57% nicht mehr auf die Prostata begrenzt waren. Bei 10.251 asymptomatischen Männern wurden durch PSA-Screening 296 Karzinome gefunden, von denen nur 37% nicht auf die Prostata begrenzt waren. Bei 9.333 Männern wurde im Rahmen der jährlichen Folgeuntersuchung eine zweite PSA-Messung durchgeführt. Von den hierbei gefundenen Karzinomen waren nur mehr 29% im

Stadium C oder D (Catalona et al, 1993). Bei 455 aufgrund eines PSA-Screenings entdeckten Karzinomen waren 7% in einem klinisch insignifikanten Stadium (Catalona et al, 1994), definiert mit einem Volumen < 0,5 ccm und gut differenziert (G I). Diese Definition stammt von Kabalin und Stamey, die die Pathohistologie von latenten Prostatakarzinomen anhand von Zystoprostatektomiepräparaten bei Patienten mit infiltrierendem Blasen tumor untersucht haben (Kabalin et al, 1989).

1.1.4 Erkennung von Mikrometastasen durch immunhistochemischen Nachweis gewebsspezifischer Antigene

Ein potentieller Ansatz zur präziseren Stadieneinteilung von PCa-Patienten liegt in immunchemischen Verfahren. Die Detektion maligner Zellen gelingt hierbei immunzytologisch mittels Antikörper, die gegen gewebsspezifische Antigene gerichtet sind; ein Verfahren, welches der herkömmlichen Zytologie überlegen ist (Molino et al, 1991). Als Untersuchungsmaterial können sowohl Knochenmarksausstriche, als auch Cytospin-Präparate verwendet werden. Der Nachweis der malignen Infiltration in das Knochenmark beruht dabei häufig allein oder zusätzlich auf einer Anfärbbarkeit von Zellen auf Cytokeratin, welches als epithelialer Marker im Knochenmark normalerweise nicht exprimiert wird, so dass eine Anfärbbarkeit als Infiltration zu werten ist und somit als Malignitätskriterium gilt (Riesenberget al, 1993).

1.2 Prostata-spezifisches Antigen (KLK-3)

Den momentan wohl wichtigsten Tumormarker beim PCa, sei es in der Routinediagnostik oder im Monitoring des Therapieverlaufs, stellt das prostata-spezifische Antigen (PSA) dar. PSA wurde erstmals unter seiner jetzigen geläufigen Bezeichnung 1979 beschrieben (Wang et al, 1979), obgleich schon 1971 einige Charakteristika des Moleküls veröffentlicht wurden (Hara et al, 1971). Seither konnten zahlreiche neue Informationen zur Biologie und Expression des Prostata-spezifischen Antigens (PSA) gewonnen werden.

1.2.1 PSA-Gen

Die PSA Gensequenz findet sich auf einem 6 kb-großen Gen im humanen glandulären Genlokus in der 13q Region auf dem Chromosom 19. Es beinhaltet das Gen für das "*pancreatic-renal tissue kallikrein*" (KLK-1) und die Gene für "*human glandular kallikrein-1*" (KLK-2) und PSA (KLK-3). Der PSA-Genlokus besteht wie die zwei verwandten Gene aus 5 Exons und liegt 12 kb upstream vom KLK-2 Gene. Die Promotorregion des PSA Genlokus beinhaltet einen Androgenrezeptor, was auf eine Transkriptionsregulation durch Androgene schließen lässt (Riegman et al, 1991). Der PSA-Genlokus zeigt eine hohe Homologie von mehr als 80 % mit den Genen der humanen glandulären Kallikrein-Familie.

PSA wurde erstmals von Lundwall und Lilja aus einer cDNA Bank kloniert (Lundwall et al, 1987). Die durch die cDNA vorausgesagte AS-Sequenz stimmt im wesentlichen mit Sequenzen aus Protein-

analysen überein. Geringe Unterschiede wurden an Positionen aa 70 und aa 151 beschrieben. An diesen Positionen kodiert die cDNA für Histidin und Aspartat, während nach den Proteinsequenzdaten dort Threonin bzw. Glutamin gefunden werden. Die Unterschiede gehen möglicherweise auf allelische Varianz zurück. Auch von anderen Autoren sind Sequenzunterschiede beschrieben worden (Schulz et al, 1988). Im C-terminalen Anteil des Moleküls wurden ausgeprägtere Abweichungen festgestellt. Diese erklären sich durch alternatives Splicing der hochmolekularen Vorläufer-mRNA (hm-mRNA) (Riegman et al, 1988). Bis zu sieben Transkripte in einer Größe von 0.5 - 5.6 kb konnten mit einer geeigneten Sonde in Tumoren nachgewiesen werden, wobei sich relative Expressionsunterschiede einzelner Spezies zwischen den untersuchten Tumoren ergaben. Die einzelnen PSA cDNA-Klone zeigen, dass während des Splicing offensichtlich die teilweise kurzen Intronsequenzen beibehalten werden (Intron 3: 145bp; Intron 4: 442 bp). Bis Exon 3 besitzen alle mRNA-Spezies eine identische mRNA-Struktur.

Auch im normalen Prostatagewebe existieren mehrere (wahrscheinlich vier) Transkripte (Lundwall, Å et al, 1987). Die hohe Homologie zum humanen glandulären Kallikrein-Gen (KLK-2) und zum renalen Kallikrein (KLK-1) schließt aber eine Kreuzhybridisierung nicht aus. So beträgt die Homologie zwischen 76% und 93% und bezieht sich auch auf die nicht-kodierenden Sequenzen (Lundwall, 1989). Dass alternatives Splicing für zumindest einige der beschriebenen mRNAs verantwortlich ist, haben Klonierungsstudien eindeutig gezeigt (Riegman et al, 1988). Die Charakterisierung des genomischen PSA-Gens ergibt das Vorliegen von 5 Exons. Eine Reihe von Pseudogenen ist für die Gen-Familie der Kallikreine beschrieben (Lundwall Å, 1989). Zahlreiche Faktoren beeinflussen die PSA-Synthese, wobei vor allem die Stimulation durch Androgene und Retinoidsäure zu erwähnen ist.

1.2.2 PSA-Protein-Molekül

Die überwiegende biologische Erscheinungsform des PSA ist ein 33kDa Glykoprotein, welches zu 93% aus AS und 7% Polysacchariden besteht. Das Pre-Pro-Protein des PSA trägt am N-terminalen Ende 24 AS; das reife, katalytisch aktive PSA-Protein besteht aus 237 einzelsträngig aufgebauten AS. Der isoelektrische Punkt liegt bei pH 6,9. Die Halbwertszeit in der Zirkulation wird mit 2,2 Tagen angegeben. Funktionell und strukturell stellt es eine extrazelluläre Serin-Protease aus der humanen glandulären Kallikrein Familie dar. Die charakteristische katalytische Triade besteht aus Histidin₄₁, Aspartat₉₆ und Serin₁₈₉, wobei das pH-Optimum für PSA mit 7,8 angegeben wird (Schaller et al, 1987). Die proteolytische Aktivität von PSA richtet sich zum größten Teil gegen gel-formierende Proteine in frisch ejakuliertem Sperma -zu nennen Semenogelin I, Semenogelin II und zum kleineren Teil Fibronectin, welche in den Samenbläschen produziert und sezerniert werden. Es resultiert daraus eine Verflüssigung des Spermas und dadurch eine verbesserte Beweglichkeit der Spermatozoen. Ferner wird für PSA angenommen, dass es das Zellwachstum moduliert. Die proteolytische Modifikation von `insuline-like growth factor-binding protein 3' (IGF-BP3) reduziert die Bindungsfähigkeit für IGF-1, was möglicherweise Zellwachstum fördert (Lee C et al, 1989).

Die PSA-Konzentration in der Samenflüssigkeit des Mannes wird mit 0.3-3mg/ml angegeben, wovon ca 60-70% in einer katalytisch aktiven und 30-40% in einer inaktiven Form vorliegen. Ein Grund hierfür

mag darin liegen, dass im männlichen Genitaltrakt nur geringe Mengen an extrazellulären Proteasen-inhibitoren, allen voran Protein C Inhibitor (PCI), vorliegen. Der Anteil von PSA-PCI-Komplex in der Samenflüssigkeit beträgt ca. 5%. Der geringe Anteil des PCI an der Inaktivierung des PSA mag durch die zehnfach höhere Konzentration von 30 mmol/ L PSA gegenüber ca. 3-4 mmol/ L PCI erklärt werden (Espana F et al, 1991).

Die Serumkonzentration von PSA wird im Normalfall mit < 4mg/L in der Literatur angegeben und liegt somit um den Faktor 10^6 niedriger als im Ejakulat. Auch im Serum findet man PSA in verschiedenen Formen vor: 60-95% des Serum-PSA liegen an $\alpha 1$ -Antichymotrypsin kovalent gebunden, als PSA-ACT-Komplex (90 kDa), vor. Die restlichen 5-40% treten als freie Form in Erscheinung (Lilja H et al, 1991). Nach Komplexbildung mit ACT werden einige antigene Determinanten durch die kovalente Bindung verdeckt, so dass nur Anti-PSA-Ak innerhalb der Routinediagnostik eine exakte Konzentrationsbestimmung der Gesamt-PSA-Konzentration ermöglichen, die die freien Epitope des gebundenen PSA binden. Noch ausgeprägter ist dieser Effekt bei Komplexbildung mit $\alpha 2$ -Makroglobulin, welches als Proteaseinhibitor das PSA gänzlich umhüllt und damit alle Epitope verdeckt.

1.2.3 Das Prostata-spezifische Antigen als Tumormarker

PSA galt lange Zeit im Vergleich zu anderen Tumormarkern als organspezifisch, nicht jedoch zugleich als tumorspezifisch. Vorzugsweise wird PSA im normalen, im benignen-hyperplastischen und im malignen Prostatagewebe exprimiert. Erhöhte PSA-Werte können ebenso zu etwa 5% bei gastro-intestinalen und bronchialen Tumoren, zu 2-4-% beim hypernephroiden Karzinom, bei Leukämien, hepatocellulären Karzinom und anderen Karzinomen auftreten. Die Werte überschreiten jedoch nicht 10 mg/l. Ferner konnte gezeigt werden, dass PSA ebenfalls in den periurethralen Drüsen des Mannes, bei einigen Mammakarzinomen, im Endometrium oder in der Milch stillender Mütter zu finden ist (Thomas L, 1992).

Zu den benignen prostatistischen Ursachen, die unter anderem zu einer PSA-Erhöhung im Serum führen können, zählen die benigne Prostata Hyperplasie (BPH) - die häufigste Blasenentleerungsstörung des Mannes - ferner die Prostatitis, der Prostatainfarkt, und die Kompression der Prostata z.B. durch Manipulationen, wie eine digitale rektale Untersuchung, eine Katheterisierung der Blase, eine Zytoskopie und eine Obstruktion des Blasenausganges.

Um in das Blut zu gelangen, muß das PSA die basale Zellmembran, das umgebende Bindegewebe, die kapilläre Basalmembran und das Gefäßendothel überwinden. Bei der BPH wird ein abnormes Sekretionsverhalten aufgrund einer Lumenkompression, Obliteration oder anderer Prozesse angenommen. Da unwahrscheinlich ist, dass ein organbegrenztes PCa mehr PSA bildet als die BPH, wird vermutet, dass Karzinome, die eine höhere Serumkonzentration als die BPH verursachen, die Organ Grenzen überschritten haben. Die mangelnde Korrelation zwischen dem Stadium des PCa und der PSA-Konzentration soll darauf beruhen, dass zwar mit zunehmender Größe des Adenokarzinoms mehr PSA gebildet wird, aber auch mit zunehmend geringerer Differenzierung und Zerstörung der Architektur

des Drüsengewebes die Sekretionsleistung abnimmt. Erst wenn durch Fernmetastasierung eine Anzahl von Tumorherden zunimmt, steigt die PSA Konzentration im Serum stark an.

1.2.4 PSA-Grenzwerte

Da sich die PSA-Konzentrationen beim Prostatakarzinom (PCa) und bei der BPH, insbesondere der Stadien A und B, überlappen, ist PSA nicht als spezifischer Suchtest auf ein PCa geeignet. Als Grenzwert in der Routinediagnostik gilt 10mg/l Serum. PSA Konzentrationen größer als 10mg/ l sind hier selten und werden vorwiegend gemessen, wenn zusätzlich Harnverhalt vorliegt oder die Prostata sehr groß ist (Thomas L, 1992).

Der PSA-Wert steigt mit zunehmendem Lebensalter an. Die Berechnung der 95%-Perzentile ergibt altersabhängige Grenzwerte (Tab. 1). Hierdurch wird die Sensitivität bei jüngeren Patienten erhöht; insbesondere bei diesen kommt es wegen der längeren Lebenserwartung darauf an, die Frühstadien zu erkennen und kurativ zu behandeln. Ob durch die niedrigere Sensitivität in höherem Lebensalter Karzinome im kurativen Stadium übersehen werden und trotz geringerer mittlerer Lebenserwartung hieraus eine Einschränkung der Überlebenszeit oder Lebensqualität folgt, könnten prospektive Studien zeigen.

Tab.1: Altersabhängige Grenzwerte für PSA
Oesterling et al, 1993, n = 471

Lebensalter	40 - 49	50 - 59	60 - 69	70 - 79
Referenzbereich	2,5	3,5	4,5	6,5

Dalkin et al, 1993, n = 5.226

Lebensalter	50 - 54	55 - 59	60 - 64	65 - 69	70 - 74
Referenzbereich	3,7	4,0	5,4	6,2	6,6

Viele Studien haben eine Korrelation zwischen der Höhe des präoperativen PSA-Wertes bei Patienten mit klinisch lokalisiertem Prostatakarzinom und dem pathologischen Tumorstadium belegt (Stamey et al, 1987; Catalona et al, 1991).

Zwischen allen pathologischen Stadien gibt es jedoch Überlappungen der PSA-Werte. PSA-Werte über 50ng/ml finden sich allerdings selten bei Patienten mit einem pathologischen Stadium pT2, d.h. einem organbegrenzten Tumor. Ist bei einem Patienten ein PSA-Wert von 75 oder 100ng/ml nachweisbar, so liegt mit hoher Wahrscheinlichkeit ein lokal fortgeschrittenes oder bereits metastasiertes PCa vor. Stamey et al. konnten zeigen, dass der PSA-Anstieg mit zunehmendem pathologischen Stadium mit der Zunahme des Tumervolumens korreliert (Stamey et al., 1989). Aufgrund der durchgeführten morphometrischen Studien konnte gezeigt werden, dass die PSA-Serumkonzentration um 3.5 ng/ml/cc

Tumor erhöht wird. Dennoch ermöglichte der alleinige präoperative PSA-Werte keine akkurate Abschätzung des pathologischen Stadiums. Patienten mit organbegrenzten Tumoren können anhand des PSA-Wertes nicht von Patienten mit einer extrakapsulären Tumorausdehnung unterschieden werden. Nach Oesterling et al. (1991) betrug die falsch positive Rate der PSA-Bestimmung in Hinblick auf die Vorhersage einer extrakapsulären Tumorausdehnung bei einem PSA-Grenzwert von 4 ng/ml bzw. 10 ng/ml 74% bzw. 65%.

1.2.5 Alternative PSA-Assays

Bei einem PSA-Wert zwischen 4 und 10ng/ml besteht eine starke Überlappung der Werte von Patienten mit BPH und mit PCa. 4 Entwicklungen sollen zukünftig in diesem Bereich die diagnostische Genauigkeit verbessern:

PSA-Density (PSAD)

PSA-Velocity (PSA im Zeitverlauf)

PSA-Q (Bestimmung des Quotienten von freiem und gesamtem PSA)

RT-PCR auf PSA-mRNA positive Zellen

1.2.5.1 PSA-Density (PSAD)

30-50% aller Patienten mit einer histologisch nachgewiesenen BPH weisen eine PSA-Erhöhung von über 4ng/ml auf. Durch die Bestimmung der PSA-Density (PSAD), d.h. dem Quotienten aus PSA-Konzentration und sonographisch bestimmten Prostatavolumen, wurde versucht den diagnostischen Stellenwert der PSA-Bestimmung zu verbessern. Benson et al (1992) fanden bei Patienten mit einem PSA-Wert zwischen 4-10ng/ml die PSA-Density in der Unterscheidung zwischen benignen und malignen Prostataveränderungen hilfreich, da bei einer erhöhten PSAD von mehr als 0.15 ng/ml PSA pro ccm Prostatavolumen signifikant häufiger PCa diagnostiziert wurden.

1.2.5.2 Bestimmung des Quotienten von freien und komplexgebundenen PSA (Q-PSA)

Die Untersuchungen von Lilja (Lilja et al, 1991) und Stenman (Stenman et al, 1991) zeigten, dass bei Patienten mit PCa PSA überwiegend an α 1-Antichymotrypsin (ACT) gebunden ist. Durch den Einsatz von Antikörpern gegen verschiedene Epitope des PSA-Moleküls ist es möglich, freies und an ACT gebundenes PSA zu differenzieren und getrennt zu bestimmen. Hierdurch konnte bei Patienten mit PSA-Werten zwischen 1-20ng/ml eine deutliche Verbesserung der Spezifität im Screening erzielt werden. Der Q-PSA liegt bei Patienten mit reiner BPH im Mittel bei 0,30 (30% des PSA in freier Form, 70% an ACT gebunden), bei Patienten mit lokalisiertem Prostatakarzinom bei 0,15 (15% des PSA in

freier Form). Ein Grenzwert von kleiner als 0,18 scheint auf das Vorliegen eines PCa hinzuweisen (Lilja et al, 1991; Stenman et al, 1991).

1.2.5.3 PSA im Zeitverlauf (PSA-velocity, PSAV)

Da die PSA-Werte direkt mit dem Volumen des Prostataepithels korrelieren, kann die Wachstumsgeschwindigkeit von benignem und malignem Prostatagewebe durch serielle Messung des PSA-Verlaufes abgeschätzt werden. Ein Anstieg von mehr als 0,75 ng/ml pro Jahr weist auf ein Prostatakarzinom hin (Carter et al, 1992). Einschränkend ist allerdings zu sagen, dass – wie bei immunologischen Analyseverfahren üblich – die Werte bei mehrfacher Bestimmung derselben Serumprobe schwanken und dass bei Verwendung unterschiedlicher Analyseverfahren Abweichungen beobachtet werden, die weit über dem oben angegebenen Wert liegen. Für die Bestimmung der PSAV ist daher zu fordern, dass mindestens 3 Werte im Verlauf eines Jahres vorliegen, die aus demselben Labor mit demselben Analyseverfahren stammen.

1.2.5.4. RT-PCR auf gewebsspezifische mRNA

Während es sich bei der Bestimmung von PSA-Density, PSA-Velocity und PSA-Q um immunologische Nachweisverfahren handelt, die das reife sezernierte PSA-Protein bestimmen, weist die RT-PCR die PSA kodierende mRNA nach.

Die RT-PCR – auch unter den Namen RNA-PCR oder Message Amplification Phenotyping (MAPP-ing) geläufig – beginnt mit der Konversion von mRNA zu cDNA durch eine reverse Transkription und läuft dann als eine Standard PCR fort.

Die RT-PCR als Amplifikationstechnik von gewebsspezifischer mRNA bietet, verglichen zu Protein basierten Detektionsverfahren, folgende Vorteile:

1. Die Sensitivität von RT-PCRs liegt bei weitem höher als die der Antikörper basierenden Detektionen
2. RNA ist extrazellulär instabil, so dass ihr Nachweis die Präsenz von Tumorzellen anzeigt.
3. Gewebsspezifische mRNA kann trotz negativem Proteinnachweis vorhanden und detektierbar sein (Qiu et al., 1990)
4. PCR-Assays sind vielseitiger etablierbar und durchführbar als Antikörper-basierte Assays; z.B. Primer sind kostengünstig und schnell zu erwerben. Die Generierung von spezifischen Antikörpern ist demgegenüber aufwendig

Smith et al. machten sich erstmals 1991 die charakteristische hohe Sensitivität und Spezifität der RT-PCR beim Nachweis der Tyrosinase beim malignen Melanom zunutze. Blutproben von 4/7 Patienten mit malignem Melanom wurden in ihren Assay positiv getestet, wogegen alle Kontrollproben negativ blieben (Smith et al. 1991).

Die Vorstellung, dass die RT-PCR von Nutzen bei der Diagnose und Differenzierung von primären oder metastatischen Tumoren als prognostischer Marker oder bei der Detektion von residuellem Tumor nach erfolgter Behandlung sein könnte, ermutigte zahlreiche Arbeitsgruppen, die mRNA-Expression gewebsspezifischer Marker im peripheren Blut und Knochenmark bei Patienten mit diversen malignen Erkrankungen zu untersuchen siehe (Tab. 2).

Tab.: 2. Beispiele v on RT-PCRs auf gewebsspezifischer m RNA

Target	Tumor	Studie
Tyrosinase	Melanom	Smith et al. (1991) Foss et al. (1995) Brossart et al. (1995)
Prostata-spezifisches Antigen (PSA)	Prostata	Moreno, et al 1992 Deguchi et al. (1993) Israeli et al. (1994) Katz et al. (1994) Wood et al. (1994)
Cytokeratine (CK-19 and -20)	Colon	Burchill et al. (1995)(CK 19) Gunn et al. (1996)(CK 20)
Carcinoembryonales Antigen	Colon	Neumaier et al. (1995) Soeth et al. (1996) Jonas et al. (1996)
CD 44	Magen Colon	Yokozaki et al. (1994) Rodriguez et al. (1995) Yoshida et al. (1996) Gotley et al. (1996)

Moreno et al. zeigten als erste (Moreno, et al 1992), dass mittels RT-PCR auch auf PSA-mRNA der Nachweis von zirkulierenden Tumorzellen im peripheren Blut von PCa-Patienten gelingt. Es folgten zahlreiche andere Arbeitsgruppen, die PSA-mRNA auch im Knochenmark oder in drainierenden Lymphknoten von PCa-Patienten detektierten (Wood et al., 1994; Deguchi et al., 1993). Eine tabellarische Auflistung von klinischen RT-PCR Studien auf PSA-mRNA und deren gewonnenen Daten zeigt Tab.16, Seite 82. Gegenwärtig ist die klinische Relevanz der generierten Daten und damit der RT-PCR schwerlich beurteilbar, zumal ihre diagnostische Spezifität nicht ausreicht (z.B. positive Testergebnisse bei gesunden Patienten), was eine breite Verwendung dieser molekular-diagnostischen Methode bisher verhinderte.

1.3 Verwandte, homologe Proteine und weitere Marker des PCa

1.3.1 Pankreatisches glanduläres Kallikrein (KLK-1)

Das humane renal-pankreatische Kallikrein stellt eine Serin-Protease mit eingeschränkter trypsinähnlicher Aktivität dar, welche die Fähigkeit besitzt, neben Kininogen-Präkursoren auch Bradykinin enzymatisch zu aktivieren (MacDonald et al, 1988). Das Molekül weist eine 62%-ige Sequenzübereinstimmung zu PSA in der Primärstruktur auf und beinhaltet den Kallikrein-typischen Aspartatrest, welcher für die katalytischen Fähigkeiten der Kallikreine benötigt wird. Es wird u.a. in der Niere (Baker et al, 1985), im Pankreas und in submandibulären Speicheldrüsen (Fukushima et al, 1985) in identischer Sequenz exprimiert und zeigt somit keine strikte Organspezifität. Southern-blot-Analysen konnten schon 1985 mehrere verwandte Sequenzen im humanen Genom zeigen (Baker et al, 1985).

1.3.2 Humanes glanduläres Kallikrein (KLK-2)

Beim humanen-glandulären Kallikrein (KLK-2) handelt es sich um eine Serin-Protease, welche wie PSA aus 237 AS aufgebaut ist. Auf Proteinebene findet sich eine 80%-ige Homologie zu PSA (Henttu et al, 1990) und eine 66%-ige Identität zur AS-Sequenz des pankreatisch-renalen Kallikreins (KLK-1) (Schedlich et al, 1987). Funktionell und strukturell handelt es sich um eine extrazelluläre Serin-Protease, die die typische katalytische Triade, bestehend aus Histidin₄₁, Aspartat₉₆ und Serin₁₈₉-Rest (Young CL), trägt. Im Gegensatz zu KLK-2 fehlt dem PSA jedoch ein Aspartat-Rest (Asp₋₁₈₃), welcher charakteristisch für die Kallikrein-spezifische Spaltung ist, wogegen KLK-2 und das pankreatisch-renale Kallikrein diesen Aspartatrest besitzen (Schedlich et al, 1987). KLK-2 wird wie PSA überwiegend in den epithelialen Zellen der Prostata synthetisiert und unterliegt in seiner Transkriptionsregulation den Androgenen. Der überwiegende Anteil des im Ejakulat zu findenden glandulären Kallikreins bindet mit Protein C Inhibitor (PCI) zu einem inaktiven Komplex. Die Gene für PSA und KLK-2 werden in normalem, benign-hyperplastischem und maligne entartetem Prostataepithelium exprimiert. Schedlich et al gaben nach Sequenzierungen die Größe des Gens mit 5,2kb an. Es beinhaltet fünf Exons, welche das 261 AS große Pre-Pro-Protein definieren. Die Größe der Introns wird in Abfolge mit 1206, 1589, 113 und 1393 bp angegeben.

Abb.1: Sequenzvergleich für File1: Human PSA cds (KLK3) Medline Acc# NM_001648; File2: Human KLK2 cds Medline Acc# XM_031757

```

File1  1  ATGTGGGTCCCGGTTGTCTTCC-TCACCCTGTCCGTGACGTGGATTGGTG      50
        |||||  ||  ||||  |||  ||  ||  ||  ||||  |||  |||  |||||
File2  1  ATGTGGGACCTGGTTCTCT-CCATCGCCTTGTCTGTGGGGTGCAGTGGTG      50

```

Einleitung

51	C--TGCACCCCTCATCCTGTCTCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGCGAGA	100
51	CCGTGC-CCC-TCATCCAGTCTCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGA	100
101	AGCATTCCCAACCCTGGCAGGTG-CTTGTGGCCT-C--TCGTGGCA-GGG	150
101	AGCATTCCCAACCCTGGCAGGTGGCT-GTG--TACAGTCATGG-ATGGG	150
151	CAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGCACCCCCAGTGGGTCTCACAGCTGCC	200
151	CACACTGTGGGGGTGTCCTGGTGCACCCCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCC	200
201	CACTGCATCAGGAACAAAAGC--GTGATCTTGCTGGGTCTGGCACAGCCTG	250
201	CATTGCCTAAAGAAGAATAGCCAG-G-TCTGGCTGGGTCTGGCACAACTG	250
251	TTTCATCCTGAAGACACAGGCCAG-GTATTTTCAGGTCTAGCCACAGCTTCC	300
251	TTTGAGCCTGAAGACACAGGCCAGAGGGTCCCTG-TCAGCCACAGCTTCC	300
301	CACACCCGCTCTACGATATGAGCCTCCTGAAGAATCGATTCTCAGGCCA	350
301	CACACCCGCTCTACAATATGAGCCTTCTGAAGCATCAAAGCCTTAGACCA	350
351	GGTGATGACTCCAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGTCAGAGCCTGC	400
351	GATGAAGACTCCAGCCATGACCTCATGCTGCTTCGCCTGTCAGAGCCTGC	400
401	CGAGCTCACGGATGCTGTGAAGGTCATGGACCTGCCCACCCAGGAGCCAG	450
401	CAAGATCACAGATGTTGTGAAGGTCCTGGGCCTGCCCACCCAGGAGCCAG	450
451	CACTGGGGACCACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATTGAACCAGAG	500
451	CACTGGGGACCACCTGCTACGCCTCAGGCTGGGGCAGCATCGAACCAGAG	500
501	GAGTTCTTGA-CCCCAAAGAACTTCAGTGTGTGGA-CCTCCATGTTATT	550
501	GAGTTCTTGCGCCCCAG-GAGTCTTCAGTGTGTG-AGCCTCCATCTCCTG	550

Einleitung

551	TCCAATGACGTGTGTGCGCA-AG-TTCACCCTCAGAAGGTGACCA-AGTT	600
551	TCCAATGACATGTGTGCT-AGAGCTT-ACTCTGAGAAGGTGAC-AGAGTT	600
601	CATGCTGTGTGCTGGACGCTGGACAGGGGGCAAAG-CACCTGCTCGGG-	650
601	CATGTTGTGTGCTGGGCTCTGGACAGGTGGTAAA-GACACTTG-TGGGGG	650
651	TGATTCTGGGGGCCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGTATCACGT	700
651	TGATTCTGGGGGTCCACTTGTCTGTAATGGTGTGCTTCAAGGTATCACAT	700
701	CATGGGGCAGTGAACCATGTGCCCTGCCCCGAAAGGCCTTCCCTGTACACC	750
701	CATGGGGCCCTGAGCCATGTGCCCTGCCTGAAAAGCCTGCTGTGTACACC	750
751	AAGGTGGTGCATTACCGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGTGGCCAACCC	800
751	AAGGTGGTGCATTACTGGAAGTGGATCAAGGACACCATCGCAGCCAACCC	800
801	CTGA.....	850
801	CTGA.....	850

1.3.3 Prostata-spezifisches Membran-Antigen (PSM)

Eine cDNA für das PSM wurde 1993 erstmals beschrieben (Israeli et al, 1993). Sie kodiert ein 100 kDa großes integrales Membranprotein, welches eine signifikante interne Homologie zum Transferrin-Rezeptor aufweist. Alternatives splicing scheint für PSM im Gegensatz zu PSA nicht vorzukommen, wenngleich dies von den Autoren explizit nicht ausgeschlossen wird, da die mRNA mit einer 5'-spezifischen Sonde nicht nachweisbar ist (Israeli et al, 1994). Tatsächlich scheinen wenigstens zwei geringgradig größere Isoformen in LNCaP-Zellen zu existieren. Dies mag bedeuten, dass in Tumoren eine dem PSA ähnliche Situation vorliegt.

Die Expression des Genprodukts wurde mit einem spezifischen Antikörper untersucht (Israeli et al, 1994). Das Antigen wird überwiegend in Prostatagewebe sowie in Karzinomen exprimiert, kommt in Spuren auch im menschlichen Gehirn und der Speicheldrüse vor, wie anhand von RNase-protection assays gezeigt wurde. Pseudogene für PSM sind nicht beschrieben. In einer ersten Arbeit dieser Arbeitsgruppe, welche einen PSM-spezifischen PCR Assay vorstellt, sind allerdings in rund 10% der untersuchten Kontrollproben positive Resultate aufgetreten (Israeli et al, 1994). In wieweit dies ein Hinweis für das Vorliegen von Pseudogenen sein mag, bedarf der Klärung.

1.3.4. Prostataspezifische saure Phosphatase (PAP)

Bei der PAP handelt es sich um ein Dimer mit einem Molekulargewicht von 97000, bestehend aus zwei identischen Untereinheiten.

Im Rahmen malignen Wachstums der Prostata-drüse, aber auch während Entzündungsvorgängen und nicht zuletzt auch im Rahmen der benignen Prostatahyperplasie kommt es zum vermehrten Auftreten der PAP im Plasma. Die normalerweise bei jungen Männern und Frauen gleichermaßen meßbare, sehr niedrige PAP-Konzentration, etwa 0.3 mg/l, stammt aus Granulozyten.

Solange keine extraprostatistischen PAP-Produktionsstätten in Form von Lymphknotenmetastasen oder Fernmetastasen vorhanden sind, sind die in der peripheren Blutbahn gemessenen PAP-Konzentrationen beim PCa denen von Patienten mit benigner Prostatahypertrophie sehr ähnlich. Die eigentliche Indikation zur PAP-Bestimmung ist die Diagnose eines metastasierten PCa, die Verlaufs- und Therapiekontrolle des bekannten Prostatakarzinoms (Thomas L, 1992).

2. Zusammenfassende Problemstellung und Ziel der Arbeit

Der spezifische Nachweis von Mikrometastasen beim Prostatakarzinom ist problematisch, jedoch vielversprechend. Die RT-PCR zeigt im Gegensatz zu anderen sensitiven Amplifikationstechniken, wie branched DNA, LCR oder NASBA, konkrete Ansätze bei der Detektion von singulären Tumorzellen in diversen Geweben. Jedoch weisen klinische Studien selbst bei vergleichbarem Patientengut, gleichem untersuchten Zielmolekül (PSA-mRNA) und vergleichbarer Sensitivität und Spezifität unterschiedliche Resultate auf, was durch mangelnde Standardisierung der einzelnen Assays erklärt sein mag.

Ziel der Arbeit ist es, eine standardisierte und hochsensitive RT-nested PCR auf PSA-mRNA zu etablieren, die alle bekannten Splicevarianten der PSA-mRNA detektiert. Die RT-nested PCR, welche unter klinischen Routinebedingungen die Aspekte der Qualitätskontrolle für PCRs berücksichtigt, soll hochsensitiv eine PSA-mRNA positive Zellen im peripheren Blut detektieren können. Der Test soll hinsichtlich von Spezifikationen wie analytischer und diagnostischer Sensitivität sowie Spezifität charakterisiert, anschließend für die Untersuchung von Blutproben von 40 PCa-Patienten der Urologischen Poliklinik des UKE angewendet sowie die Ergebnisse der Testung statistisch ausgewertet werden. Ferner sollen Ansätze für eine automatisierte und spezifische Auswertung von biotinylierten PSA-PCR Amplifikaten mittels spezifischer Hybridisierung in einem klinisch-chemischen Analyser (ES-300, ELISA-Analysegerät der Firma Boehringer Mannheim) dargelegt werden.

3. Allgemeine Arbeitsmethoden

3.1 Puffer, Lösungen und Medien

Ladepuffer für PCR-Produkte (10x):	0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol, 25% Ficoll (10x) in TAE
PBS:	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 10 mM NaH ₂ PO ₄ , 150mM NaCl
SSC (1x):	150mM NaCl, 15 mM Na ₃ Citrat, pH 7,4
TAE:	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
TE:	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
RNA-Extraktionspuffer:	0,14 M NaCl, 1,5 mM MgCl ₂ , 10 mM Tris-Cl, pH 8,6, 0.5% Nonidet P-40 (NP 40), 1 mM Dithiothreitol, 1000 U/ ml RNase Inhibitor (Boehringer Mannheim)
Proteinase Verdauungs-Puffer:	0,2 M Tris-Cl, pH 8,0, 25 mM EDTA, pH 8,0, 0,3 M NaCl, 2% SDS
Modifizierte Solution D (100 ml):	70,1g Guanidinium-Isothiocyanat (Fluka), 3,3 ml 0,75 M Natriumzitat, 5ml 10% Sarcosyl (Sigma), ad 100 ml H ₂ O (Pharmacia & Upjohn), 720 µl β-Mercaptoethanol (Sigma) - (Nach Zugabe des β-Mercaptoethanols ist die Lösung für einen Monat brauchbar; ohne β-Mercaptoethanol ist sie für 3 Monate lagerbar).
10 x Kinase-Puffer:	0,7 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 M MgCl ₂ , 0,05 M DTT

Puffer und Lösungen für den ES 300

Denaturierungslösung (DL):	100 mM NaOH (2M)	5 ml
	500 mM NaCl (5M)	10 ml
	10mM EDTA	2 ml
	0.1 % Tween 20	1ml
	0,5% Blocking	10 ml
	Aqua dest.	72 ml
		100 ml

Material und Methoden

Hybridisierungslösung (HL):	2 x SSC (330mM)	(20 x)	10 ml
	0,5 % Blocking (5%)		10 ml
	10mM EDTA	(0.5M)	2 ml
	0,1 % Tween 20	(10%)	1ml
	plus OLIGO 2/3-Exon- Dig		
	Aqua dest.		77 ml
			100 ml
Waschpuffer (WP):	1 x SSC	(20 x)	50 ml
	10mM EDTA	(0.5M)	20 ml
	0,1 % Tween 20	(10%)	10 ml
	Aqua dest.		920 ml
			1000 ml

Die Konzentration für SSC ist in DL; HL und WP als exemplarisch zu betrachten. In Versuchsreihen am ES 300 wurde die Konzentration von SSC variiert, um den Einfluß von diversen Salzbedingungen in den verschiedenen Lösungen auf die Signalintensität zu testen.

3.2 Sterilisation von Arbeitsmaterialien

Flüssigkeiten (Wasser, Pufferlösungen) oder Geräte aus Polypropylen (Zentrifugenbecher, Eppendorfgefäße, Pipettenspitzen) oder Glas wurden bei 121°C und 2 bar für zwei Stunden autoklaviert und anschließend bei 100°C im Heihschrank getrocknet.

Um zu vermeiden, dass Nukleinsäuren an Plastikstrukturen anhaften, wurden 0,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Arbeit mit Nukleinsäuren in eine Silikonisierlösung (Serva) getaucht, für 2 h bei 100°C im Trockenschrank erhitzt und danach autoklaviert (s.o.). Oberflächen, Arbeitsplätze und Geräte wurden mit 10%-igem Natriumhypochlorid gesäubert, um Nukleinsäuren und PCR-Produkte zu eliminieren.

3.3 Radioaktivitätsmessung

Für die Messung der spezifischen Aktivität wurden 1µl der markierten DNA-Proben in 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) pipettiert und in einem Packard Tricarb Szintillationszähler gemessen. Die Zählrate (cpm) wurde 1x über einen Zeitraum von 2min ermittelt. Für die Abschätzung von Filteraktivitäten bzw. zur Überwachung der radioaktiven Kontamination am Radioaktivarbeitsplatzes diente ein Strahlungsmeßgerät der Firma Berthold (LB 1210 B).

3.4 Absorptionsmessungen

Absorptionsmessungen wurden an einem UV Spektrophotometer (Shimadzu V-160) durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde in Quarz-Halbmikroküvetten mit 1 cm Schichtdicke bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm bestimmt. Nach Sambrook J et al. (1989) entspricht eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von:

50 µg/ml dsDNA

40 µg/ml ssDNA oder RNA

33 µg/ml Oligonukleotid

Da die Messergebnisse des Photometers nur bei einer OD₂₆₀ von 0,2 bis 0,9 linear der eingesetzten Nukleinsäurekonzentration sind, wurden stets mehrere Verdünnungen (1:20, 1:50, 1:100) gemessen. Die Reinheit einer RNA-Präparation lässt sich mittels des Quotienten E₂₆₀/E₂₈₀ abschätzen. Er sollte im Bereich von 1,8-2,0 liegen. Proteinkontaminationen (Absorption bei 280 nm) machen sich durch eine Verringerung, DNA-Kontaminationen (Absorption bei 260 nm) durch eine Vergrößerung dieses Quotienten bemerkbar (Sambrook J et al. 1989). Die Konzentration von RNA Präparationen aus Zellkulturen wurden auf diese Weise ermittelt. Bei RNA-Präparationen aus Patientenproben wurde aufgrund der zu erwartend geringen Menge an präparierter Nukleinsäure hierauf verzichtet.

3.5 Computerunterstützte Datenerfassung

Für die Datenerfassung und -verarbeitung stand ein institutseigener Apple Macintosh LC Computer mit angeschlossener CD Rom zur Verfügung. Für die Erstellung von Tabellen und Graphiken wurde das Programm Excel 4.0 der Firma Microsoft verwendet. Sequenzanalysen wurden mit dem Programm MacMolly, Version 3.5. und Tetra, Version 2.0 durchgeführt.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Verwendete Zelllinien

Alle Zellen entstammen der American Type Culture Collection (ATCC). Zur Erstellung der Sensitivitätskontrolle und der Verdünnungsreihen wurden Zellen der LNCAP-Zelllinie verwendet. LNCAP ist eine humane Prostatakarzinomzelllinie, welche 1977 von Horoszewicz et al. durch Punktion eines supraclaviculären Lymphknoten bei einem 50-jährigen kaukasischen Patienten mit metastasiertem PCa gewonnen wurde. LNCAP-Zellen sind die einzig bekannten Prostatakarzinomzellen, für welche Androgen-Sensitivität bewiesen wurde. Sie exprimieren neben PSA auch andere bekannte gewebsspezifische Marker wie PSM, KLK-2 und PAP. Durch Northern blot Analysen konnte gezeigt werden, dass die Expression von PSA und von KLK-2 auf mRNA Ebene bei LNCaP Zellen durch

Androgene wie Dihydrotestosterone und R1881 zu steigern ist, während die Expression von PAP in LNCaP-Zellen sank.

Neben peripher-venösem Blut von Freiwilligen diente die humane Mammakarzinomzelllinie MDA 231 als Negativkontrolle. Diese Zellen entstammen einer 51-jährigen Kaukasierin und wurden von Cailleau et al. isoliert und charakterisiert. Im Gegensatz zu anderen Mammakarzinomzelllinien, wie z.B. MCF-7, konnte für MDA-231 mittels RT-PCR nicht gezeigt werden, dass sie PSA-mRNA exprimiert.

3.6.2 Nährmedien und Puffer

Als Kulturmedium für die humane Mammakarzinomzelllinie und die humane Prostatakarzinomzelllinie LNCAP diente DMEM Medium, supplementiert mit 50ml 100% FCS (Gibco BRL) und 250µl Gentamycin (50mg/ml Gibco BRL) versehen. Das FCS wurde zuvor bei 56°C 30min komplement-inaktiviert. Sowohl die Herstellung des Zellmediums, als auch die Kultivierung der Zellen fanden unter einer Zellkulturbank mit aktivem Air-Flow statt (Gelaire Flow Laboratories Typ TC 48).

3.6.3 Kultivierung von LNCAP und MDA 231

MDA231 und LNCAP Zellen wurden in 25 cm² Kulturschalen (Falcon/Castor) in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus Instr. Typ 6220 CU) bei 37°C unter 5% CO₂-Atmosphäre angezogen. Kultivierungen fanden alle 4-6 Tage statt. Bei 70-80%-iger Konfluenz wurde das Nährmedium vorsichtig mittels Vakuumpumpe (Neuberger, Freiberg) abgesaugt. Zunächst wurde 1ml der Trypsin-EDTA-Lösung (1%) (Gibco-BRL) kurz in ein sterile 75 cm³-Kulturgefäß hineinpipettiert und sofort wieder vorsichtig abpipettiert. Eine Schädigung des Monolayers wurde vermieden, um die Freisetzung intrazellulärer RNA gering zu halten. Anschließend wurden nochmals 2ml der Trypsin-EDTA-Lösung (1%) (Gibco-BRL) auf den Zellrasen pipettiert und durch Schwenken der Kulturflasche gleichmäßig über den Monolayer verteilt. Innerhalb der folgenden Minute wurde die Kulturflasche vorsichtig beklopft, um das Ablösen der Zellen zu erleichtern. Die gelösten Zellen wurden umgehend in 8ml des verwendeten Mediums aufgenommen. Die erhaltenen 10ml wurden mehrmals vorsichtig durch eine Spritze gezogen, bevor lediglich 2ml zur weiteren Kultivierung auf zwei neue Kulturflaschen aufgeteilt wurden. Die restlichen 8 ml konnten für Verdünnungsreihen benutzt werden.

Für RNA-Präparation und Verdünnungsexperimente wurden die Zellen noch 2x in PBS gewaschen und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit vertikalem Luftstrom durchgeführt.

3.6.4 Einfrieren, Lagerung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung wurden jeweils 1-5x 10⁷ Zellen in 3ml Medium mit 10% FCS und 10% DMSO aufgenommen, auf drei eisgekühlte Kryogegefäße (Nunc) verteilt und für 2-12 h bei -80°C eingefroren.

Danach wurden die tiefgefrorenen Zellen in einem N₂-Tank gelagert. Zur Vitalitätskontrolle wurde am 2. Tag ein Aliquot der Zellen aufgetaut und in Kultur genommen. Hierzu wurden die Kryogefäße in der Hand kurz angewärmt und sofort mit frischem Medium gespült, bis die Zellen vollständig aufgetaut waren. Daraufhin wurde die Suspension mit 10ml Medium verdünnt und abzentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in frischem Medium aufgenommen und wie oben beschrieben, kultiviert.

3.6.5 Zellzählungen

Zellzählungen (u.a. für Verdünnungsversuche) wurden in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Lichtmikroskop der Firma Diavert durchgeführt und durch Ergebnisse der Zellzählung am T660 cell-counter (Coulter) bestätigt. Sowohl die Zellen der Zelllinien MDA231, als auch LNCAP wurden am T660 als Leukozyten identifiziert, so dass ein Vergleichswert zur manuellen Zählung herangezogen werden konnte. Es wurden jeweils mehrere Verdünnungen ausgezählt und die Ergebnisse dann umgerechnet und gemittelt. Die Vitalität der Zellen wurde mit Trypanblau-Färbung überprüft.

3.7 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung von PSA-positiver RNA dienten LNCAP Zellen. Als PSA-mRNA-negative Zellen wurden die Mammakarzinomzelllinie MDA231 bzw. humanes Vollblut verwendet. Innerhalb der Entwicklung der RNA-Präparation und der Rekonstitutionsversuche wurden für die Generierung von Verdünnungsreihen LNCAP-Zellen im peripheren Blut gesunder Freiwilliger verwendet. Alle Blutproben wurden in für den klinischen Routinebetrieb handelsüblichen 3,2ml K-EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Hamburg) abgenommen und umgehend weiter bearbeitet. Heparin wurde als Antikoagulant nicht verwendet, da Heparin die murine leukemia virus reverse-Transcriptase (M-MLV) und Taq DNA-Polymerase inhibiert (Beutler E, et al. 1990, Holodniy et al 1991).

3.7.1 Standardisierung und Qualitätskontrolle

Aufarbeitung des Ausgangsmaterials

Um die Degradation der RNA zu vermeiden, wurden die Blutproben unmittelbar nach Abnahme weiterverarbeitet und einer stabilisierenden Lösung zugeführt.

Die Herstellung dieser Lösung erfolgte auf einem beheizbaren Magnetrührer (IKA Labortechnik) und unter Verwendung von gebackenem Material (Meßzylinder, Kolben und Magnetrührer; 180°C für mindestens 2h). Sie stellt eine Modifikation der von Chomczynski et al. (1987) entwickelten als Solution D bezeichneten denaturierenden Lösung dar, welche hier eine höhere Konzentration an Guanidinium-Isothiocyanat enthält als ursprünglich von Chomczynski et al. beschrieben.

Material und Methoden

Für 100 ml der Lösung wurde verwendet:

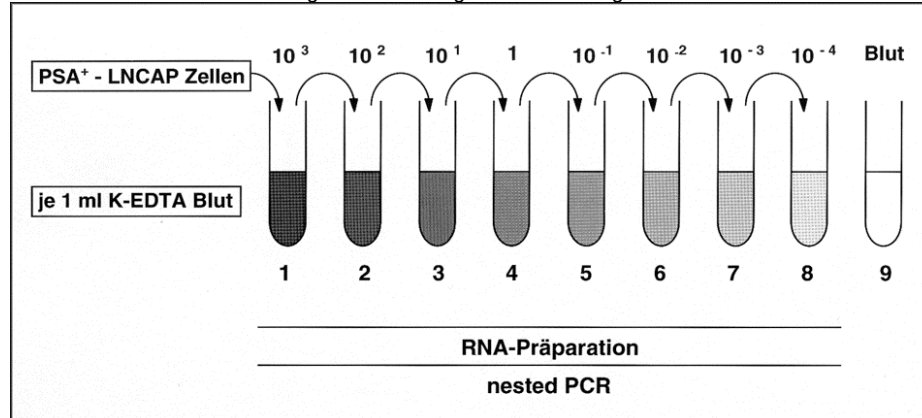
70,1 g	Guanidinium-Isothiocyanat (Fluka)
3,3 ml	0,75 M Natriumzitat (Merck)
5 ml	10% Sarcosyl (Sigma)
ad 100 ml	H ₂ O (Pharmacia & Upjohn)

Die Komponenten wurden bei einer Temperatur von 70°C angesetzt und nach Auflösung des GITC mit auf H₂O 100ml aufgefüllt. Auf 100 ml Lösung wurden 720µl Mercaptoethanol hinzupipettiert. Alle Lösungen wurden in autoklavierten Behältern und mit frischem Aqua ad iniectionem (Pharmacia & Upjohn) als Stocklösungen angesetzt. Die Stocklösungen wurden, sofern der β-Mercaptoethanol schon zugesetzt wurde, für höchstens einen Monat verwendet; ansonsten konnten sie für zwei weitere Monate benutzt bzw. trocken gelagert werden. Die Stocklösung wurde unter einer UV-bestrahlten Laminarstrichkammer HB2448 von Heraeus in 6ml Vaquettenröhrchen der Firma Greiner (Greiner, Frickenhausen) aliquotiert, um etwaige Kontaminationen durch RNAsen oder PCR-Amplifikate zu vermeiden. 5ml der guanidinium-iso-thiocyanathaltigen Lösung wurden in ein Vaquetten-Röhrchen pipettiert.

3.7.2 Herstellung der Verdünnungsreihen und Sensitivkontrollen

Nach dem Abernten der Zellen und der Bestimmung der Zellzahl, wie unter 3.6.3 und 3.6.5 beschrieben, wurden LNCaP-Zellen in peripherem K-EDTA Blut eines gesunden Freiwilligen in Reihen verdünnt. Dabei wurden 100µl der Zellsuspension in 1ml K-EDTA Blut gegeben und mehrfach durchmischt. Aus dieser Verdünnung wurden wiederum 100µl entnommen und erneut in 1ml K-EDTA Blut 1:10 verdünnt. Diese Verdünnungsmethode wurde teilweise bis auf Verdünnungen von 10⁻⁴ Zellen/ml K-EDTA Blut fortgeführt. Die Verdünnungen fanden in autoklavierten 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen und soweit wie möglich auf Eis statt. Die mit Blut verdünnten Prostatakarzinomzellen wurden, wie die Patientenproben auch, unmittelbar danach der RNA-stabilisierenden Lösung zugeführt, homogenisiert und sofern nicht weiter bearbeitet bei -80°C tiefgefroren.

Abb.2: Schematische Darstellung der Herstellung von Verdünnungsreihen und der Sensitivkontrollen



3.7.3 Herstellung der Negativkontrollen

Als Negativkontrollen dienten neben mindestens zwei Wasserkontrollen die Mammakarzinomlinie MDA 231 und peripheres Blut. 1ml peripheres K-EDTA Blut wurde wie die Patientenproben auf 5ml der guanidiniumhaltigen Lösung im Vaquetten-Röhrchen pipettiert und zweimal mit einer sterilen 10 ml Spritze durch eine 0,8 mm Kanüle (Braun) aspiriert und homogenisiert. MDA-231 Zellen wurden in einer Konzentration von 10^5 - 10^6 /ml der stabilisierenden Lösung zugeführt, ebenfalls homogenisiert und anschließend bei -80°C tiefgefroren.

3.7.4 Aufarbeitung des Ausgangsmaterials der Patienten

1ml des zu untersuchenden K-EDTA Blutes der Patienten wurde durch den Gummiverschluss der Vaquette hinzugegeben, wodurch alle Zellen hämolysierten und die Lösung durch die Oxydation des zweiwertigen zu dreiwertigem Eisen eine kaffeebraune Farbe annahm. Die Kennzeichnung und Bestückung der Vaquetten-Röhrchen mit Patientenblut fand unmittelbar in der urologischen Poliklinik des Universitätskrankenhauses Eppendorf statt. Nach Zugabe des Patientenblutes wurden die Proben sorgfältig durchmischt und umgehend kühl bei 4°C gelagert. Der Transport der Proben zum untersuchenden Labor fand am selben Tag statt.

Um die Zellen vollständig zu homogenisieren, wurde die Suspension zweimal mit einer sterilen 2ml Spritze durch eine 0,8mm Kanüle (Braun) aspiriert und langsam wieder herausgedrückt. Dabei wurde die DNA in kleinere Fragmente abgeschnitten, und die Suspension verlor an Viskosität. Dieser Vorgang wurde noch einmal mit einer 0.4mm Insulinkanüle wiederholt, die Lösung dann sofort wieder auf Eis gestellt. Die Probe wurde nun mehrfach kräftig durchmischt, um Homogenität zu erzielen. Wie von Gillespie et al. (1994) empfohlen, betrug nun die Guanidiniumkonzentration in den 6ml Hämolysat 5 M, welche in 600 μl -Einheiten in autoklavierte und gekennzeichnete 2 ml Eppendorf Röhrchen aliquotiert wurden. Sofern die Aliquots nicht unverzüglich der weiteren RNA-Extraktion zugeführt wurden, lagerten

sie bei -80°C (Kryotech) bis zu ihrer weiteren Verarbeitung. Sowohl bei der Herstellung der Verdünnungsreihen und Sensitivkontrollen, als auch bei der Verarbeitung der Patientenproben wurden nach der Bestückung der Vaquetten-Röhrchen mit 1ml K-EDTA Blut, die nun mehr 6ml des homogenen Hämolsates in 600 μl -Einheiten aliquotiert, gekennzeichnet und bei -80°C in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen tiefgefroren.

3.8 Molekularbiologische Arbeiten

3.8.1 RNA-Extraktionsmethoden

Bei der Entwicklung der RNA-Extraktionsmethode wurden verschiedene etablierte Methoden angewandt, ggf. modifiziert und miteinander verglichen. Dabei bestand das Hauptziel darin, eine kurze, reproduzierbare und verlässliche Methode zu etablieren, die intakte RNA liefert, welche einer reversen Transkription zugänglich ist.

Im einzelnen wurden folgende Präparationsmethoden angewandt:

1. RNA-Extraktion mittels Proteinase K Verdau (Sambrook et al 1989)
2. RNA-Extraktion mit GITC und Phenol-Chloroform (Chomczynski et al. 1987)

Die von Chomczynski et al. entwickelte Methode wurde modifiziert und an Bedingungen adaptiert, die es ermöglichen, viele Proben gleichzeitig zu bearbeiten. In Anlehnung an Gillespie et al wurde die Ausgangskonzentration von Guanidinium-Isothiocyanat auf 6M erhöht, um RNAsen-Aktivität sicher und dauerhaft auszuschalten. Unter Inaktivierung der RNasen führt das stark denaturierende Guanidinium-isothiocyanat sowohl zur Auflösung zellulärer Strukturen, als auch zur Dissoziation von Protein-Ribonukleinsäurekomplexen. Bei der anschließenden Phenol/Chloroform-Extraktion werden DNA und Proteine abgetrennt und die RNA alkoholisch gefällt.

3.8.1.1 RNA-Extraktion aus peripherem Blut

Die Gewinnung der RNA war unter allen im weiteren Verlauf des Tests befindlichen Spezimen einheitlich. Sowohl die Negativkontrolle, wie MDA 231 und peripheres Blut von gesunden Freiwilligen und der Prostatakarzinompatienten, als auch die Sensitivkontrollen wurden unmittelbar der stabilisierenden Lösung zugeführt.

Zur Anreicherung der RNA wurde ein Aliquot mit 60 μl Natriumazetat (2 M, pH 4,2) angesäuert und wiederum gut durchmischt. 600 μl wasser-gesättigtes Phenol (pH 4,2 - ICN Biochemicals) und 250 μl einer frisch präparierten Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (50:1; v:v) wurden hinzupipettiert, durchmischt und anschließend sofort für 15min auf Eis gestellt. Hiernach wurden die Proben in einer gekühlten Biofuge R15 der Firma Heraeus ($4^{\circ}\text{C}/15000\text{ rpm}$) für 20min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation

Material und Methoden

befand sich die RNA in der obigen wässrigen Phase, während DNA und Proteine in der Interphase bzw. Phenolphase waren. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert, ohne dabei die Interphase aufzuwirbeln, und in ein neues 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1,25ml kalten Ethanol (100%) überführt. 1ml einer kommerziell erhältlichen Glykogenlösung (20mg/ml, Boehringer Mannheim) wurden als Fällungshilfe hinzugefügt. Die Proben präzipitierten nun für 30min bei -80°C (Kryotech). Eine erneute Zentrifugation für 20min (4°C/13000rpm) schloß sich an. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und der erste Waschschriff mit 1ml eiskaltem Ethanol (70%) schloß sich an. Nach ausgiebiger Durchmischung der Probe wurde sie wiederum für 20min (4°C/13000rpm) zentrifugiert. Der zweite Waschschriff folgte. Im Anschluß an die Zentrifugation wurde erneut der Überstand vorsichtig entfernt und die Proben in der Speed Vac (Savant S.V. Plus+UVS 400A) getrocknet. Ein Pellet war nach der Vakuumzentrifugation nicht einheitlich in allen 2ml-Röhrchen zu erkennen. Die präparierte RNA wurde in 100ml 10mM Tris (ph 7.0) aufgenommen und, sofern nicht unmittelbar revers-transkribiert, bei -80°C tiefgekühlt.

Generell gilt, dass innerhalb der RNA-Extraktion nach jeder Zupipettierung die Probe sorgfältig mittels Vortex durchmischt wurde und nach jeglicher Pipettierung die verwendeten Pipettenspitzen (Aerosol resistant tips-Molecular Bio Products MßP) verworfen wurden. Ferner wurden die Proben während der gesamten Präparation auf Eis behandelt.

3.8.1.2 RNA-Extraktion aus Zellkultur

Zur Optimierung der RT-PCR Bedingungen und zur Herstellung von Positivkontrollen wurde zytoplasmatische RNA aus LNCaP Zellen mittels modifiziertem Proteinase K Verdau nach Maniatis et al isoliert. Für die RNA-Extraktion aus Kulturzellen wurden ca. 10^6 - 10^7 Zellen gewonnen, die, wie unter 3.6.3. beschrieben, geerntet wurden. Die Zellen wurden behutsam bei 4°C und 1000rpm für 5min zentrifugiert und anschließend mit 10ml kaltem PBS-Puffer zweimal repetitiv gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1ml PBS-Puffer aufgenommen und in ein autoklaviertes 2ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und erneut für 30sek bei 14000rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl RNA-Extraktionspuffer aufgenommen.

Der RNA-Extraktionspuffer setzte sich zusammen aus:

0,14	M NaCl (Merck)
1.5	mM MgCl ₂ (Merck)
10	mM Tris-Cl (pH 8.6) (Merck)
0.5	% Nonidet P-40 (NP 40) (Biorad)
1	mM Dithiothreitol
1000	U/ml RNase Inhibitor (Boehringer Mannheim)

Die Probe wurde für 15sek sorgfältig durchmischt (Vortex) und dann für 5min auf Eis gelagert. Das Reaktionsgefäß wurde erneut für 90sek bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein

Material und Methoden

neues Röhrchen transferiert. Das alte Reaktionsgefäß mit dem Pellet, welches aus Debris und Zellkernen besteht, wurde verworfen. Auf den übertragenen Volumen wurden 200µl eines Proteinase Verdauungs-Puffer gegeben.

Zusammensetzung des Proteinase Verdauungs-Puffers:

0,2	M Tris-Cl (pH 8.0) (Merck)
25	mM EDTA (pH 8.0) (Merck)
0,3	M NaCl (Merck)
2	% SDS

Die Probe wurde gut durchmischt und mit Proteinase K mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml versetzt und erneut durchmischt. Der eigentliche Verdau fand nun bei 37°C für 30min statt. Anschließend wurden je 200 µl wassergesättigtes, saures Phenol (pH 4.2) und kaltes Chloroform (Merck) hinzugegeben und für 10min bei 10000rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und erneut mit je 200µl Phenol (pH 4.2) und Chloroform versehen, gevortext und zentrifugiert (10 min; 10000 rpm; RT). Der Überstand wurde anschließend in ein neues Röhrchen mit eiskaltem Isopropanol (100%) transferiert, gut durchmischt und für 30min bei -20°C gelagert.

Als nächstes wurde für 10min bei 10000rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, das überschüssige Isopropanol vorsichtig abpipettiert und das Pellet mit 1ml 70 % Ethanol gewaschen. Eine weitere Zentrifugation schloss sich an (10min; 10000rpm; RT), wonach der Überstand vorsichtig abpipettiert wurde. Zum definitiven Verdampfen des Ethanols wurde die Probe in die Vakuumzentrifuge gestellt, bis keine Spuren des Ethanols mehr zu sehen waren. Das getrocknete Pellet wurde in 200µl H₂O aufgenommen. Verdünnungen der präparierten RNA wurden photometrisch am UV Spektrophotometer (Shimadzu V-160) in ihrer Konzentration bestimmt. Sofern die RNA nicht unverzüglich weiterverarbeitet wurde, lagerte sie bei -20°C.

3.8.2 Maßnahmen zur Vermeidung von RNase-Kontaminationen

Um einen Abbau der RNA durch exogene RNasen zu vermeiden, wurden die folgenden Maßnahmen ergriffen:

Alle Lösungen und Puffer für die Präparation von Zellen und zellulärer RNA wurden mit frischem Aqua ad iniectabilia (Pharmacia & Upjohn) angesetzt und bei 4°C aufbewahrt. Bei allen Arbeitsschritten wurden Einmalhandschuhe und wiederverwendbare Kittel getragen und diese regelmäßig gewechselt. Reaktionsgefäße und Lösungen wurden 2h bei 121°C und 2bar autoklaviert und danach 2h bei 100°C getrocknet. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis bzw. im Kühlraum (Zentrifugation) ausgeführt. Für jegliche Pipettierung wurden RNase- und DNase-freie gestopfte Pipettenspitzen verwendet.

3.8.3 Zusätzliche Reinigung von Nukleinsäuren

3.8.3.1 Phenolextraktionen

Phenolextraktionen wurden zur Deproteinierung von DNA- oder RNA-haltigen Lösungen entsprechend den Angaben in Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

3.8.3.2 Alkoholische Fällungen

Zur zusätzlichen Aufreinigung der Nukleinsäuren wurden diese nach Einstellen eines Salzgehaltes von 0,2 M NaCl oder 0,3 M Natriumacetat aus wässrigen Lösungen durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol oder eines 2,5 x Volumens Ethanol_{abs} ausgefällt. Nach Inkubation bei -20°C über Nacht wurde das Präzipitat abzentrifugiert (14000 rpm, 4°C, 30 min), zweimal mit 70%-igem Ethanol gewaschen, mittels Vakuumzentrifuge (Speed Vac) getrocknet und in 10mM Tris resuspendiert.

3.8.3.3 Präparation von DNA aus Agarose Gelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden DNA-Fragmente mittels des QiaEx-Systems (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers aus Agarose-Gelen extrahiert.

3.8.4 Quantitative und qualitative Analyse der RNA

Um die Reinheit und Menge der aus Zellkultur präparierten RNA zu ermitteln, wurde die RNA-Konzentration im Photometer gemessen (siehe 3.4). Die Intaktheit dieser RNA wurde mittels Gelelektrophorese zusätzlich überprüft. Die Intaktheit der aus Patienten- und Kontrollproben gewonnenen RNA wurde durch eine RT-PCR auf β 2-Mikroglobulin verifiziert. Da die Menge dieser RNA-Präparationen sehr gering war, war sie einer photometrischen Konzentrationsbestimmung nach spektroskopischer Messung oder im Agarosegel nicht zugänglich, so dass auf diese bei der Untersuchung der Patientenproben verzichtet wurde.

3.8.5 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

RNA wurde in 0.7%-igen, DNA-Fragmente unter 1000 bp Länge in 2-4%-igen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Agarosegele wurden in TAE-Puffer mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid angesetzt. Dazu wurde die Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen, mit der entsprechenden Menge an TAE-Puffer mit 0,5µg/ml Ethidiumbromid aufgefüllt und durch Erhitzen in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach Abkühlung unter 55°C wurden die Gele gegossen und nach Verfestigung in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die Proben wurden in Ladepuffer aufgenommen, für 5 min auf 65°C erhitzt, schnell auf Eis abgekühlt und in die Probentaschen des Gels pipetiert. Die Horizontal-Elektrophorese von RNA erfolgte für ca 4-5 h bei einer Feldstärke von 3-4 V/cm, von DNA für 1-2 h bei einer Feldstärke von 6-7 V/cm Elektrodenabstand. Auf einem UV-Transilluminator läßt das interkalierende Ethidiumbromid die Nukleinsäuren orange-rot aufleuchten, so dass sie mit einer Sofortbildkamera dokumentiert werden konnten. Bei DNA-Elektrophoresen wurden als Größenstandards Restriktions-Verdauungen des Bacteriophagen Lambda mit HindIII oder des Plasmidvectors Bluescript Bpt+KS (Stratagene) mit HaeIII verwendet (siehe Tab.3).

Tab. 3 Restriktionsfragmentlängen der verwendeten Standards

λ-Hind III (bp)	Bpt + KS / HaeIII (bp)
23130	605
9416	458
6557	434
4361	293
2322	267
2027	243
564	174
125	142
	102
	80
	79
	58
	18
	11

3.9 Assaydesign - Aufbau und Durchführung des PCR-assay zum Nachweis PSA- exprimierender Zellen

Zum Nachweis der für PSA kodierenden mRNA wurde eine Reverse-Transkriptions-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt, bei der die mRNA innerhalb der reversen Transkription zuerst in cDNA umgeschrieben und diese in der PCR amplifiziert wird. Hierfür wurde ein antisense-Oligonukleotid synthetisiert (siehe 3.9.1), welches als Ansatzpunkt für die reverse Transkriptase dient und auch folgend für die PCR eingesetzt werden konnte.

Material und Methoden

Zu Anfang wurden die Bedingungen für die PCR, wie Konzentration der Reaktionskomponenten (d.h. Primer, Enzym, $MgCl_2$, dNTPs), Temperaturprofil und eingesetzte Probenmenge, optimiert. Anschließend wurde die maximale Empfindlichkeit bzw. die minimale noch nachweisbare Menge an zellulärer RNA (gewonnen aus der PSA-positiven Zelllinie LNCaP, siehe 3.7.2) in Verdünnungsexperimenten ermittelt. Zur Steigerung der Empfindlichkeit wurde eine zweite, sogenannte "nested" PCR durchgeführt. Hierbei wird mit internen - sogenannten "nested" - Primern, die zwischen den beiden in der ersten PCR verwendeten Primern liegen, das PCR-Produkt der ersten PCR reamplifiziert. Die PCR-Produkte wurden dann in Agarosegelen überprüft und zum Spezifitätsnachweis exemplarisch enzymatisch verdaut, hybridisiert und sequenziert. Bei jeder PCR wurden sowohl Sensitiv-, als auch Negativkontrollen durchgeführt.

3.9.1 Auswahl und Herstellung der Oligonukleotidprimer

Voraussetzungen für einen molekularbiologischen PSA-mRNA Nachweis

Mehrere Aspekte haben eine wesentliche Bedeutung für das Design eines molekularbiologischen Assays durch RT-PCR-gestützte spezifische Amplifikation:

1. die hohe Homologie innerhalb der Kallikrein-Familie erfordert eine sorgfältige Primerauswahl, um die PSA-Spezifität zu sichern.
2. Die Primerbindungsstellen sollten in Bereichen gewählt werden, für welche keine Sequenzuntimmigkeiten zwischen den Publikationen bestehen, vor allem weil nicht endgültig geklärt ist, inwieweit allelische Varianz oder auch Sequenzartefakte diesen Unterschieden zugrunde liegen.
3. Innerhalb der genomischen Sequenz, wie auch innerhalb der cDNA, sind einige charakteristische Restriktionsstellen vorhanden, welche genutzt werden können, um die Spezifität der amplifizierten Sequenz von PCR-Produkten anderer mRNAs der Genfamilie abzugrenzen, sofern diese innerhalb der Amplifikation entstehen.
4. Die Positionen der Primer müssen durch mindestens eine nicht-kodierende Sequenz (Intron) getrennt sein, um eine mRNA-Amplifikation von einer Amplifikation hochmolekularer RNA oder genomischer DNA zu differenzieren.
- 3 Die Primerpositionen müssen in einem Bereich der mRNA liegen, der nicht alternativem *Splicing* unterliegt, um jegliche PSA mRNA-Variante zu erfassen.

Spezifische Oligonukleotide für humanes PSA wurden korrespondierend zu den veröffentlichten Sequenzdaten ausgewählt (Lundwall Ä, et al. 1987). Die Primer wurden unter der Vorgabe ausgewählt, in Abschnitten mit geringer Homologie zu anderen Kallikreinen, wie das pankreatisch-renale Kallikrein

Material und Methoden

(KLK-2) und das humane glanduläre Kallikrein (KLK-1), zu hybridisieren. Die eingesetzten Oligonukleotide müssen weiterhin in verschiedenen Exons der PSA-Gensequenz binden, so dass eine Differenzierung zwischen einem PCR Produkt genomischer Herkunft mit amplifiziertem Intron und einem PCR Produkt aus der kürzeren PSA-cDNA möglich ist.

Abb.3: Primersites und Vergleich von PSA (KLK3) und hgk-1 (KLK2)

1 ATGTGGGTCC CGGTTGTCTT CCTCACCTG TCCGTGACGT GGATTGGTGC
 1 ATGTGGGACC TGGTTCTCTC CATCGCCTTG TCTGTGGGGT GCACTGGTGC

Exon2 → U23 → Exon2

51 TGCACCCCTC ATCCTGCTCTC GGATTGTGGG AGGCTGGGAG TCCGAGAAGC
 51 CGTGCCCTC ATCCAGTCTC GGATTGTGGG AGGCTGGGAG TGTGAGAAGC

U46 → Exon2

101 ATTCCAACC CTGGCAGGTG CTTGTGGCCT CTCGTGGCAG GGCAGTCTGC
 101 ATTCCAACC CTGGCAGGTG GCTGTGTACA GTCATGGATG GGCACACTGT

151 GCGGGTGTTC TGGTGCACCC CCAGTGGGTC CTCACAGCTG CCCACTGCAT
 151 GGGGGTGTCC TGGTGCACCC CCAGTGGGTC CTCACAGCTG CCCATTGCCT

→ Exon3 Exon3 →

201 CAGGAACAAA AGCGTGATCT TGCTGGGTCG GCACAGCCTG TTTATCCTG
 201 AAAGAAGAAT AGCCAGGTCT GGCTGGGTCG GCACAACCTG TTTGAGCCTG

251 AAGACACAGG CCAGGTATTT CAGGTCAGCC ACAGCTTCCC ACACCCGCTC
 251 AAGACACAGG CCAGAGGGTC CCTGTCAGCC ACAGCTTCCC ACACCCGCTC

Clal rev. comp. L282

301 TACGATATGA GCCTCCTGAA GAATCGATTCTCAGGCCAG GTGATGACTC
 301 TACAATATGA GCCTTCTGAA GCATCAAAGC CTTAGACCAG ATGAAGACTC

351 CAGCCACGAC CTCATGCTGC TCCGCCTGTC AGAGCCTGCC GAGCTCACGG
 351 CAGCCATGAC CTCATGCTGC TTCGCCTGTC AGAGCCTGCC AAGATCACAG

rev. comp. L358

401 ATGCTGTGAA GGTCTGGAC CTGCCCACCC AGGAGCCAGC ACTGGGGACC
 401 ATGTTGTGAA GGTCTGGGC CTGCCCACCC AGGAGCCAGC ACTGGGGACC

Exon4 →

451 ACCTGCTACG CCTCAGGCTG GGGCAGCATT GAACCAGAGG AGTTCTTGAC
 451 ACCTGCTACG CCTCAGGCTG GGGCAGCATC GAACCAGAGG AGTTCTTGCG

501 CCCAAAGAAA CTTCAAGTGTG TGGACCTCCA TGTTATTTCC AATGACGTGT
 501 CCCAGGAGT CTTCAAGTGTG TGAGCCTCCA TCTCCTGTCC AATGACATGT

551 GTGCGCAAGT TCACCCTCAG AAGGTGACCA AGTTCATGCT GTGTGCTGGA
 551 GTGCTAGAGC TTAATCTGAG AAGGTGACAG AGTTCATGTT GTGTGCTGGG

601 CGCTGGACAG GGGGCAAAAG CACCTGCTCG GGTGATTCTG GGGGCCCACT
 601 CTCTGGACAG GTGGTAAAGA CACTTGTGGG GGTGATTCTG GGGGTCCACT

651 TGTCTGTAAT GGTGTGCTTC AAGGTATCAC GTCATGGGGC AGTGAACCAT
 651 TGTCTGTAAT GGTGTGCTTC AAGGTATCAC ATCATGGGGC CCTGAGCCAT

701 GTGCCCTGCC CGAAAGGCCT TCCCTGTACA CCAAGGTGGT GCATTACCGG
 701 GTGCCCTGCC TGAAAGGCCT GCTGTGTACA CCAAGGTGGT GCATTACTGG

751 AAGTGGATCA AGGACACCAT CGTGGCCAAC CCCTGA
 751 AAGTGGATCA AGGACACCAT CGCAGCCAAC CCCTGA

1: Homo sapiens kallikrein 3, (prostate specific antigen) (KLK3), mRNA; medline acc# NM_001648
 2: Homo sapiens kallikrein 2, prostatic (KLK2), mRNA; medline acc# XM_031757

Material und Methoden

Von cDNA-Klonierungsstudien und Northern-Blot Analysen ist bekannt, dass PSA-mRNA in sieben alternativ 'gesplitten' Formen auftreten kann, wobei alle Unterschiede in der Basensequenz die Genabschnitte zwischen Exon 3 und 5 betreffen. Von dreien dieser Varianten ist die Basensequenz bekannt (Riegman, et al. 1988).

Die Primer liegen in Abschnitten der PSA-mRNA, welche die Information für die Exons zwei und drei tragen, und überspannen ein Intron von 1682bp). Das amplifizierte PSA PCR Amplicon enthält eine spezifische Restriktionschnittstelle für Cla I, welche sich nicht bei den anderen hoch homologen Kallikreinen findet. Ferner enthält das 1919 bp große genomische Korrelat eine Restriktionsschnittstelle für Pst-I (CTGCA'G), so dass ein schneller Spezifitätsnachweis mittels Restriktionsverdau für beide amplifizierten Sequenzen durchgeführt werden konnte.

Die Primer wurden nach der "Phosphoramidite Procedure" (Caruthers, et al. 1988) auf einem Gene Assembler Plus (Pharmacia/LKB, Freiburg) ausschließlich unter Verwendung von Reagenzien der Firma Pharmacia synthetisiert. Nach der Synthese wurden sie entsprechend der Bedienungsanleitung mittels 37%-igem Ammoniak abgekoppelt und Ausschlusschromatographie über einer Sephadex G25 Säule (NAP-5, Pharmacia) entsalzt und gereinigt. Die Oligonukleotide wurden in Natriumphosphatpuffer (10mM pH6.8) aufgenommen. Die Konzentration der Oligonukleotide wurde photometrisch bestimmt (s. 3.3). Die Primer wurden auf Konzentration von 20µM und 15µM verdünnt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt. Biotinylierte Primer, die für Fragestellungen am ES 300 (boehringer Mannheim) eingesetzt wurden, wurden bei MWG-Biotech zur Synthese und HPLC-Reinigung angefordert.

PSA-spezifische Oligonukleotidprimer:

U 23: 5'-TCGGA TTGTG GGAGG CTGGG AGT-3'

L 358: 5'-GGGCA GGTCC ATGAC CTTCA TAG-3'

U 46: 5'-GCAGG TGCTT GTAGC CTCTC GT-3'

L 282: 5'-GAGTC ATCAC CTGGC CTGAG GAA-3'

U203: 5'-TGAAG ACACA GGCCA GGTAT TTCAG-3'



Abb.4: Darstellung der in der RT-nested-PCR amplifizierten Sequenz: Beige unterlegt die Sequenzen der Primer der I. PCR; blau unterlegt die der nested-PCR; rot unterlegt die Restriktionsstchnittstelle von Cla-I zum spezifischen Nachweis

Für die Versuchsreihen am ES-300 wurden folgende Oligonukleotide synthetisiert:

- D0: 5'- CT-GCA-TCA-GGA-ACA-AAA -3' = 17 mer (D0)
- D1: 5'- CAC-TGC-ATC-AGG-AAC-AAA-AG -3' = 20 mer
- D2: 5'- CCC-ACT-GCA-TCA-GGA-ACA-AAA-G -3' = 22 mer
- D3: 5'- CTA-CCC-ACT-GCA-TCA-GGA-ACA-AAA-G-3' = 25 mer

Die Oligonukleotide überspannen die Grenze zwischen Exon 2 und 3 der PSA-cDNA in unterschiedlichen Längen.

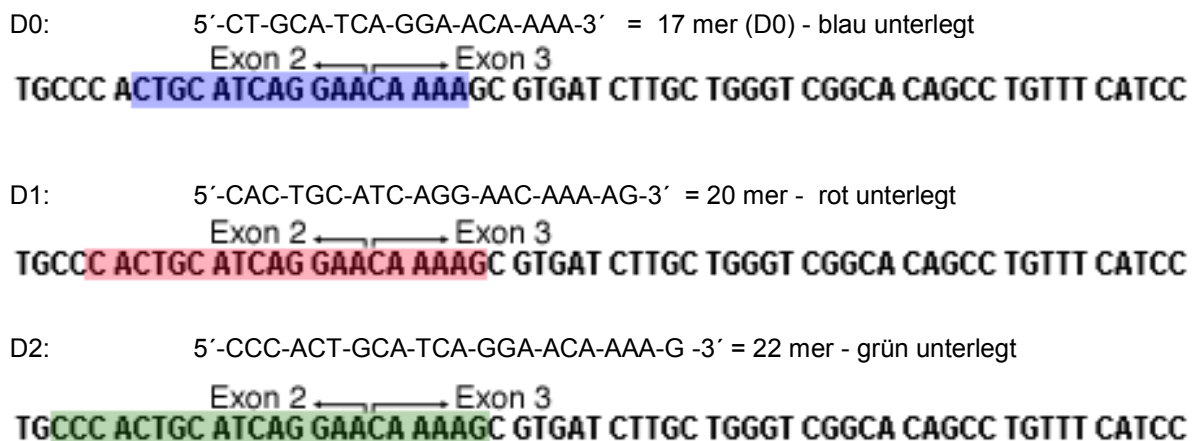


Abb.5: Schematische Darstellung der Exon 2 und 3 überspannenden Oligonukleotide innerhalb eines Ausschnitts der amplifizierten Sequenz

3.9.2 Amplifikation von Nukleinsäuren - Durchführung der RT-nested PCR

3.9.2.1 Reverse Transkription

Die RT-PCR (siehe Protokoll 1, folgende Seite) wurde in dünnwandigen 0,2ml Reaktionsgefäßen der Firma Biozym durchgeführt. Für die reverse Transkription wurde SuperScript™ reverse Transkriptase (Gibco BRL) eingesetzt, welcher eine RNase-H-Aktivität gänzlich fehlt. Bevor die einzelnen Reaktionskomponenten zusammengegeben wurden, wurde das Oligonukleotid L358 für 5min bei 65°C erwärmt, um intra- und intermolekulare Sekundärstrukturen des Primers zu verhindern, und anschließend unmittelbar auf Eis gestellt. Die RNA wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut. Nach Kennzeichnung der Proben wurde je 1µl Primer L358 (15µM) und 10µl der zu untersuchenden Probe (RNA bzw. H₂O) hinzupipettiert. Das Gemisch wurde zur Vermeidung von Kondensationseffekten mit 1 Tropfen Mineral Oil (Sigma, Deisenhofen) überschichtet, für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt. Die restlichen Komponenten (9µl/Reaktion) wurden als Master-Mix-Ansatz als entsprechendes Vielfaches der benötigten Ansätze zusammenpipettiert und dann durch das Mineralöl auf die einzelnen Reaktionsgefäße verteilt. Die reverse Transkription wurde in einem Minicycler der Firma MJ Research durchgeführt.

Protokoll 1:

RT-Protokoll:

L 358 für 5min bei 65°C erhitzen

1 µl Primer L358 (20 µM)

10 µl Probe (RNA bzw. H₂O)

10min im Minicycler bei 70°C - anschließend sofort auf Eis

4 µl 5 x SuperScript RT-Puffer

1 µl dNTPs (10 mM)

1 µl SuperScript™ reverse Transkriptase

1 µl H₂O

2 µl DTT

20 µl Reaktionsansatz

Der fertige Reaktionsmix wurde kurz anzentrifugiert und für 50min 42°C folgend

für 15min 70°C inkubiert

Die Proben konnten nun entweder bei –20°C tiefgefroren werden oder umgehend der I. PCR zugeführt werden.

3.9.2.2. I. PCR (PSA 1)

Der komplette 20µl Reaktionsansatz der reversen Transkription wurde in die erste PCR (siehe Protokoll 2, folgende Seite) übernommen, wobei die Reaktion im selben dünnwandigen 200µl Reaktionsgefäß (Biozym) durchgeführt wurde. Der PCR-Lauf erfolgte in 25 Zyklen mit den angegebenen Zeit-Temperaturprofil in einem Thermocycler (MJ Research). Bevor die einzelnen Reaktionskomponenten zusammengegeben wurden, wurden die Primer L358 und U23 für 5min bei 65°C erhitzt und anschließend unmittelbar auf Eis gestellt. Nach der reversen Transkription wurde der RT-Ansatz ebenfalls auf Eis gestellt und der PCR-Mix unter das Öl dazupipettiert. Zur Amplifikation wurden die Proben solange auf Eis gehalten, bis der Thermocycler 95°C erreicht hatte, und erst dann in den PCR-Block gestellt. Im letzten Zyklus wurde der Syntheseschritt auf 10min ausgedehnt, um unvollständige Syntheseprodukte zu vervollständigen.

Protokoll 2:

I.PCR-Reaktion (PSA 1):

Mastermix: 21.5µl H₂O
3µl MgCl₂
2,5µl 20 x Tfl-Puffer
2µl dNTP's (10 mM)
0,5µl U 23 (15 µM)
0,5µl L358 (15 µM)
2µl Tfl-Polymerase
20µl RT-Ansatz
50µl PCR-Reaktionsansatz

PCR-Protokoll:

1. 95°C – 5min
2. Denaturierung: 95°C – 1min
3. Annealing: 57°C – 1min
4. DNA-Synthese: 72°C – 1 min
5. Wieder zu Schritt 2. für 25 Zyklen
6. DNA-Synthese: 72°C – 10 min

Die PCR-Ansätze wurden bei –20°C gelagert oder umgehend der nested-PCR zugeführt. Für die Denaturierung der doppelsträngigen Amplicons innerhalb der PCR ist entscheidend, dass im PCR-Tube eine effektive Temperatur von 95°C erreicht wird. Die Temperatur innerhalb der Reaktionsgefäße wurde mit einer Temperatursonde in einem Tube im Heizblock kontrolliert.

3.9.2.3 "Nested" PCR

Für die nested-PCR (Protokoll 3, siehe folgende Seite) wurden als Reaktionsgefäß wiederum ultra-dünnwandige 200µl-PCR-Tubes (Biozym) verwendet, und wie bei der ersten PCR und der reversen Transkription wurden die Primer der nested-PCR L282 und U46 für 5min bei 65°C erhitzt und anschließend unmittelbar auf Eis gestellt. Als letzter Schritt der Pipettierung zur Durchführung der nested-PCR wurden 2,5µl des ersten Ansatzes durch die Mineralölschicht direkt zum nested-PCR-Ansatz zugegeben. Auch hier wurden zur Amplifikation die Proben so lange auf Eis gehalten, bis der Thermocycler 95°C erreicht hatte, und erst dann wurde der Thermocycler (MJ Research) bestückt.

Protokoll 3:

<u>II.PCR-Reaktion (PSA 2):</u>	<u>PCR-Protokoll:</u>
Mastermix: 35µl H ₂ O	1. 95°C – 5min
4µl MgCl ₂ (25 mM)	2. Denaturierung: 95°C – 1min
5µl 10 x Taq-Puffer	3. Annealing: 58°C – 1min
2µl dNTP's (10 mM)	4. DNA-Synthese: 72°C – 1 min
0,5µl U 46 (20 µM)	5. Wieder zu Schritt 2. für 30 Zyklen
0,5µl L282 (20 µM)	6. DNA-Synthese: 72°C – 10 min
0,5µl Taq-Polymerase (5 U/ µl)	
2,5µl aus PSA-I-PCR	
50µl PCR-Reaktionsansatz	
und 1 Tropfen (ca. 50 µl) Mineralöl	

Die nested-PCR hatte 30 Zyklen und, wie in der ersten PCR, einen Syntheseschritt von 10min nach dem letzten Zyklus. Jedes Experiment enthielt folgende Kontrollen in Parallelansätzen, um die Interpretierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten:

In jeder RT-PCR wurde RNA von Verdünnungen von 10 bzw. 1 LNCaP-Zelle(n)/ml K-EDTA Blut als Sensitivkontrollen eingesetzt. Als Negativkontrollen dienten Ansätze ohne RNA bzw. mit RNA aus peripherem Blut gesunder Freiwilliger oder aus MDA-231 Mammakarzinomzellen. Ferner wurde in jeder PCR mindestens eine Wasserkontrolle mitgeführt, um Kontaminationen durch Amplicons zu kontrollieren.

3.9.2.4. Nachweis der PCR-Produkte

Der Nachweis der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese (s. 3.8.5). Um zwischen unterschiedlich großen Fragmenten aus erster und zweiter PCR auch im Minigel (6.3x10 cm) differenzieren zu können, wurden 4%-ige Nu Sieve Agarosegele (Biozym) eingesetzt. Für die Auswertung einer einfachen PCR wurde die DNA-Agarose verwendet. Der Spezifitätsnachweis erfolgte mittels Restriktionsverdau, Southern-Blot-Hybridisierung oder Sequenzierung (s.u.).

3.9.3 Qualitätskontrolle

3.9.3.1 Aspekte der Qualitätskontrolle in der PCR

Bei der Beurteilung von Resultaten aus PCR-Assays sind, wie bei anderen Laborbefunden auch, Aspekte der Validität des Tests zu beachten, welche in vier Bereiche eingeteilt werden können:

- Klinik und Krankengeschichte
- Logistik
- Präanalytik
- Analytik

Es galt, die Aspekte der ersten Gruppe zu dokumentieren und Aspekte der zweiten bis vierten weitestgehend zu standardisieren.

Klinik und Krankengeschichte

Dieser Unterpunkt umfaßt die prä- oder postoperative Situation des Patienten zum Zeitpunkt der Probenentnahme und eine eventuell gleichzeitig stattfindende medikamentöse Therapie, z.B. mit Antikneurogenen. Das Tumorstadium des Patienten und dementsprechend das potentielle metastatische Stadium des Patienten, aber auch des Untersuchungsmaterials sind in dieser Gruppe als Unterpunkte zu erwähnen. Eventuelle Voroperationen und vor allem das zeitliche Intervall zum Operationstermin sind weiterhin entscheidende Punkte, die die Aussage des Assays beeinflussen bzw. definieren können.

Logistik

Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Um die Kontamination von PCR-Ansätzen mit PCR-Produkten, sogenannten "Amplicons", aus vorherigen PCR-Analysen zu vermeiden, wurde die Auswertung der PCR strikt von der Probenaufbereitung und Vorbereitung der PCR getrennt. Dies beinhaltete neben der räumlichen auch die strenge Trennung von Arbeitsgerät und -materialien. Ausrüstung, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien waren für die PCR-Diagnostik reserviert und durften die definierten Räumlichkeiten der PCR-Schleuse nicht verlassen. Selbst die Anlieferung der beschriebenen Materialien erfolgte gesondert und unter Umgehung späterer Arbeitsplätze.

Innerhalb dieses Raumkonzepts wurde es vermieden, bereits amplifizierte Proben in die Räumlichkeiten zu bringen, in denen die Aufbereitung der Blutproben und der RNA stattfand. Alle Reagenzien

Material und Methoden

wurden vor Gebrauch in der PCR überprüft, aliquotiert und in separaten Tiefkühlschränken aufbewahrt. Pipettenspitzen wurden nach jedem Pipettierschritt gewechselt, und für alle Pipettierschritte mit Nukleinsäuren wurden aerosol-dichte, DNase und RNase-freie Pipettenspitzen (Biozym) benutzt. Die PCR-Ansätze wurden unter sterilen Zellkulturbänken (Gelaire TC48; Flow, Meckenheim) mit vertikalem Luftstrom pipettiert, die abschließend gereinigt und mit UV-Licht bestrahlt wurden. Für das Überpipettieren des ersten PCR-Gemisches in den zweiten Ansatz stand eine separate Sterilwerkbank zur Verfügung, die für keinen anderen Schritt dieser Arbeit genutzt wurde. Auch hierbei wurden aerosol-dichte Pipettenspitzen eingesetzt und direkt in ein Gefäß mit 10%-igem Natriumhypochlorid abgeworfen.

Präanalytik

Sie umfaßt die Vorbereitung des Patienten zur Probenentnahme, die Materialentnahme selbst und die Weiterbehandlung der Probe bis zum analytischen Teilschritt. Die präanalytische Phase fällt zum einen in den Aufgabenbereich des Stationsarztes/der Stationsschwester bzw. des ambulant tätigen Arztes, zum anderen in den Tätigkeitsbereich des Laboratoriumsarztes/ MTA.

Die präanalytische Phase beinhaltet:

- Die Vorbereitung des Patienten. Sie ist abhängig von der Art des zu gewinnenden Untersuchungsmaterials (z.B. Knochenmark oder peripheres Blut) und dem angeforderten Analyten
- Den Abnahmemodalitäten (technischen Ablauf der Probenentnahme), wobei eine Standardisierung der Abnahmetechnik Voraussetzung ist. Ein Fehler, welcher in diese Rubrik fallen würde, ist neben einer unzureichenden Durchmischung der Probe z.B. eine operative oder biopsische Manipulation der Prostata unmittelbar vor Probenentnahme.
- Den "Sampling error"- die Verwechslung bzw. falsche Kennzeichnung der zu untersuchenden Probe auf der Station oder im Labor
- Den Probentransport. Der Probentransport muß so erfolgen, dass die Analysenergebnisse nach dem Transport die gleichen sind wie unmittelbar nach der Probengewinnung.
- Das Probenalter und die Aufbewahrung der Probe. Die Probe wurde nicht unmittelbar der RNA-stabilisierenden Lösung zugeführt bzw. wurde zu lange nach Zuführung bei Raumtemperatur stehengelassen.
- Die Kenntnis und die Beachtung von Einflußgrößen und Störfaktoren. Einflußgrößen sind hier als Ereignisse zu verstehen, welche in vivo Veränderungen des zu bestimmenden Analyten verursachen und unabhängig vom Analyseverfahren sind.

Störfaktoren führen in vitro nach Entnahme der Probe zu einem Meßergebnis, welches nicht der in vivo-Konzentration des Analyten entspricht (z.B. das Antikoagulanz Heparin als appliziertes Medikament

oder als Gerinnungshemmer im Abnahmeröhrchen - ein Faktor, welcher eine inhibierende Wirkung auf die Enzyme der PCR ausübt).

Analytik

Die Analytik beinhaltet zum einen die eigentliche Bestimmung des Analyten, zum anderen die Beurteilung der Leistungsfähigkeit der angewandten Analysenmethoden. RT-PCRs, die die Expression von gewebsspezifischen Markern in peripherem Blut oder im Knochenmark untersuchen, sind bis heute noch im experimentellen Stadium. Dennoch gilt auch hier, dass die Validität der PCR-Ergebnisse von folgenden Punkten abhängt:

- Die Protokollstandardisierung: d.h. Vorbehandlung und Durchführung müssen von Probe zu Probe einheitlich behandelt werden (z.B. für die hier beschriebene RT-PCR: alle Proben werden derselben RNA-Extraktionsmethodik zugeführt und gleiche Volumina präparierter Nukleinsäuren werden in den Assay eingesetzt). Ferner müssen Präparationsfehler, welche als zufällige oder systematische Fehler innerhalb der RNA-Präparation auftreten können, durch Sensitivkontrollen klar erkennbar sein. Kontaminationen durch Amplicons müssen durch gleichzeitig untersuchte, sichere Negativkontrollen auszuschließen sein.
- Die Assaystabilität (Validitätseinschränkung durch "drop outs") und Standardisierung der Amplifikation: Ausfälle in den eigentlichen Reaktionen des Assays (RT und PCR), welche trotz intakter und amplifizierbarer RNA stattfinden, müssen nachweisbar sein. Diese "drop outs" - Ereignisse sind u.a. durch Substanzen wie Fe^{2+} oder Heparin, die die reverse-Transkriptase oder die DNA-Polymerase inhibieren, erklärbar.

3.9.3.2 Kontroll-PCR

Als interne Kontrolle für die Amplifizierbarkeit der gewonnenen RNA wurde ein PCR-Assay für $\beta 2$ -Mikroglobulin, wie unter Protokoll 4 beschrieben, durchgeführt. Da dieses Protein von MHC-I-Komplex tragenden Zellen exprimiert wird, erschien es geeignet als Testsystem für die Integrität und Amplifizierbarkeit der aus Blut- oder Knochenmarkszellen gewonnenen RNA. Zur Amplifikation des $\beta 2$ -Mikroglobulin-Signals wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

M1 : 5'- CCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCA -3'

M2 : 5'- GGAGCAACCTGCTCAGATACATCAAACATGG -3'

Der Ansatz und die Durchführung der reversen Transkription entsprachen bis auf das verwendete Oligo M2 für die RT-Reaktion der reversen Transkription der PSA-RT-PCR. Um ein eindeutiges Signal aus 10 μl RNA zu erhalten, wurde die PCR bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

Protokoll 4:

<u>PCR-Reaktion (β_2M):</u>	<u>β_2M-PCR-Protokoll:</u>
Mastermix:	
21,5 μ l H ₂ O	1. 95°C – 5min
3 μ l MgCl ₂	2. Denaturierung: 95°C – 1min
2,5 μ l 20 x Tfl-Puffer	3. Annealing: 65°C – 1min
2 μ l dNTP's (10 mM)	4. DNA-Synthese: 72°C – 1 min
0,5 μ l M1 (15 μ M)	5. Wieder zu Schritt 2. für 35 Zyklen
0,5 μ l M2 (15 μ M)	6. DNA-Synthese: 72°C – 10 min
2 μ l Tfl-Polymerase	
<u>20μl RT-Ansatz</u>	
50 μ l PCR-Reaktionsansatz	

Die single-step β_2 -Mikroglobulin-PCR umfaßte 35 Zyklen. Für die verwendeten spezifischen Oligonukleotide wurde eine Annealing-Temperatur von 65°C am PCR-Gerät eingestellt.

3.10 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

3.10.1 Restriktionsverdau der PCR-Produkte

Um in kurzer Zeit die Spezifität der erhaltenen PCR-Produkte nachweisen zu können, wurden diese mittels Restriktionsendonukleasen enzymatisch, wie in Protokoll 5, verdaut. Dazu wurden je 15µl des PCR-Reaktionsansatzes in folgenden Verdauansatz eingesetzt:

Protokoll 5:

<u>Restriktionsverdau:</u>	<u>Protokoll:</u>
20 µl zu verdauende DNA (PCR-Produkt)	60min 37°C
2 µl 10 x Reaktionspuffer	2min 65°C
2 µl 0,1 % (w/v) BSA	
1 µl Restriktionsendonuklease (5-10 U/µl)	

Der Ansatz wurde üblicherweise nach Reaktionsablauf und nach Aufnahme in Ladebuffer auf einem 4%-igen Agarosegel analysiert. Reaktionspuffer wurden in der Regel von den Herstellern mitgeliefert und enthielten in einigen Fällen schon acetyliertes BSA, wodurch dessen Zugabe entfiel.

3.10.2 DNase-Verdau

Bei einigen Fragestellungen, zum Beispiel zur Abklärung fraglicher Kontaminationen in RNA-Proben, wurden diese vor der Amplifikation mit RNase-freier DNase (Boehringer, Mannheim) versetzt und 5min auf 37°C inkubiert. Im Anschluß daran wurde die Probe auf 72°C für 10min erhitzt, um die DNase wieder zu denaturieren, da sie sonst die in der folgenden reversen Transkription entstehende cDNA verdauen, und somit einen sensitiven Nachweis behindern würde. Während der Abarbeitung der zu untersuchenden Patientenproben wurde hierauf verzichtet.

3.10.3 Markierung von Gensonden

3.10.3.1 Markierung von Oligonukleotiden

Zur spezifischen Hybridisierung mit den PCR-Produkten wurde ein internes Oligonukleotid U-203 am 5'- Ende durch Phosphorylierung radioaktiv markiert (Protokoll 6). Der Markierungsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Protokoll 6:

Markierungsansatz:

x µl Oligonukleotid U-203 (50-500 ng)	<u>10 x Kinase-Puffer:</u>
1 µl 10 x Kinase-Puffer	0,7 M Tris-HCl, pH 7,6
2 µl $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (6000 Ci/mmol)	0,1 M MgCl_2
1 µl T4 Polynukleotid Kinase (10 U/µl, NEB)	0,05 M DTT
y µl ddH ₂ O ad 10 µl	

Die Inkubation erfolgte für 45min bei 37°C. Nach Zugabe von 2µl Hefe-tRNA (27,5mg/ml) und 2µl 0,1M EDTA wurde die Reaktion gestoppt und der Ansatz über Sephadex G50 Säulen (Nick columns, Pharmacia) gemäß den Angaben des Herstellers gereinigt. Danach wurde die spezifische Aktivität in einem Szintillationszähler ermittelt (3.2); sie betrug im Durchschnitt $1\text{-}2 \times 10^9$ cpm/µg eingesetzter DNA.

3.10.3.2 Digoxigenierung von Oligonukleotiden

Zur Digoxigenierung von PSA-spezifischen Oligonukleotiden wurde das Digoxigenierungs-Tailing-Kit von Boehringer Mannheim, wie unter Protokoll 7 beschrieben, verwendet.

Protokoll 7:

8 µl Reaktionspuffer
8 µl CoCl
x µl (bei einer Digoxigenierung wurden 200pmol Oligonukleotid eingesetzt)
2 µl Dig dUTP
2 µl dATP
2 µl Terminale Transferase
mit H₂O bidest. auf 40 µl auffüllen
15min bei 37°C inkubieren, dann auf Eis stellen
zum Stoppen der Reaktion 4µl der Stopping-solution dem Reaktionsansatz zuführen - ferner 5µl 4M LiCl
150µl eiskaltes Ethanol (100%) hinzupipettieren und anschließend für 30min bei -80 °C lagern
Zentrifugation für 20min bei 14000rpm in Eppendorf-Zentrifuge und Waschung mit 70%-igem Ethanol-Überstand vorsichtig abpipettieren und in Speed-Vac trocknen-abschließend in 100µl H₂O aufnehmen

Stopping-solution: 1µl einer Glykogenlösung (20mg/ml, Boehringer Mannheim) auf 0,2ml 0,2 M EDTA pH8,0

3.11 Southern Blot Analysen

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurden diese für den Einsatz in Hybridisierungsexperimente nach einer von Southern (1975) entwickelten Methode auf Nylonmembranen (Genescreen plus) transferiert. Die Agarosegele wurden nach der Elektrophorese, wie in Protokoll 8, beschrieben, behandelt:

Protokoll 8:

Vorbehandlung der Gele:

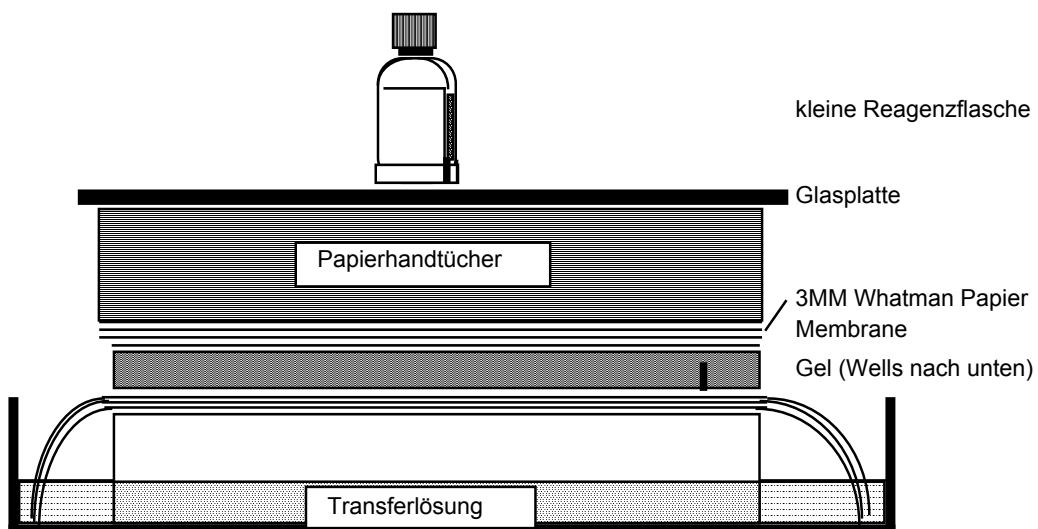
Depurinierung: 15min in 0,25 M HCl

Denaturierung: 2 x 15min in 0,4 M NaOH/0,6 M NaCl

Äquilibration: 30min in 0,5 M Tris-HCL/1,5 M NaCl

Der Aufbau des Systems zum Kapillartransfer sah wie in Abb. 6 dargestellt aus, der Transfer erfolgte mit 10x SSC über Nacht.

Abb.6: Aufbau des Systems für den unidirektionalen Southern Blot Transfer



Um einen luftblasenfreien Zusammenbau des Systems zu erleichtern, wurden die Nylonfolie und Filterpapiere vor Gebrauch in Transferlösung (10xSSC) getaucht. Nach dem Transfer (über Nacht, RT) wurde die Membran zur vollständigen Denaturierung der DNA kurz in 0,4 N NaOH getaucht und dann auf Filterpapier luftgetrocknet. Nach diesem Schritt wurden die Folien prähybridisiert (siehe 3.11.1).

3.11.1 Sequenzspezifische Hybridisierungen - Hybridisierung mit Oligonukleotiden

Oligonukleotid-Hybridisierungen erfolgten mittels Rapid Hybridisation Buffer (Amersham, Braunschweig) nach den Angaben des Herstellers. Die Blockierung der Membranen (Prähybridisierung) erfolgte für 30-60min in einem Hybridisierungssofen mit Hybridisierlösung in einem Volumen, das eine gleichmäßige Benetzung aller Membranen ermöglichte. Nur in Ausnahmefällen, in denen ein geringes Volumen an Hybridisierungslösung zur Verfügung stand (Große Folien, geringe spezif. Aktivität der Probe), wurde der radioaktive Hybridisierungsansatz in Plastikbeutel luftblasenfrei eingeschweißt und unter feuchten Papiertüchern im Schüttel-Wasserbad inkubiert. Nach der Prähybridisierung wurde die Lösung durch Zugabe entsprechender Volumina der radioaktiven Sonde auf eine spezifische Aktivität von $0,5-1 \times 10^6$ cpm/ml eingestellt. Gewaschen wurde immer in 1xSSC/0,1% SDS(w/v) 2x15min bei RT, gefolgt von einem 2. Waschschrift bei 42°C. Waren weitere Waschschrte bei höheren Temperaturen erforderlich, so erfolgten sie in 2°C-Schritten. Im Anschluß an den Waschvorgang wurden die Filter in Klarsichtfolie eingeschweißt, bei RT oder -70°C zwischen Verstärkerfolien autoradiographiert (1-24 h) und automatisch entwickelt.

3.12 Sequenzierung des PCR-Produktes

Als weiterer spezifischer Nachweis wurde unter Verwendung des ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit das PCR-Produkt (siehe Protokoll 9) sequenziert.

Protokoll 9:

I. Aufreinigung des PCR-Produktes:

- ca. 100µl PCR-Produkt und 2ml H₂O auf eine Amicon 100 Filter geben
- Zentrifugation bei 2000rpm in Eppendorf-Zentrifuge für 12min
- mit 1-2ml H₂O nachwaschen
- Amicon-Tube umdrehen und erneut bei 2000rpm für 2min zentrifugieren
- vom so präparierten Volumen werden 2µl in die Cycle- Sequenzierung eingesetzt

II. Cycle-Sequenzierung:

8µl TerminationReady Reaction Mix (enthält AmpliTaq Polymerase)

2µl aufgereinigtes PCR-Produkt

3µl Primer (10 pmole)

7µl H₂O

20µl Reaktionsansatz

im Minicycler Programm Taqterm F:

1. 96°C für 30sek
2. 50°C für 15sek
3. 60°C für 4min
4. 24 x zurück zum 1. Schritt mit einer Rampe von 1°C/1 sek

- anschließend wurde eine Ethanol-Präzipitation in 1,5ml Eppendorf-Tubes durchgeführt:
- 2µl 3 M Na-Azetat pH5.6
- 50µl 95 % Ethanol plus 20µl Reaktionsansatz aus dem Minicycler
- gut durchmischt für 30min auf Eis
- anschließend für mindestens 15min bei 4°C und 14000rpm in Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren
- vorsichtig den Überstand abpipettieren und folgend mit 250µl 70% Ethanol waschen
- erneut zentrifugieren, abpipettieren und in Speed-Vac trocknen

3.13 Versuche am ES-300 (Boehringer Mannheim)

Der Boehringer-Mannheim ES-300 ist ein automatisierter Immunoassay-Analyser, welcher Nachweise bei Temperaturen von entweder 25°C oder 37°C ermöglicht und in der Routinediagnostik für die Protein basierte Assays benutzt wird. Das Protokoll soll eine automatisierte Quantifizierung der PCR-

Material und Methoden

Amplifikate erlauben, welche möglichst geringe Handpipettierungen benötigt und kostengünstig in der Unterhaltung ist.

Material: Sample-Tubes, Streptavidin-Tubes (SA-Tubes), Blocking-Reagenz, Phosphatase gekoppelter Anti-DIG-Antikörper (aDIG), ABTS-Substrat (ABTS) (alle von Boehringer Mannheim), verwendete Puffer, siehe 3.1 (Seite 16).

Pipettierablauf der ES-300 Bestimmungen:

Handschrifte:

Probenpipettierung in Sample Tubes (Eppendorf) – Tubes wobei eine Verdünnung der Probe 1+9 (v+v) in Denaturierungslösung (DL) vorgenommen wurde. Proben wurden in Doppelbestimmung angesetzt

ES-300 (37°C):

Probenpipettierung in SA-Tubes; Inkubation 60 min.

Reagenz 1: 2 x 1.0 ml Denaturierungslösung (DL),

folgend Waschpuffer (WP) zur Neutralisierung, 4x automatisch

Reagenz 2: Hybridisierungslösung (HL) mit digoxigenierter Sonde

Reagenz 3: Waschpuffer zur stringenten Waschung 2 x 1.0 ml, je 17 min.

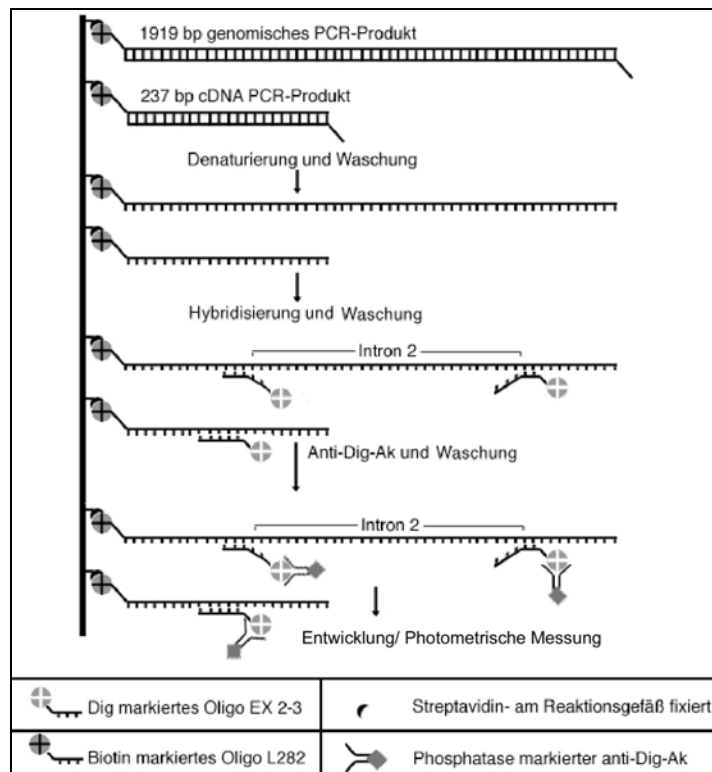
Reagenz 4: Puffer mit Phosphatase gekoppelten antiDIG-Antikörper nach Standardprotokoll (Boehringer Mannheim),

Waschpuffer zum Auswaschen, 4x automatisch

Reagenz 5: ABTS-Substrat für Phosphatasenachweis nach Standardprotokoll (Boehringer Mannheim)

Photometrische Messung nach Standardprotokoll (Boehringer Mannheim)

Abb.7: Schematische Darstellung des Reaktionsprinzips am ES 300



3.14 Patientenproben

Um die Anwendbarkeit der entwickelten RT-nested PCR auf klinische Fragestellungen zu testen, wurden Blutproben von zufällig ausgesuchten Patienten mit Prostata-Ca (Siehe Tab. 4, folgende Seite) und Kontrollpersonen dem Assay zugeführt.

Material und Methoden

Tab.4: Klinische Charakteristika der zufällig ausgesuchten Patienten mit Prostata-Ca

Alter, Jahren	Patienten #	PSA, ng / ml	TMN-Stadium	Gleason score	Positive Biopsien / Biopsien	Behandlung
58	# 1	3, 1	T 3A	3+4	3 / 6	s.p. RPE
n.d.	# 2	2, 6	T 3B	n.d.	n.d.	s.p. RPE
69	# 3	1, 4	T 3C	4+3	2 / 7	s.p. RPE
64	# 4	2, 4	T 3C	3+4	3 / 8	s.p. RPE
64	# 5	n.d.	T 3C	3+4	5 / 7	s.p. RPE +anti-androgen
56	# 6	< 0, 1	T 3A	3+4	3 / 6	s.p. RPE
64	# 7	< 0, 1	T 3A	3+4	3 / 8	s.p. RPE
56	# 8	< 0, 1	T 3A	3+4	3 / 6	s.p. RPE
59	# 9	< 0, 1	T 2C	3+3	n.d.	s.p. RPE
n.d.	# 10	< 0, 1	T 2c	3+3	1 / 6	s.p. RPE
n.d.	# 11	< 0, 1	T 2C	3+4	2 / 6	s.p. RPE
n.d.	# 12	< 0, 1	T 2A	3+3	2 / 6	s.p. RPE
66	# 13	< 0, 1	T 3C N1	4+3	3 / 7	s.p. RPE
64	# 14	< 0, 1	T 3A	3+4	6 / 7	s.p. RPE
64	# 15	< 0, 1	T 3A	3+ 4	6 / 7	s.p. RPE
66	# 16	< 0, 1	T 2C	3+ 3	1 / 4	s.p. RPE
48	# 17	< 0, 1	T 2A	3+3	3 / 6	s.p. RPE
73	# 18	56, 4	T 4	n.d.	3 / n.d.	antiandrogen
73	# 19	24, 6	T 1	3+3	1 / 8	antiandrogen
58	# 20	22, 6	T 3B N2	3+4	6 / 7	L-nex +antiandrogen
69	# 21	13,5	T 3B	3+4	3 / 6	antiandrogen
70	#22	3, 4	T 1A	0 / 8	1 / 6	TURP- inzidentelles Ca
69	# 23	0,2	T 1A	3+3	0 / 4 - inzidentelles Ca in TURP- Präparat - nicht in zusätzlichen Stanzungen	TURP- inzidentelles Ca
51	# 24	83, 2	T 4	3+5	6 / 7	----
69	# 25	53, 8	n.d.	3+4	4 / 7	----
64	# 26	35, 7	T 3C	3+4	5 / 7	----
58	# 27	22, 4	T 2C	3+4	4 / 7	----
66	# 28	17, 3	T 3	3+4	1 / 5	----
60	# 29	16, 7	T 2	n.d.	2 / 7	----
61	# 30	15, 5	T 2A	3+3	2 / 6	----
n.d.	# 31	14, 6	T 2C	3+4	7 / 7	----
66	# 32	9, 5	T 2C	4+5	2 / 6	----
67	# 33	9, 4	T 3B	3+4	3 / 7	----
68	# 34	8, 1	T 2C	3+4	4 / 7	----
59	# 35	8, 1	T 3A	n.d.	4 / 7	----
46	# 36	7, 0	T 2	3+4	2 / 6	----
72	# 37	7, 0	T 3A	3+3	1 / 6	----
54	# 38	6, 4	T 2C	3+3	3 / 6	----
65	# 39	5, 6	T 2C	3+4	3 / 6	----
68	# 40	2, 4	T 2	3+3	2 / 6	----

Legende: s.p RPE: Status post radikaler Prostatektomie; L-nex: Lymphadenektomie; TURP: transurethrale Prostataresektion; --

----: vor Behandlungsbeginn

Kontrollpersonen:

Bei den Kontrollpatienten handelte es sich um fünf Männer und vier Frauen im Alter zwischen 20 und 46 Jahren, bei denen zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei urologische Erkankung bekannt war. Ferner dienten Blutproben von freiwilligen, gesunden Frauen und Männern als Kontrollmaterial.

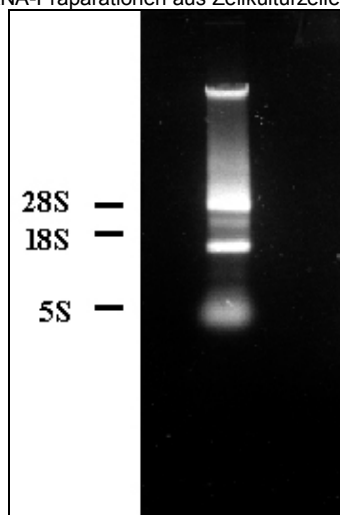
4. Ergebnisse

4.1 Gewinnung der kernhaltigen Zellen aus der Zellkultur

Zur Optimierung der RT-PCR Bedingungen und zur Herstellung von Positivkontrollen wurde zytoplasmatische RNA aus LNCaP und zur Herstellung von Negativkontrollen MDA-231 Mammakarzinomzellen mittels modifiziertem Proteinase-K Verdau nach Sambrook J et al. (1989), wie unter 3.8.1.2 beschrieben, isoliert.

Die gewonnene RNA wurde zur Konzentrationsmessung photometrisch gemessen und anschließend zur Überprüfung ihrer Intaktheit elektrophoretisch aufgetrennt. Die Darstellung der 28s, 18s, und der 5s ribosomalen RNA Bande gelang in Ethidiumbromid-haltigen 0,9%igen Agarose-Gelen.

Abb.8: RNA-Präparationen aus Zellkulturzellen MDA231



4.2 RNA-Extraktion von nukleären Zellen aus peripheren Blutproben

Als klassische Methode zur Abtrennung der Erythrozyten aus Blut- oder Knochenmarksproben wird in der Literatur meistens die Zentrifugation über einen Ficoll-Gradienten angeführt. Diese Methode ermöglicht es, aufgrund unterschiedlicher Sedimentationseigenschaften der Blutzellen diese durch Zentrifugation voneinander zu trennen und dadurch die Fe^{2+} -(Hämoglobin-)haltigen Erythrocyten zu depletieren.

Die Gewinnung aller nukleären Zellen mittels der Ficoll-Gradienten bedeutet jedoch auch einen großen Arbeitsaufwand und vor allem einen Zeitverlust von 1-2h, was sich negativ auf die Stabilität der zu detektierenden mRNA auswirkt. Dies führte in einigen Fällen dazu, dass die gewonnene RNA degradiert war und nicht mehr amplifiziert werden konnte. Ferner ist die Wiederfindung von

Karzinomzellen eines autonomen Gewebes im peripheren Blut mittels Ficoll nicht generell beurteilbar, wodurch sich eine unvorhersehbare Sensitivität im hochsensitiven PCR-Detektionsverfahren ergibt.

Ferner sind keine Daten zur Präzision oder Selektivität von Ficoll-Aufreinigungen bekannt. Wie viele Karzinomzellen tatsächlich mit der Ficoll-Aufreinigung erfasst werden oder verloren gehen hat neben dem Zeitverlust durch die Ficoll-bedingten Zentrifugationen Auswirkungen auf die Sensitivität der folgenden RNA-Detektion. Daher wurde diese Arbeitsmethode gerade für einen hochsensitiven Assay, welcher als Detektionslimit 10 Zellen/ml Blut anstrebt, als nicht geeignet empfunden.

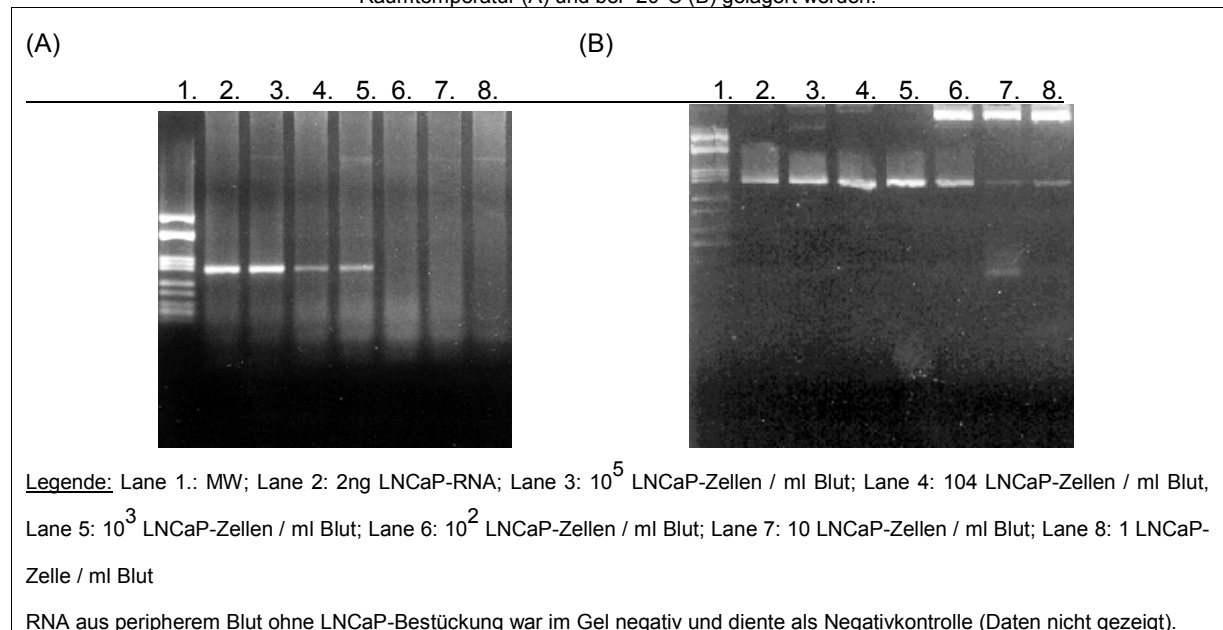
Bei dem Versuch, diese Methoden auf Blutproben anzuwenden zeigte sich in Vorversuchen, dass die unter Auslassung von GITC gewonnene RNA zum Teil vollständig abgebaut war. Auch die Zugabe von Substanzen, die RNasen inhibieren sollen, wie RNase-Inhibitor (Pharmacia), Vanadyl-Ribonukleosid-Komplexen, β -Mercaptoethanol oder DEPC, führte zu keiner entscheidenden Verbesserung der Qualität der gewonnenen RNA.

Die von Chomzynski et al beschriebene Methode wurde für eine routinemäßige Anwendung modifiziert, wobei zur Verkürzung der Methode einzelne Arbeitsschritte der Methode ausgelassen wurden. In dem resultierenden Protokoll wurde die in 6M GITC freigesetzte und vor Degradation geschützte RNA nur noch je einmal mit Phenol und Chloroform extrahiert und dann in Ethanol über Nacht oder für 30min bei -70°C gefällt (siehe 3.8.1.1 Details). Die so gewonnene RNA wurde weder der photometrischen Messung, noch der Elektrophorese zugeführt. Dies hatte drei Gründe:

1. Es galt PSA-mRNA exprimierende Tumorzellen in 1ml peripheren Blut zu detektieren, so dass eine Normalisierung auf RNA-Gehalt nicht notwendig erschien.
2. Es handelte sich beim RNA-Äquivalent aus 1ml Blut um eine äußerst geringe Menge an präparierter RNA, so dass eine Visualisierung via Elektrophorese oder gar eine valide photometrische Messung der Konzentration zum Zwecke der Qualitätskontrolle nicht geeignet war.
3. Im Verlauf der Arbeit wurde beachtet, die gewonnen RNA außerhalb der Pipettierung für die $\beta 2$ -Mikroglobulin-PCR bzw. PSA-RT-PCR nicht unnötig aufzutauen oder bei Raumtemperatur zu behandeln, um einen Substanzverlust der labilen RNA und damit Sensitivitätsverlust zu vermeiden.

Ein Parallelansatz von gleichen RNA-Ausgangs-Proben zeigt, dass selbst in GITC aufgenommene Blutproben von einer zügigen Behandlung profitieren (Abb.9, Seite 51). In Blut verdünnte LNCaP-Karzinomzellen, die der stabilisierenden GITC-Lösung zugeführt wurden, zeigen differente Resultate, sofern die GITC-Proben bei Raumtemperatur oder bei -20°C gelagert werden. Während in Proben, die 1 Woche bei Raumtemperatur stehengelassen wurden, das Sensitivitätslimit bei 1000 Zellen/ml lag, konnten bei Proben, welche 1 Woche -20°C tiefgeköhl wurden, 1 Zelle/ml sicher detektiert werden. Das Experiment dokumentiert die Notwendigkeit der korrekten präanalytischen Behandlung der GITC-Blutproben.

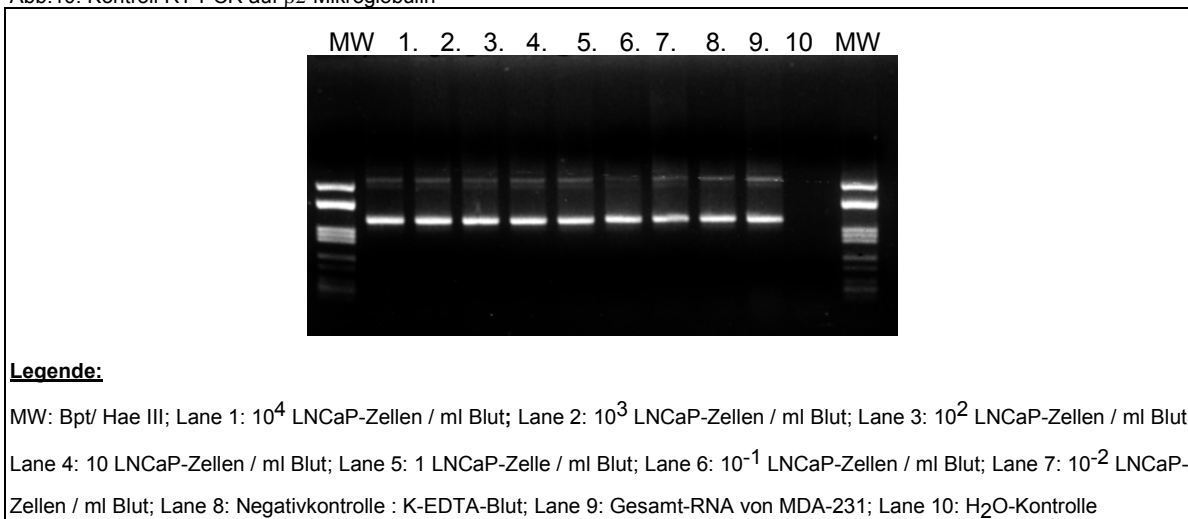
Abb.9: Darstellung des Sensitivitätsverlustes: sofern mit LNCaP-Zellen bestückte GITC-Blutproben eine Woche bei Raumtemperatur (A) und bei -20°C (B) gelagert werden:



Für die Analyse von PCa-Patientenproben ergab sich aus dem Ergebnis der Abb. 9, dass die Proben so schnell wie möglich auf Station der stabilisierenden Solution D zugesetzt wurden. Es folgte der unmittelbare Transport der Proben ins analysierende Labor. Dort wurde das homogene Hämolysat unverzüglich aliquotiert und bei -70°C eingefroren, um einen Sensitivitätsverlust in der Detektion von Tumorzellen auszuschließen.

Zur Überprüfung der Integrität der präparierten RNA aus Patientenproben oder Verdünnungsreihen wurde eine β 2-Mikroglobulin-PCR, wie unter Protokoll 4 unter 3.9.3.2 beschrieben, durchgeführt. Nur bei positivem Nachweis eines β 2-Mikroglobulin Amplicons wurde die präparierte RNA der PSA-nested PCR zugeführt.

Abb.10: Kontroll RT-PCR auf β 2-Mikroglobulin

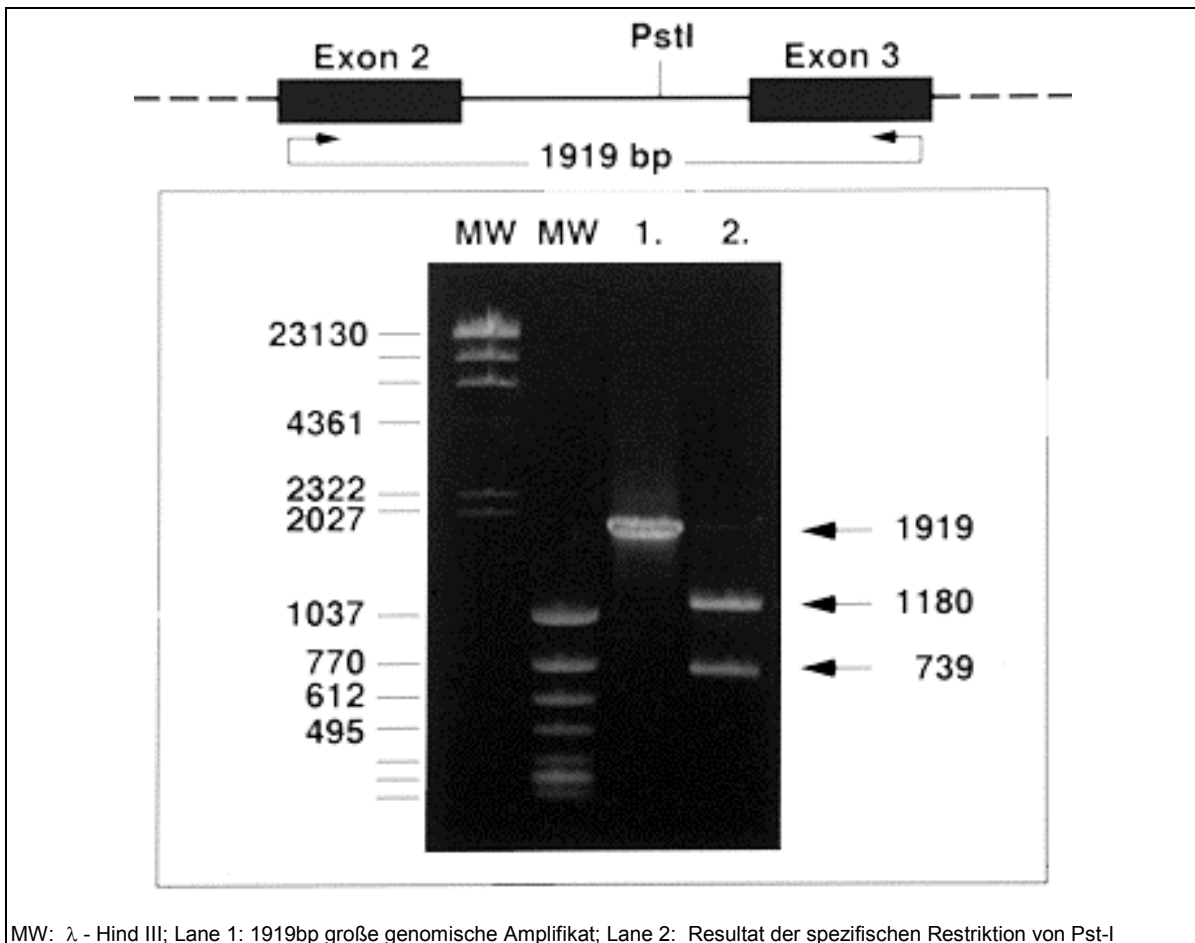


4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

4.3.1 Primerwahl

Zu Beginn wurde die Amplifizierbarkeit der PCR mit den verwendeten Primern auf genomischer Ebene überprüft und in einem Restriktionsverdau mit Pst I verifiziert. Als Ausgangsmaterial diente aus MDA-231 Zellkultur gewonnene RNA, welche ohne vorgeschaltete reverse Transkription in einer nested-PCR mit den Primerpaaren L358/U23 und anschließend in der nested-PCR mit L282/U 46 amplifiziert wurde. Da jede präparierte RNA auch Spuren genomischer DNA enthält, konnte anhand dieser Probe eine Amplifikation vom genomischen PSA-Abschnitt oder alternativ von hoch-molekularer RNA (hm-RNA) erzielt werden. Das genomische Amplifikat birgt eine Pst-I Restriktionsschnittstelle, die zum Spezifitätsnachweis durch enzymatischen Verdau herangezogen wurde. Pst-I erkennt die Basenfolge CTGCA'G, welche exklusiv im genomischen Amplifikat als Ausdruck der spezifischen Amplifikation des genomischen PSA-Abschnitts vorkommt. Bei erfolgter Restrikton (siehe Abb 11, Seite 53) findet sich eine 1180 bp und 739 bp große Bande im Agarosegel.

Abb.11: PCR auf genomische DNA mit folgendem Restriktionsverdau (Pst-I)



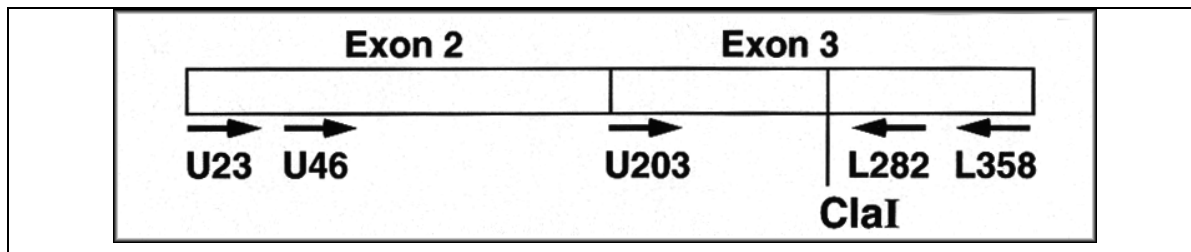
MW: λ - Hind III; Lane 1: 1919bp große genomische Amplifikat; Lane 2: Resultat der spezifischen Restriktion von Pst-I

Im weiteren Verlauf der Etablierung des Assay galt es die Spezifität der Primer an präparierter RNA aus LNCaP-Zellkulturen zu testen. Die unter Tab. 5 / Abb. 12 aufgelisteten Primer wurden in verschiedenen Kombinationen eingesetzt (siehe Abb. 13), um sowohl deren Spezifität als auch die Kompatibilität der Primer untereinander zu testen. Die erwarteten Fragmente hatten folgende Größen:

Tab. 5:

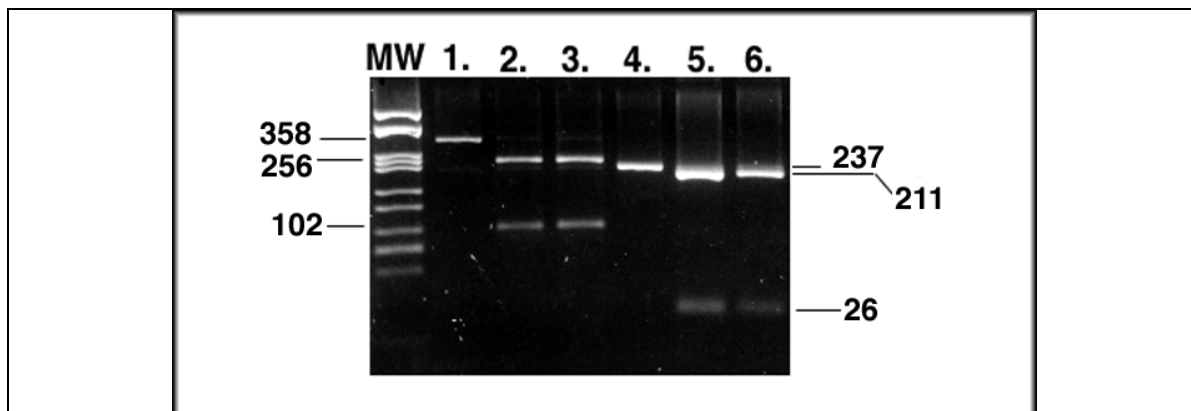
Primerpaar	Fragmentlänge
U 23/ L 358	358 bp
U 203 / L 282	80 bp
U 46 / L 282	237 bp

Abb.12: Schematische Darstellung der in der RT-nested PCR verwendeten Oligonukleotide



Die Spezifität der Oligonukleotide wurde auch hier durch Restriktionsverdau, diesmal mit Cla I, verifiziert.

Abb.13: RT-PCR auf PSA mRNA mit folgendem Cla-I VerdauRestriktionsverdau



Legende:

Lane 1: MW = molecular weight marker = Blue script Hae III

Lane 2: einfache RT-PCR mit U 23 und L 358 aus LNCaP-RNA + anschließ. Cla I-Verdau (KS-Puffer)

Lane 3: einfache RT-PCR mit U 23 und L 358 aus LNCaP-RNA + anschließ. Cla I-Verdau (Gibco-Reakt 1)

Lane 4: RT-nested PCR aus LNCaP-RNA mit den Primern L282 und U 46

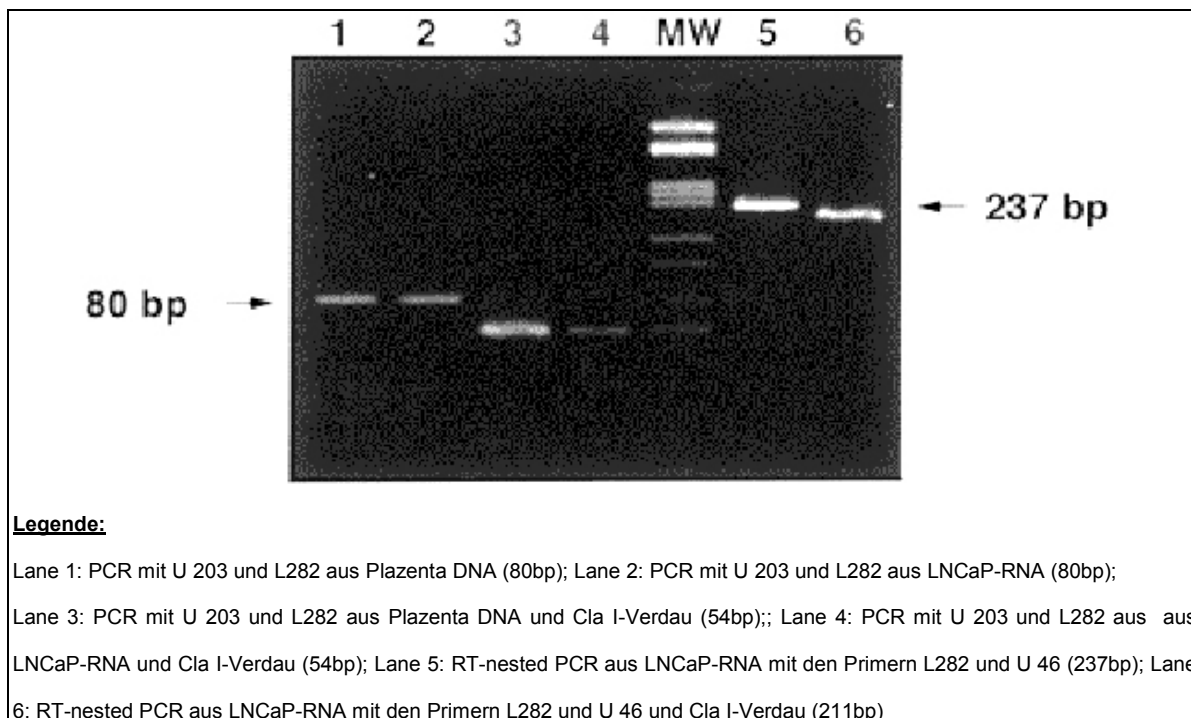
Lane 5: RT-nested PCR aus LNCaP-RNA mit den Primern L282 und U 46 + anschließ. Cla I-Verdau (KS-Puffer)

Lane 6: RT-nested PCR aus LNCaP-RNA mit den Primern L282 und U 46 und anschließ. Cla I-Verdau (Gibco-Reakt 1)

Auftragung in 4% NuSieve-Agarose Gel

Cla I, welches als Restriktionsenzym die Palindromsequenz AT⁺CGAT erkennt, schneidet in Abb. 13 erkennbar vom 358 bp langen PCR-Produkt der ersten PCR ein 102 bp großes Fragment ab. Es resultiert ein 102 bp großes und ein 256 bp großes Fragment (Lane 2 und 3). Vom 237 bp langen Produkt der nested PCR wird eine nur 26 bp große Basensequenz abgeschnitten, so dass ein 211 bp großes Fragment neben dem 26 bp Fragment in Lane 5 und 6 sichtbar wird. Die enzymatische Leistung von Cla I in beiden Puffern imponiert bei Betrachtung des Gelphotos in beiden Puffern als gleichwertig.

Abb. 14: RT-PCR auf PSA mRNA und DNA mit folgendem Cla-I VerdauRestriktionsverdau

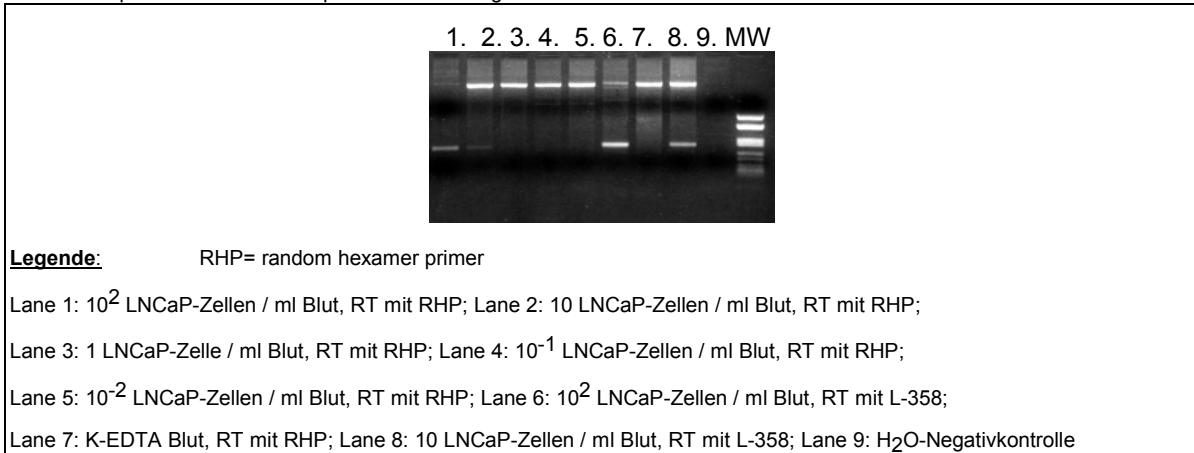


Die PCRs mit U 203 und L282 zeigen eine 80 bp Bande (Lane 1 und 2), welche durch den anschließenden Restriktionsverdau mit Cla-I um eine Sequenz von 26 bp auf 54 bp (Lane 3 und 4) verkürzt wird. Da teilweise die abgeschnittenen bzw. amplifizierten Fragmente sehr klein sind, ergaben sich Schwierigkeiten bei der Visualisierung vor allem der 26 bp-Bande in 3 und 4.

4.4 Reverse Transkription

Neben Oligo-dT-Sequenzen werden in der Literatur Angaben zum Einsatz von random Hexamer Primern (RHP) oder Sequenz-spezifischen Primern innerhalb der reversen Transkription gefunden. Im direkten Vergleich zwischen random Hexameren und L358 in der reversen Transkription zeigt in Abb. 15 der L358-Ansatz eine deutlicheres Signal im Agarosegel bei der Detektion von 10^2 LNCaP-Zellen/ml Blut (Lane 6 verglichen zu Lane 1 mit RHP). Auch bei der Detektion von 10 PCa-Zellen/ml Blut ist der Ansatz der spezifischen-L358-RT sensitiver (Lane 8 verglichen zu Lane 2 mit RHP). Im Gegensatz zu random Hexameren, welche sich unspezifisch an mRNA-Sequenzen anlagern und somit einen Mehrverbrauch an reverser Transkriptase bewirken dürften, wird unter Gebrauch von L358 nur PSA-mRNA spezifisch revers umgeschrieben. Dies erklärt die mit spezifischer RT erreichbare höhere Sensitivität.

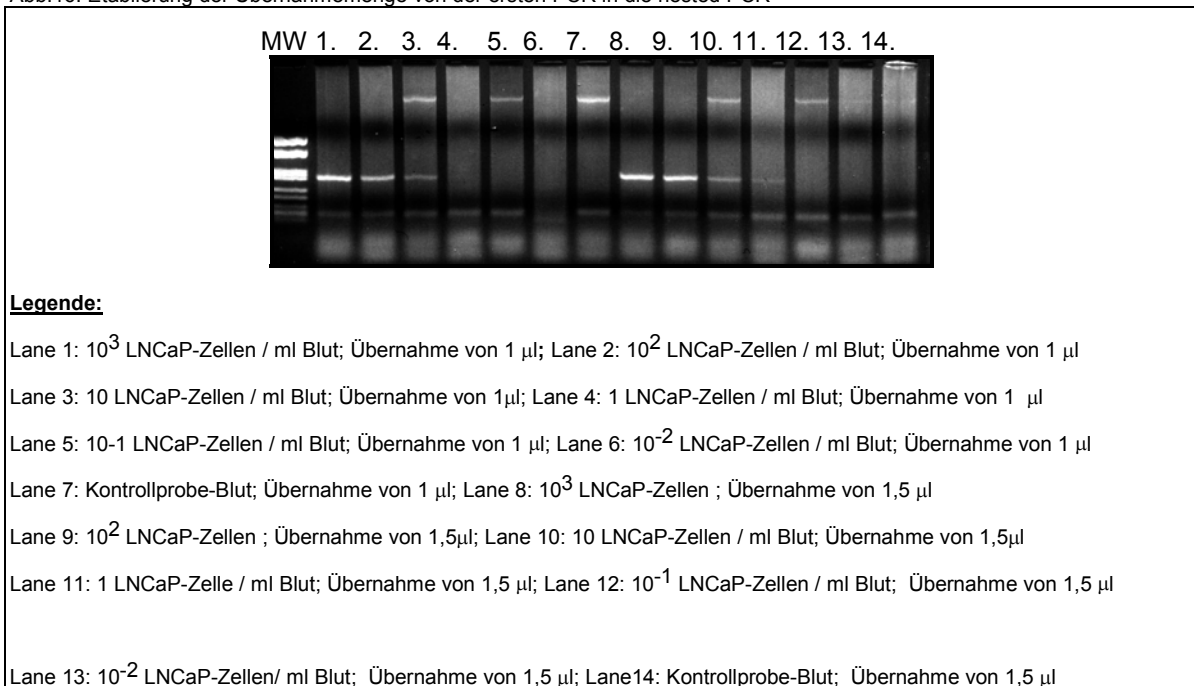
Abb.15: Amplifikationsvorteil bei spezifischer RT verglichen zu RHP



4.5 PCR

Bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen für die II.PCR konnte gezeigt werden, dass durch eine Steigerung der Übernahmemenge von 1 auf 1,5µl aus der ersten PCR die Sensitivität erhöht werden kann. Während 1 Zelle bei einem Volumen von 1µl nicht im Gel visualisiert werden kann (Lane 4), gelingt der Nachweis im parallelen Ansatz bei Übernahme von 1,5µl (Lane 11).

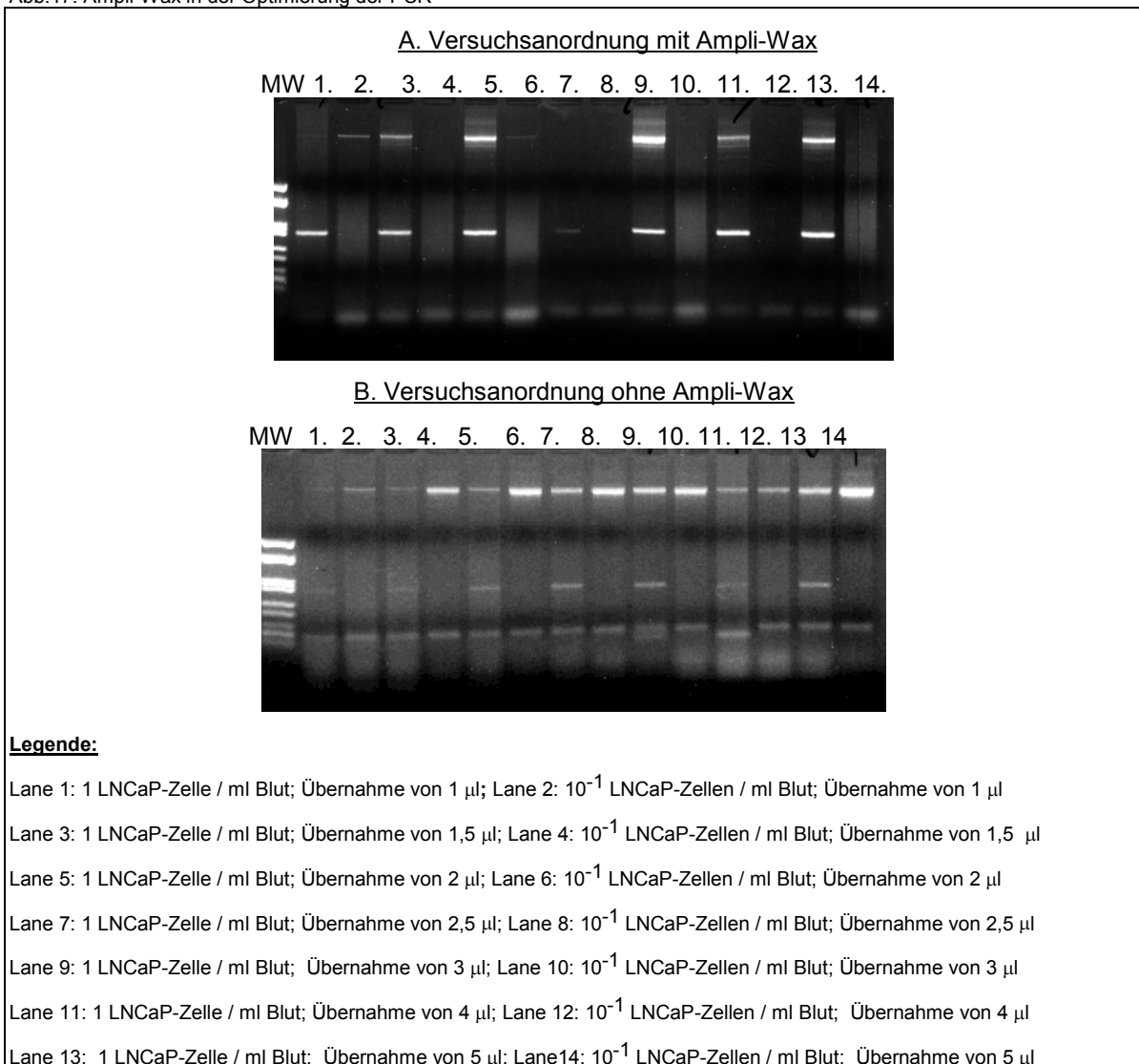
Abb.16: Etablierung der Übernahmemenge von der ersten PCR in die nested PCR



Bei der weiteren Optimierung der nested-PCR wurden Versuchsreihen mit und ohne Ampli-Wax bei steigenden Übernahmeholumina aus der gleichen ersten PCR durchgeführt. Wie im 2,5% Agarosegel erkennbar, führte der Gebrauch von Ampli-Wax schon bei geringen Übernahmemengen von 1 bzw. 1.5µl zu deutlichen Signalen in der II. PCR. Im direkten Vergleich zur Versuchsreihe ohne Ampli-Wax

erscheinen die Signale durchweg kräftiger, jedoch ist gleichzeitig nur eine schwache Steigerung der Signalintensität auszumachen. Anders beim Fehlen von Ampli-Wax: Die Signale zum Nachweis einer PSA-exprimierenden -Zelle wird bei steigenden Übernahmeverolumina deutlicher. Ferner ist in beiden Anordnungen kein zusätzlicher Sensitivitätsgewinn durch Steigerung des Übernahmeverolumens oder durch Verwendung von Ampli-Wax zu detektieren. Der Nachweis von 10^{-1} Zellen/ml Blut gelang in diesem Rekonstitutionversuch nicht, obwohl eine spezifische Amplifikation, sichtbar an der 1919 bp genomischen Bande, stattfand.

Abb.17: Ampli-Wax in der Optimierung der PCR

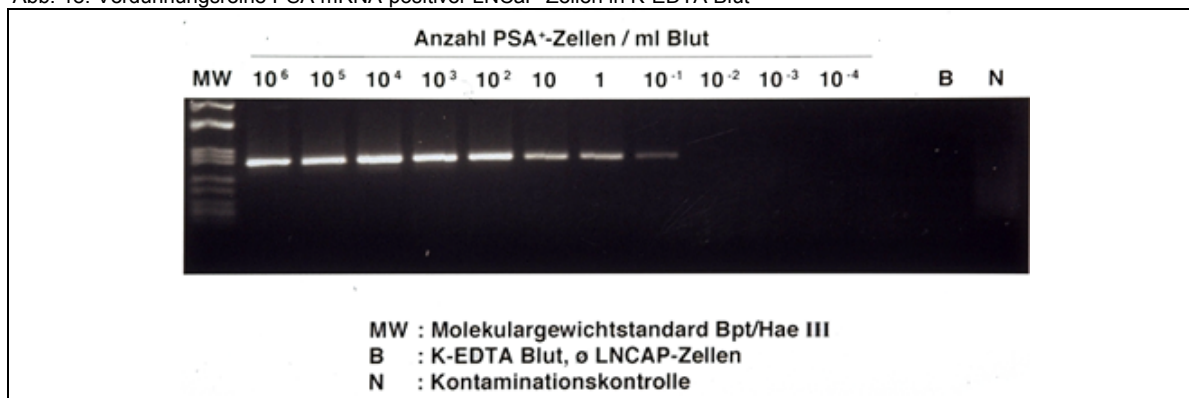


Der sichtbare Vorteil beim Gebrauch von Ampli-Wax liegt in der Tatsache, dass die amplifizierende Polymerase erst bei hohen Temperaturen in Kontakt mit der Target-Sequenz und Oligonukleotiden kommt. Unspezifische Produkte, die sich durch unspezifische Teilhybridisierungen von Primern untereinander oder zwischen Primern und DNA bei geringen Reaktionstemperaturen ergeben, binden und

verbrauchen Polymerase und andere Reaktionskomponenten, so dass diese der spezifischen PSA-cDNA Amplifikation nicht mehr zur Verfügung stehen. Es resultiert eine verminderte Sensitivität des Assays. Jedoch wurde unter der Verwendung von Ampli-Wax in unserem Assay eine nicht erklärbare Zunahme von Kontaminationen beobachtet, so dass bei der Abarbeitung der Patientenproben auf die Verwendung von Ampli-Wax verzichtet wurde.

Zur Ermittlung des Sensitivitätslimits der RT-nested-PCR wurden PSA m-RNA positive LNCaP Zellen in peripherem Blut gesunder Freiwilliger verdünnt. Das Limit war innerhalb der Versuchreihen nicht einheitlich bei 10^{-1} Zellen, wie in untenstehender Abbildung erkennbar, sondern schwankte zwischen 10 Zellen und 10^{-2} Zellen/ml Blut. Die Intensität der 237bp-Bande ließ mit zunehmender Verdünnung nach (Abb.:18 10^2 bis 10^{-1}). Das Auftreten der genomischen 1919 bp-Bande in Rekonstitutionsversuchen war nicht einheitlich. Es konnte kein standardisiertes Protokoll zur Vermeidung der genomischen Bande erstellt werden. Weder die Elimination der Amplifikationszeit aus dem Zyklusprotokoll (2-Schritt PCR), noch die Erniedrigung der Denaturierungstemperatur auf 90°C in den letzten 5 Zyklen lieferten diesbezüglich reproduzierbare Ergebnisse. Jedoch sollte immer berücksichtigt bleiben, dass in jeder RNA-Präparation ein unterschiedlich hoher, schwer faßbarer Anteil an DNA-Kontamination auftritt, der das Gleichgewicht zwischen RNA und DNA in der PCR und damit Amplifikationsvorteile für eine der beiden Substrate beeinflusst.

Abb. 18: Verdünnungsreihe PSA mRNA-positiver LNCaP-Zellen in K-EDTA Blut



Bei zunehmenden Verdünnungen trat die genomische 1919 bp-Bande gegenüber der cDNA-Bande zunehmend in den Vordergrund (Abb.:19 Lane 4-8). Durch die in hohen Verdünnungen fehlende PSA-cDNA wird an ihrer Stelle das genomische Korrelat amplifiziert. Liegt genügend cDNA aus der reversen Transkription vor, so hat diese aufgrund ihrer kürzeren Sequenz in der PCR einen Amplifikationsvorteil.

Ergebnisse

Abb.19: Verdünnungsreihe PSA mRNA-positiver LNCaP-Zellen in K-EDTA Blut und korrespondierender Southern Blot

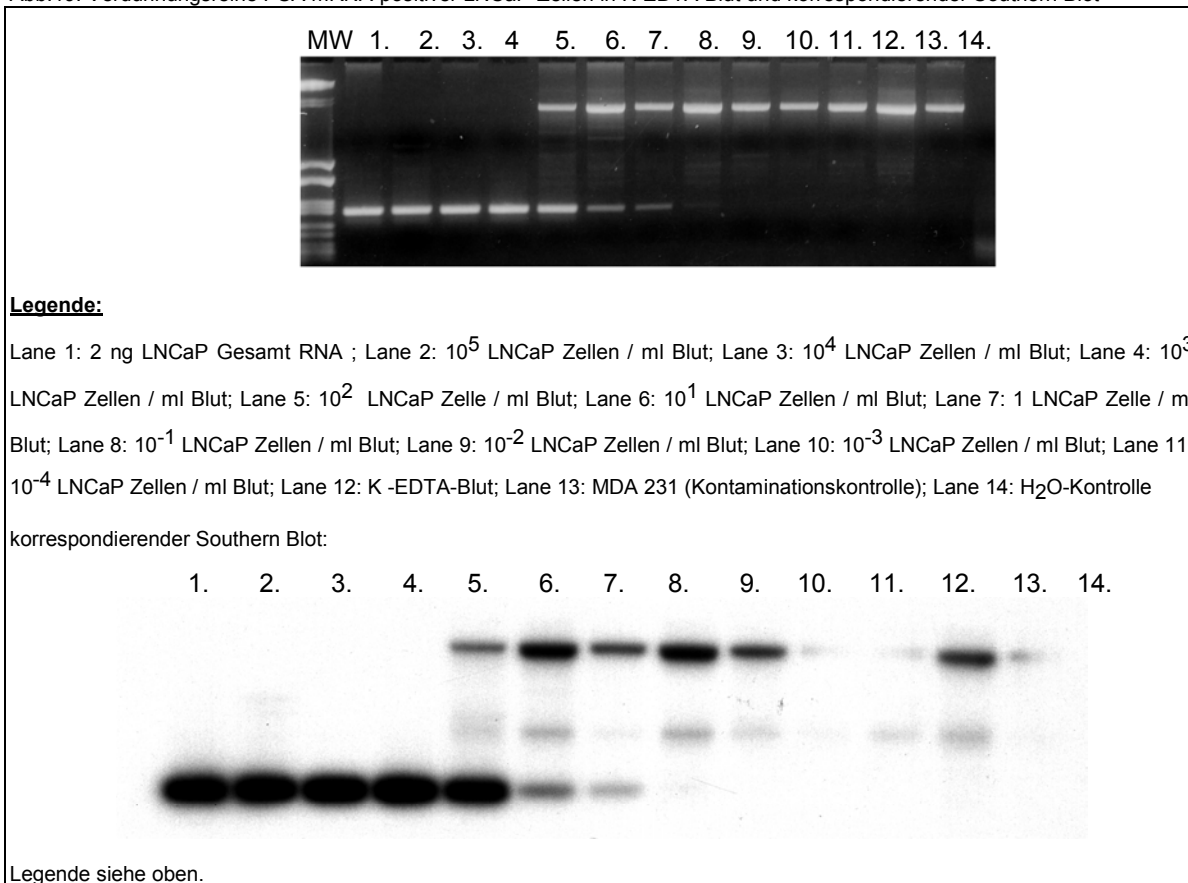
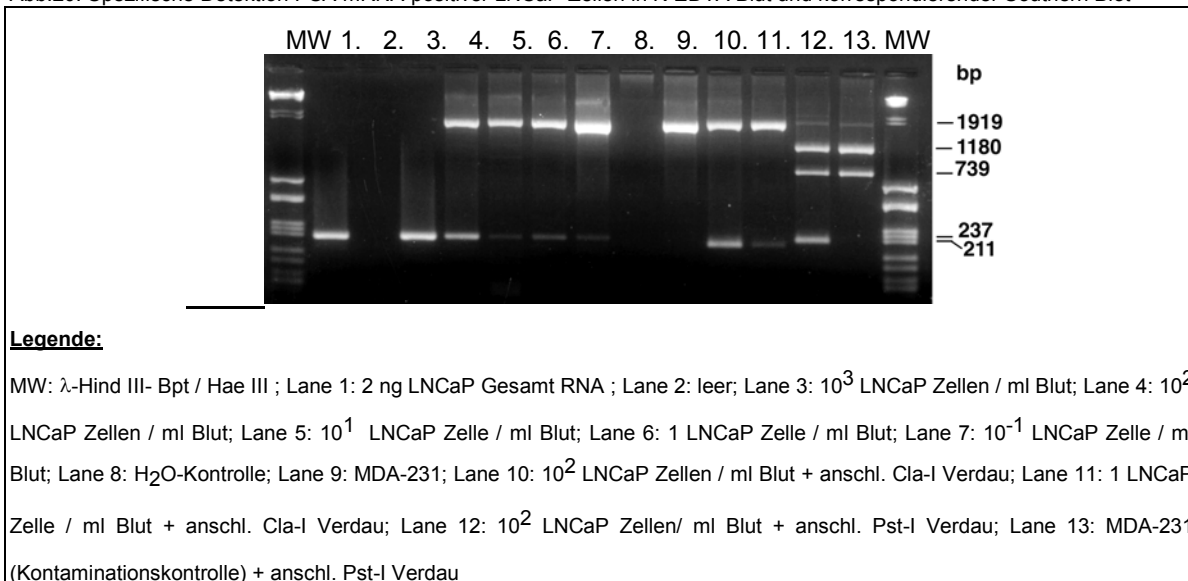


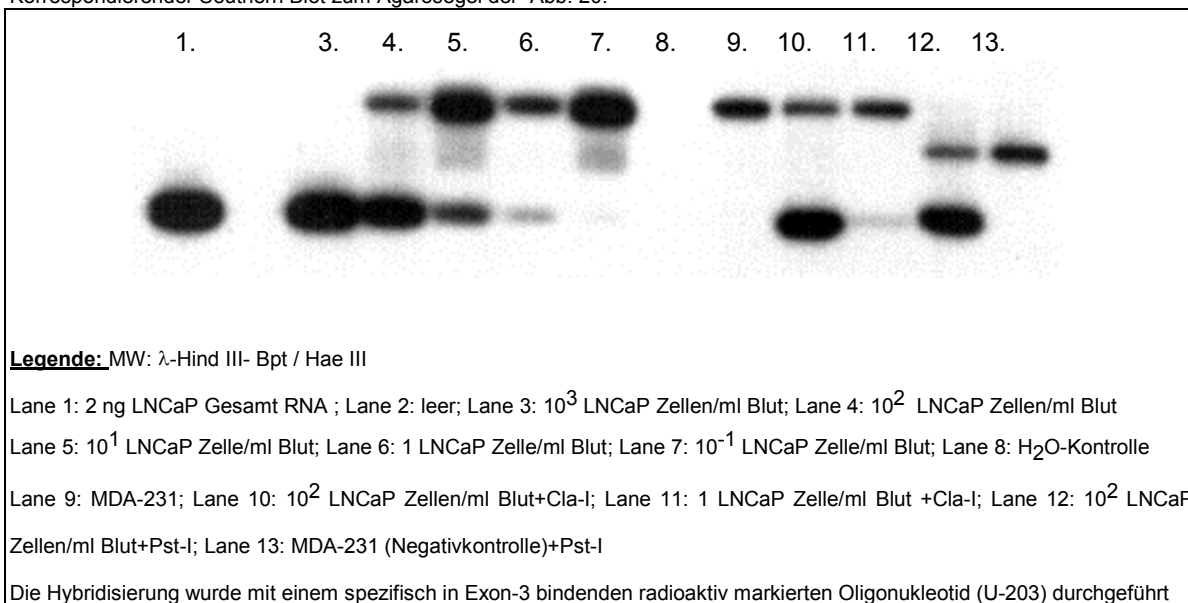
Abb. 20 fasst die Ergebnisse der Etablierung des RT-nested PCR Nachweises auf PSA-mRNA im peripheren Blut mit Sensitivitäts- und Spezifitätskontrollen zusammen. Als Positivkontrolle wurde RNA aus LNCaP-Zellen in die PCR eingesetzt, welche wie unter 3.8.1.2 präpariert wurde (Lane 1). Als Sensitivitätskontrollen wurden LNCaP-Verdünnungen von 10^3 bis 10^{-1} Zellen/ml Blut herangezogen (Lane 3-7), wobei die Detektion von 1 Zelle/ml Blut im korrespondierenden Southern Blot der Abb. 20 deutlicher zu erkennen ist. Die Negativkontrollen zeigen weder im Agarosegel noch im Southern Blot keinerlei Detektion von PSA mRNA auf (Lane 8 und 9). Zum Spezifitätsnachweis wurde ein Restriktionsverdau mit Cla-I (Lane 10-11) und Pst-I (Lane 12-13) durchgeführt, wobei Cla-I erkennbar nur das PSA-cDNA Amplicons und Pst-I spezifisch nur das genomische Amplifikat schneidet.

Ergebnisse

Abb.20: Spezifische Detektion PSA mRNA-positiver LNCaP-Zellen in K-EDTA Blut und korrespondierender Southern Blot

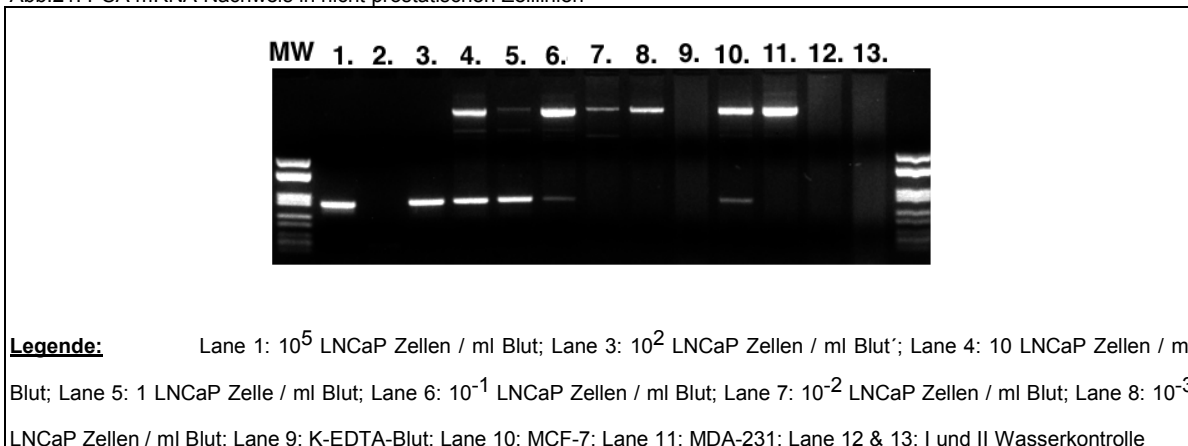


Korrespondierender Southern Blot zum Agarosegel der Abb. 20.



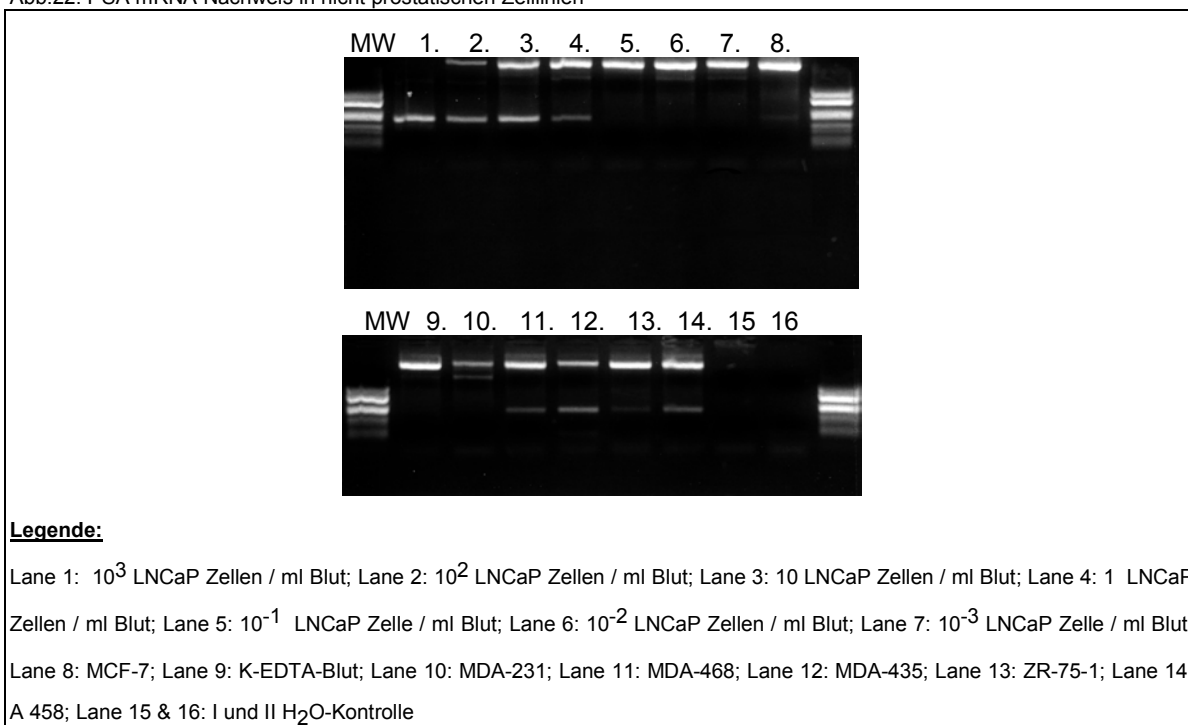
In Rekonstitutionversuchen, die ein Sensitivitätslimit von 10^{-1} Karzinomzellen/ml Blut erzielten, konnte gezeigt werden, dass MCF-7, eine humane Mammakarzinomlinie, welche in Vorversuchen als Negativkontrolle eingesetzt wurde, PSA-mRNA transkribiert (Abb. 21, Lane 10). Sie wurde in weiteren Versuchen und in der Abarbeitung der Patientenproben als Negativkontrolle ausgeschlossen, und es wurde MDA-231 als Negativkontrolle verwendet (Abb. 21, Lane 11), welche auch in folgenden Untersuchungen stets negativ für PSA-mRNA getestet wurde. Die Beobachtung der PSA mRNA Expression in nicht prostatistischen Zellen führte zur Untersuchung weiterer Tumorzelllinien (siehe Seite 61, Abb.22).

Abb.21: PSA mRNA Nachweis in nicht prostatistischen Zelllinien



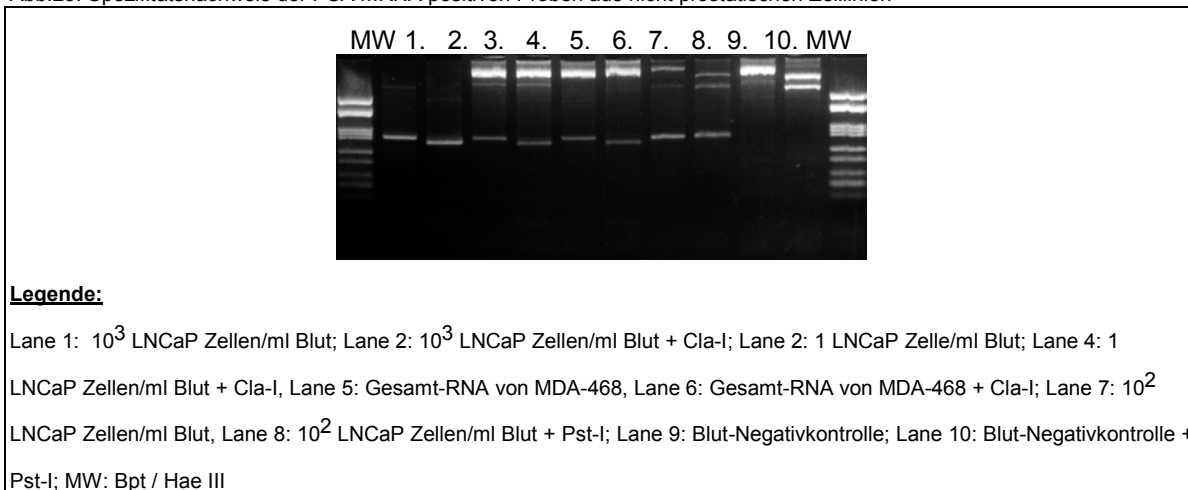
Bei einem Sensitivitätslimit von 1 LNCaP Zelle/ ml K-EDTA-Blut wurden, wie in Abb.22 verdeutlicht, die Mammakarzinomzelllinien ZR-75-1, MDA-468, MDA-435 positiv für PSA mRNA getestet. MDA-231 blieb wie die reine K-EDTA-Blutprobe und die zwei Wasserkontrollen in der nested PCR negativ.

Abb.22: PSA mRNA Nachweis in nicht prostatistischen Zelllinien



Zum Spezifitätsnachweis der Amplifikate der PSA RT-nested PCR wurden erneut die Restriktionsenzyme Cla-I und Pst-I eingesetzt. Wie in Lane 5 und 6 der Abb. 23 (folgende Seite) zu sehen ist, wird das PSA-Amplikon der MDA-468 mit Cla-I wie das PSA mRNA Amplifikat aus einer LNCaP-Zelle/ml Blut Lane 3 und 4 spezifisch geschnitten.

Abb.23: Spezifitätsnachweis der PSA mRNA positiven Proben aus nicht prostatistischen Zelllinien



4.6 Ergebnisse der Patientenproben und -daten

4.6.1 Nested RT-PCR für PSA-mRNA bei Patienten mit Prostatakarzinom (n= 40)

Auswertungsvoraussetzungen:

- positive β 2-Mikroglobulin-PCR
- positive Sensitivkontrolle
- 40 Patienten mit Prostatakarzinom:
 - 17 mit Zustand nach radikaler Prostatektomie (RPE)
 - 23 Patienten mit Primärtumor
- 3 bis 7-fach untersucht (93% der Proben häufiger als 4 mal)

Ergebnisse:

9 / 9 Kontrollproben (5 Männer/4 Frauen) wurden immer negativ getestet
 8 / 40 PCa-Patienten immer negativ (20%)
 32 / 40 PCa-Patienten im Verlauf der Testreihe positiv (80%)

Zu Beginn der Abarbeitung der Patientenproben fiel auf, dass Assays, die aus der gleichen hämolysierten Probe angesetzt wurden, variable Ergebnisse lieferten. Um diesen Sachverhalt genauer zu untersuchen, wurden insgesamt aus den 40 Patientenproben 204 RT-nested PCRs durchgeführt, wobei 93 % der Patientenproben vier Mal und häufiger untersucht wurden. Tabelle 6 (folgende Seite) fasst die Ergebnisse der Patientenuntersuchung zusammen:

Tab. 6: Ergebnisse der Patientenuntersuchungen; Auflistung relevanter klinischer Kenngrößen

Pat #	RT-PCR	PSA; ng/ml	sPSA; ng/ml	Tumorstadium	Behandlung
1	1 / 6	3. 1		T 3a	s / p RPE
2	2 / 4	2. 6		T 3b	s / p RPE
3	1 / 7	1. 4		T 3c	s / p RPE
4	3 / 4	0, 7	2. 4	T 3c	s / p RPE
5	2 / 5		< 0. 1	T 3c	s / p RPE; α -Androgene
6	2 / 5		< 0. 1	T 3a	s / p RPE
7	2 / 7		< 0. 1	T 3a	s / p RPE
8	1 / 5		< 0. 1	T 3a	s / p RPE
9	3 / 6		< 0. 1	T 2c	s / p RPE
10	2 / 5		< 0. 1	T 2c	s / p RPE
11	1 / 7		< 0. 1	T 2c	s / p RPE
12	2 / 5		< 0. 1	T 2a	s / p RPE
13	0 / 6	< 0. 1	0. 3	T 3c N1	s / p RPE
14	0 / 6		< 0. 1	T 3a	s / p RPE
15	0 / 6		< 0. 1	T 3a	s / p RPE
16	0 / 6		< 0. 1	T 2c	s / p RPE
17	0 / 6		< 0. 1	T 2a	s / p RPE
18	1 / 3	56. 4		T 4	α -Androgene
19	2 / 4	24. 6		T 3	α -Androgene
20	3 / 5	22. 6		T 3b N2	L-nex; α -Androgene
21	0 / 3	13. 5		T 3b	α -Androgene
22	1 / 4	3. 4		T 1a	TURP, inzidentelles Ca
23	0 / 6	0. 2		T 1a	TURP, inzidentelles Ca
24	3 / 5	83. 2		T 4	----
25	4 / 6	53. 8		T 3	----
26	1 / 4	35. 7		T 3c	----
27	2 / 4	22. 4		T 2c	----
28	2 / 5	17. 3		T 3a	----
29	2 / 4	16. 7		T 2	----
30	2 / 7	15. 5		T 2a	----
31	4 / 7	14. 6		T 2c	----
32	3 / 5	9. 5		T 2c	----
33	3 / 4	9. 4		T 3b	----
34	3 / 4	8. 1		T 2c	----
35	2 / 5	8. 1		T 3a	----
36	3 / 6	7. 0		T 2c	----
37	1 / 5	7. 0		T 3a	----
38	0 / 3	6. 4		T 2c	----
39	2 / 5	5. 6		T 2c	----
40	2 / 5	2. 4		T 2	----

Legende: Positive PCR-Ereignisse auf sämtlichen PCRs (RT-PCR), die PSA-Konzentration gemessen als Standardimmunoassay (Abbott Imx - PSA; ng/ml), die PSA-Konzentration gemessen als supersensitive nicht-radioaktive Modifikation des Immunoassays (sPSA; ng/ml), das Tumorstadium Tumorstadium und eine etwaige vorausgegangene Behandlung des Patienten werden hier berücksichtigt bzw. gegenübergestellt (Behandlung).

Das untersuchte Patientenkollektiv besteht aus zwei Gruppen: Patienten, die sich einer radikalen Prostatektomie unterzogen (n= 17) und Patienten, die sich zum Zeitpunkt der Materialgewinnung (noch) keiner operativen Therapie unterzogen und somit noch unter ihrem Primärtumor litten (n= 23).

In der Gruppe der radikal operierten (n= 17) wiesen 4 Patienten mit Infiltration der Prostatakapsel bzw. der Samenbläschen positive Ergebnisse in der RT-PCR und im PSA-Immunoassay auf. Acht Patienten zeigten positive Ergebnisse nur in der RT-PCR und ein radikal operierter Patient nur in der supersensitiven PSA-Bestimmung, aber nicht in der PCR (Patient # 13). Die histologische Untersuchung der Lymphknoten ergab bei diesem Patienten einen positiven Befund; er wies im PCR-Assay trotz sechsmaliger Testung der Probe kein positives Signal auf. Fünf der 17 Patienten dieser Gruppe (29%) lieferten sowohl in der supersensitiven PSA-Bestimmung, als auch im RT-PCR-Assay nicht nachweisbare Konzentrationen bzw. negative Resultate in wiederholten Messungen.

Es gibt keine offensichtliche Korrelation zwischen positivem RT-PCR-Ereignis und der Größe des Primärtumors: 5/7 der pT2 -Stadium-Patienten (71%), 4/6 Patienten mit pT3 a, b (67%) und bei allen drei pT3c Patienten (100%) konnte ein PSA-cDNA Signal in der PCR nachgewiesen werden.

Tab.7: Vergleich von Serum PSA ELISAs und RT-PCR bei Patienten im Status post RPE

	Serum PSA negativ	Serum PSA positive	
RT-PCR negativ	4	1	5
RT-PCR positive	8	4	12
	12	5	

In der Gruppe der Patienten, die noch ihren Primärtumor trugen (n=23), konnte bei drei Patienten kein PSA-spezifisches Signal detektiert werden. Bei zweien von diesen (Pat # 21 und # 38) konnten aus technischen Gründen pro Patient nur drei PCR-Ansätze gefahren werden. Für sie ergibt sich eine 20%-ige Wahrscheinlichkeit, unzureichend getestet worden zu sein (siehe Tabelle 8, folgende Seite). Die dritte negativ getestete Probe stammt von einem Patienten (# 23), welcher im Resektionspräparat einen Anfang der 90'er Jahre durchgeführten TURP ein inzidentelles PCa histologisch aufwies, welches sich jedoch in späteren Biopsien nicht (mehr) nachvollziehen ließ.

Innerhalb dieser Gruppe können keine Differenzen zwischen Patienten, die andere Therapien als die RPE, wie Antiandrogene oder TURP (n=6 ; Pat #18-23), oder Patienten, denen noch gar keine Therapie zugekommen ist (n=17; Pat # 24-40), anhand der PCR gezogen werden. Auch in dieser Gruppe findet sich keine Korrelation zwischen Tumorstadium und Positivitätsraten in der PCR. Ebenso ist keinerlei Korrelation zur PSA-Konzentration auszumachen.

Tab. 8: Ergebnisse der kumulativen Untersuchung der 32 positiv getesteten Patienten mit Betonung des positiven Zuwachses:

n	PCR	% pos. kum.	Fraktion	positiver Zuwachs in %
10	I	31	10 / 32	31
20	II	63	20 / 32	32
26	III	81	26 / 32	18
30	IV	94	30 / 32	13
32	V	100	32 / 32	6
32	VI	100	32 / 32	0
32				100

Von den 32 positiv getesteten Proben zeigten nach dem ersten Testdurchgang 10 Proben ein positives Ergebnis, was einem positiven Zuwachs von 31% entspricht. In den folgenden Testungen nahm der Prozentsatz zusätzlich positiv getesteter Proben bis auf 6% nach der fünften PCR stetig ab. In der sechsten PCR, die aus einer Patientenprobe gewonnen wurde, konnte kein weiterer positiver Zuwachs erreicht werden, so dass das Maximum der 80% positiv getesteten nach der fünften PCR erreicht war. Auffallend ist weiterhin bei der Betrachtung der positiv getesteten Proben, dass keine der Proben in allen aus ihr durchgeführten Assays positive Signale zeigt.

Die 8/40 (20%) negativ Getesteten wurden bis auf Patient # 21 und # 38 dementsprechend sechsmal untersucht, um ein weiteres positives Ereignis nicht zu verpassen. Die beiden Patienten # 21 und 38 konnten nur dreimal getestet werden und haben nach der obigen Tabelle (Tab 8.) eine 19%-ige Wahrscheinlichkeit ein positives Signal in der vierten und fünften PCR aufzuweisen. Gleichzeitig heißt dies auch, dass 2/40 Proben (5%) aufgrund technischer Schwierigkeiten nicht komplett untersucht werden konnten.

Tab.9: Resultate der Kontrollpatienten

Alter; Jahre	PSA, mRNA	PSA, mg/l	Positive Biopsien /Biopsien	Diagnose
44	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
45	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
22	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
20	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
35	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
25	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
38	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
46	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.
40	0 / 5	n.d.	n.d.	n.d.

Von den vier Frauen und fünf Männern, welche als Kontrollpatienten in der RT-nested PCR getestet wurden, wiesen keine der untersuchten Patienten in fünf kumulativen Testungen positive Signale auf.

4.6.2 Poisson Verteilung

Die analytische Sensitivität von RT-PCR Ansätzen wird üblicherweise in Verdünnungsexperimenten von target mRNA positiven Tumorzellen ermittelt und stellt eine Größe dar, welche die Beurteilung der Empfindlichkeit der Methode unter Standardbedingungen (hier Anzahl der nachweisbaren Moleküle in einer definierten Verdünnungsreihe einer bekannten Tumorzelllinie) zulässt. Verständlicherweise erhält man dadurch jedoch keine Informationen über die diagnostische Sensitivität bei Patientenproben weil die Bedingungen der Amplifikationsreaktion in klinischem Material deutlich weniger definiert sind (z.B. durch Vorliegen von Inhibitoren) und Anzahl von Tumorzellen bzw. die Anzahl der Zielmoleküle eine unbekannte Größe ist.

Die funktionelle Sensitivität, d.h. die Tumorzellzahl, welche ein von „Null“ verschiedenes Ergebnis liefert, ist also in Kalibratorprobe und klinischer Probe unterschiedlich. Dennoch gilt für beide: Im Grenzbereich ist das Ergebnis der Einzelbestimmung nicht vorhersehbar. Folglich müssen Methoden entwickelt werden, um falsch-negative Ergebnisse zu kontrollieren. Diese müssen für Probenqualitäten eines klinisch-diagnostischen Tests definiert sein (die Gesetzmäßigkeiten der Poissonverteilung gelten sowohl unter Bedingungen der Untersuchung der analytischen Sensitivität als auch der diagnostischen Sensitivität).

In einer vorangegangenen Veröffentlichung wurde argumentiert, dass nach Poisson'scher Berechnung eine 70%-ige Wahrscheinlichkeit besteht, ein positives Signal in einer PSA RT-PCR zu ermitteln, welche ein Detektionslimit von 1 positiven Zelle in 5ml Blut hat, sofern sich konstant 1000 Tumorzellen in der Zirkulation befinden. Diese Wahrscheinlichkeit setzt voraus, dass das gesamte Material (RNA Äquivalent von $2.5-5 \times 10^7$ Zellen) oder zumindest ein repräsentativer Anteil dessen analysiert wird.

Dem Wahrscheinlichkeitsmodell der Poisson-Verteilung liegen folgende Annahmen zu Grunde, die hier am Beispiel der RT-PCR erläutert werden :

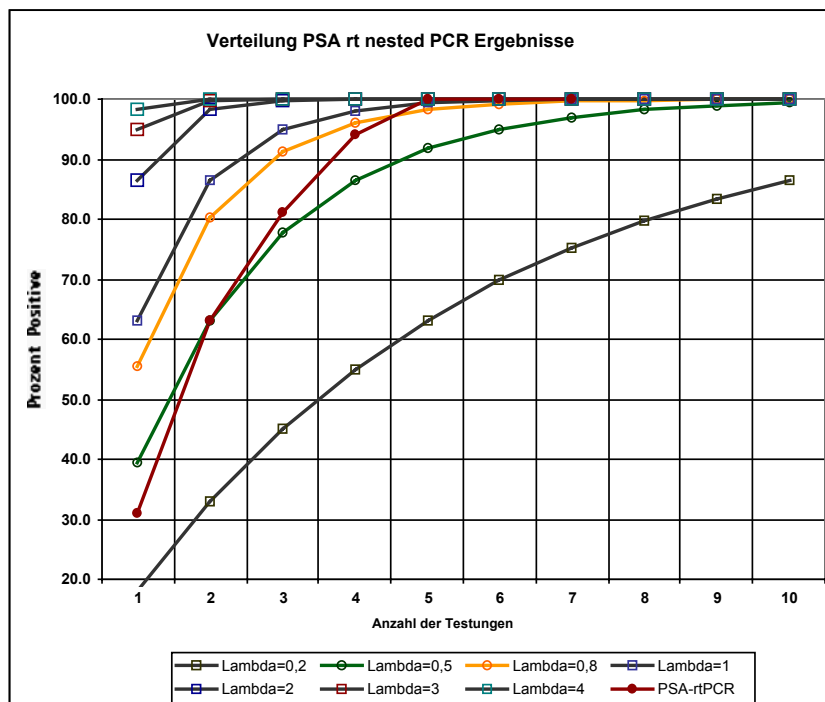
1. Die Lokalisation einer ausreichenden Menge an PSA-mRNA, welche in der PCR ein positives Signal zeigt, ist unabhängig davon, ob sich im betreffenden eingesetzten Volumen eine weitere ausreichende Menge an PSA-mRNA befindet oder nicht (Unabhängigkeitsbedingung). Diese Bedingung lässt sich auch auf PSA-positive Tumorzellen im gewonnenen K-EDTA Material anwenden.
2. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine ausreichenden Menge an PSA-mRNA, welche in der PCR ein positives Signal zeigt, in einer Aliquotierung zu finden ist, ist für alle Aliquotierungen gleich (Homogenitätsbedingung).

Die praktische Bedeutung dieser Bedingungen ist folgende: Die ausreichende Menge an RNA darf sich nicht gegenseitig beeinflussen, und es dürfen keine Konzentrationsunterschiede innerhalb der Proben auftreten. In dem hier vorgestellten Assay wird ein RNA-Äquivalent von 1% der gesamten Probe in einer einzelnen PCR-Reaktion eingesetzt, da eine größere Menge an eingesetzter Präparation im Reaktionsansatz zu einem Verlust an Sensitivität führt, welcher wahrscheinlich durch ein Mehr an in-

hibierenden Substanzen oder einer zu großen Menge an RNA bedingt ist. Daraus folgend beschreibt die Poisson'sche Verteilung nicht nur die Wahrscheinlichkeit, Tumorzellen bei der Probengewinnung einzufangen, sondern ebenso die Wahrscheinlichkeit einer positiven RT-PCR aus einem nicht repräsentativen Probenanteil. Ein Lösungsansatz einer kumulativen Testung wurde in dieser Arbeit verfolgt, wobei jedoch zuerst unklar war, wie oft der Test wiederholt werden sollte. Die Daten des Patientenkollektivs Tabelle 8 (Seite 65) zeigen empirisch, dass bei den gewählten Testbedingungen vier bis fünf Ansätze die Rate der falsch-negativen Resultate mit einer Wahrscheinlichkeit von 94% und mehr Prozent vermieden werden.

Um die Signifikanz der empirisch gefundenen Anzahl der zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse notwendigen Wiederholungsmessungen in einer Probe zu testen, wurde die Poisson'sche Verteilungswahrscheinlichkeit herangezogen. Dabei wurden als Maritze die Wahrscheinlichkeiten eines positiven Einzelergebnisses in Abhängigkeit unterschiedlicher sogenannter Parameterdichten (λ) angelegt (Graph 1). Der beobachtete kumulative Zuwachs positiver Ergebnisse bei klinischen Proben (rote Kurve) weist einen mit dem statistischen Modell gut vergleichbaren analogen Verlauf auf (Graph 1). Je geringer die Parameterdichte λ (in diesem Assay PSA-mRNA positive Zellen) in der untersuchten Probe, desto häufiger muß der Assay angewandt werden, um den Prozentsatz falsch negativer Proben zu minimieren (100% positive). Umgekehrt verringert sich die Anzahl der nötigen Testungen bei einer hohen Parameterdichte λ . Der hier etablierte Test besitzt für eine 95%-ige Sensitivität (Vorhersagewahrscheinlichkeit eines richtig negativen Ergebnisses) bei 4 Untersuchungen. Bei 5-facher Bestimmung ist der Prozentsatz falsch negativer Proben 0%.

Graph 1:



Wenn andere Faktoren wie ein Mangel an Standardisierung, Unspezifität oder systematische Fehler das PSA RT-PCR-System für einen einzelnen Test beeinflussen würden, wären Abweichungen von den kumulativen Vorgaben der Verteilung zu erwarten. Da dies nicht der Fall ist, kann darauf geschlossen werden, dass Inkonsistenzen der Ergebnisse durch stochastische Effekte am Sensitivitätslimit der hier vorgestellten RT-PCR zu erklären sind. Ferner sollte jegliche Abweichung von der kumulativen Vorgabe während der systematischen Test-Evaluierung als Indikator für eine weitere und nötige Optimierung eines Assays dienen.

4.7 ES-300 Ergebnisse

4.7.1. Oligonukleotidhybridisierung: Kombination von Bedingungen

Die Spezifität einer Hybridisierung wird in der molekularbiologischen Diagnostik durch drei Faktoren definiert:

- der Komplementarität des Oligonukleotids zur gesuchten Nukleinsäuresequenz
- der Höhe der Hybridisierungstemperatur
- der Salzkonzentration in den verwendeten Lösungen

Der Boehringer-Mannheim ES-300 ist ein automatisierter Immunoassay-Analyser, welcher Nachweise bei Temperaturen von entweder 25°C oder 37°C ermöglicht. Die Detektion des PSA PCR Amplicons im ES-300 gewinnt ihre Spezifität ausschließlich durch spezifische Gensonden und durch die benutzten

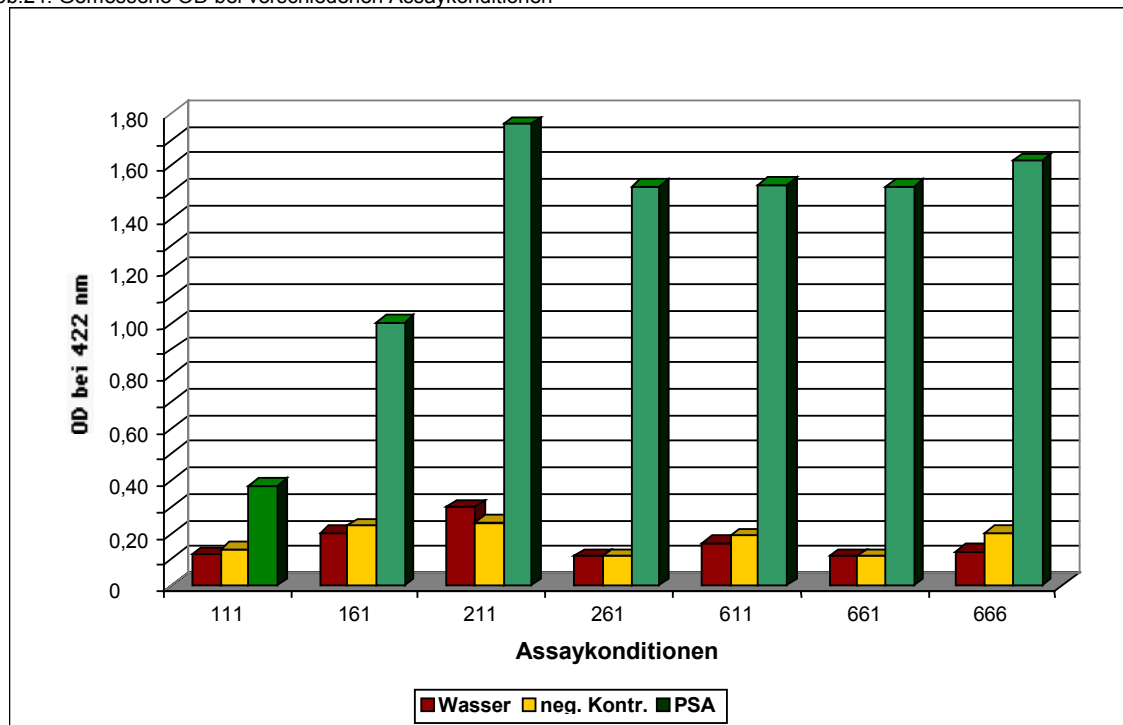
Puffer. Um den Einfluss der Salzkonzentrationen der verschiedenen Puffern bei 37°C Betriebstemperatur zu testen, wurden Kombinationen von Puffern unterschiedlicher Molarität auf ein aufgereinigtes PSA-PCR-Produkt getestet. Als Nullkontrolle wurde im Assay Wasser, als Negativkontrolle ein beliebiges PCR-Produkt (PCR auf CEACAM-1) verwendet. Gewählt wird der Puffer, der die höchste Extinktion bei niedrigstem Salzgehalt zeigt.

Bei Betrachtung der gewonnenen Daten wird deutlich, dass der spezifische Nachweis des PSA-PCR-Produkts vor allem von einer Erhöhung der Salzkonzentration auf 2xSSC im Hybridisierung-Puffer profitiert. Es resultiert eine vierfache Induktion der OD von 1xSSC zu 2xSSC im Hybridisierungspuffer, ohne dass der unspezifische Hintergrund der CEACAM-1 PCR zunimmt. Einer weiteren Erhöhung der Salzkonzentration auf 6xSSC folgt jedoch keine weitere Steigerung in der OD. Ebenso bleibt eine Erhöhung der SSC-Konzentration von 1x auf 6x im Waschpuffer ohne Auswirkung auf die gemessene OD (siehe auch Abb.24).

Tab.10: Gemessene OD bei verschiedenen Assaykonditionen (* = Codierung bezieht sich auf die SSC-Konzentration in den nacheinander folgenden Puffern: Hybridisierungspuffer - Waschpuffer - Detektionspuffer)

Assaykondition	Wasser	neg. Kontrolle (unspezifisches PCR-Produkt)	PSA RT nested PCR Produkt
	Werte in OD	Werte in OD	Werte in OD
111*	0,12	0,14	0,38
161*	0,20	0,23	1,00
211*	0,30	0,24	1,76
261*	0,11	0,11	1,52
611*	0,16	0,19	1,53
661*	0,11	0,11	1,52
666*	0,13	0,20	1,62

Abb.24: Gemessene OD bei verschiedenen Assaykonditionen



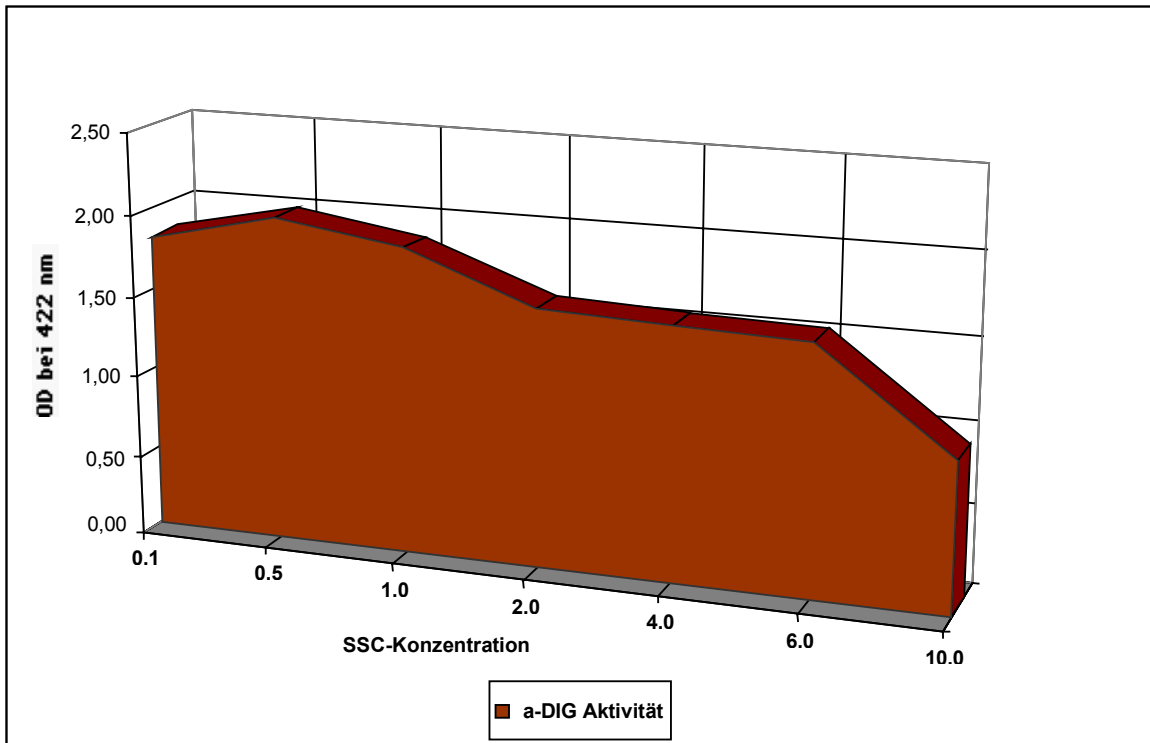
4.7.2 Beeinträchtigung der immunenzymatischen Reaktion von der Salzkonzentration

Der letzte Schritt des ES-300 Nachweises von PSA-PCR Produkten basiert auf einer Antikörper vermittelten, immunenzymatischen Reaktion, wobei ein Phosphatase-gekoppelter Antikörper, welcher gegen Digoxin gerichtet ist, Verwendung findet. Für diese Reaktion galt es zu ermitteln, auf welche Weise sich eine salzabhängige Beeinträchtigung des immunenzymatischen Detektionssystems durch diverse SSC-Konzentrationen im Detektionspuffer auswirkt. Es wurden definierte Mengen von aufgereinigten PSA-PCR Produkt bei einer festen Hybridisierungskonzentration von 6x SSC in die ES-300 Messung geführt, und im Detektionspuffer die SSC-Konzentration zwischen 0,1 bis 10xSSC variiert.

Tab.11: Gemessene OD-Werte in Abhängigkeit von der SSC-Konzentrationen im Detektionspuffer

x SSC	anti-Dig Aktivität (gemessene OD bei 422nm)
0,1	1,83
0,5	2,01
1,0	1,88
2,0	1,58
4,0	1,56
6,0	1,53
10,0	0,93

Abb.25: OD in Abhängigkeit von der SSC-Konzentration im Detektionspuffer



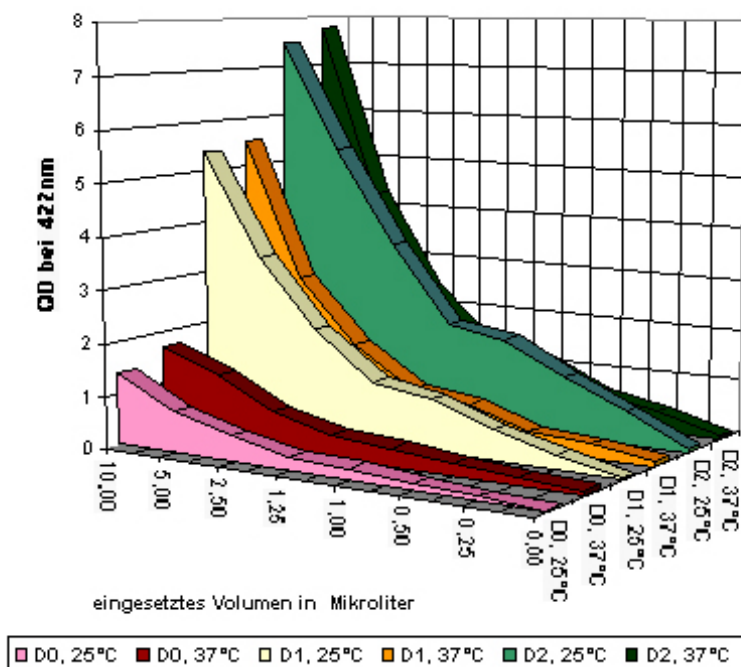
Durch die gewonnenen Daten kann festgehalten werden, dass bei gleicher vorausgegangener Hybridisierung die antikörpervermittelte Reaktion die höchsten OD erzielt, sofern im entsprechenden Puffer der Detektion Salzkonzentration von 0,1 bis 1x verwendet werden. Salzkonzentrationen von 2 bis einschließlich 6xSSC erzielen eine Reduktion und keinerlei Verbesserung im Nachweis. Äußerst hohe Mengen an SSC (hier 10xSSC) führen letztlich zu einer ca. 50%-igen Verringerung der Nachweissignals und sind am ehesten durch eine Beeinträchtigung der Enzymaktivität bedingt als durch eine Beeinflussung der Detektionsfähigkeit des verwendeten Antikörpers.

4.7.3 Einfluß von Oligonukleotidlänge und Hybridisierungstemperatur am ES-300

Um eine stabilere Bindungskinetik und damit eine Amplifikation des Signals des spezifischen PCR-Produkts zu erreichen, wurden neben dem überwiegend eingesetzten Oligonukleotid D0 (17mer) zwei zusätzliche Oligos synthetisiert: D1 (20 mer) und D2 (22mer). Bei den zwei möglichen Reaktionstemperaturen wurde nun die Menge des eingesetzten spezifischen PCR-Produkts titriert. Als Negativkontrolle diente ein unspezifisches PCR-Produkt.

μl Produkt	D0, 25 °C	D0, 37 °C	D1, 25 °C	D1, 37 °C	D2, 25 °C	D2, 37 °C
10,00	1,39	1,72	5,40	5,50	7,46	7,74
5,00	0,81	1,28	3,40	2,86	5,34	4,30
2,50	0,49	0,74	2,10	1,61	3,44	2,44
1,25	0,26	0,44	1,20	0,85	1,97	1,26
1,00	0,23	0,35	1,00	0,70	1,77	1,16
0,50	0,13	0,22	0,60	0,34	1,14	0,64
0,25	0,08	0,15	0,30	0,24	0,64	0,40
0,00	0,02	0,08	0,03	0,08	0,05	0,08
10,00	0,03	0,10	0,30	0,13	0,17	0,55

Tab.12: Einfluss der Oligonukleotidlänge und der Hybridisierungstemperatur auf die spezifisch für PSA-mRNA gemessene OD
 Abb.26: OD Abhängigkeit von Oligonukleotidlänge und der Hybridisierungstemperatur



Es wird deutlich, dass eine Verlängerung der detektierenden Gensonde um 3 bzw. 5 Basen eine Verstärkung des spezifischen PCR-Signals ermöglicht. Der Gewinn an Signalintensität durch eine Verlängerung um zwei Basenpaare liegt unabhängig von der Reaktionstemperatur oder der eingesetzten Menge der Probe von D0- zu D1-Oligo um den Faktor vier; von D0- zu D2-Oligo um den Faktor fünf bis sechs. Unter Verwendung von D1 bzw. D2 Oligo in der Hybridisierung werden ab $1\mu\text{l}$ des eingesetzten PCR-Produkt Werte zuverlässig gemessen, welche über den unspezifisch-negativen liegen. Vergleicht man die gleichen Oligonukleotide untereinander bei zwei wählbaren Reaktionstemperaturen, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

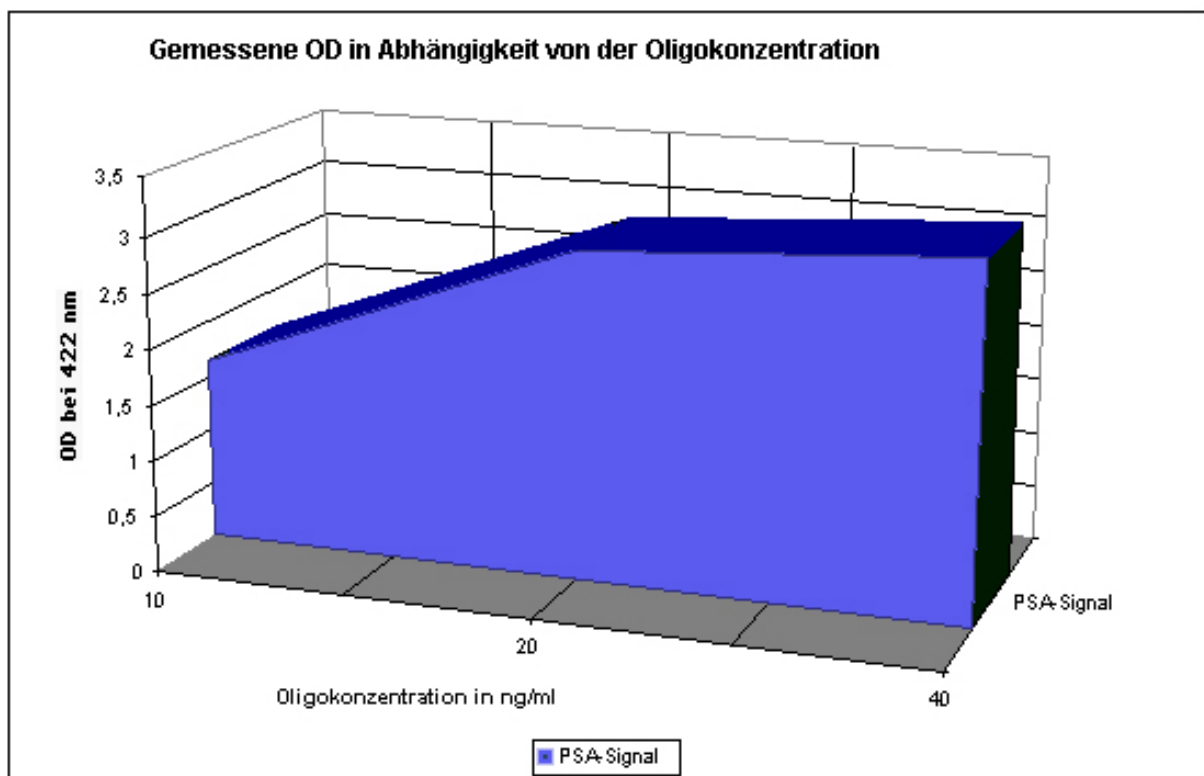
4.7.4 Oligonukleotidhybridisierung (5'-DIG-17mer): Sondenkonzentration und Signal

Bei der Etablierung der Detektion am ES-300 galt es zunächst, die Konzentration der spezifischen Detektionssonde bei einer 37°C Reaktion im Gerät zu testen. Es wurden Konzentration von 0-40 ng/ml im Hybridisierungspuffer bei konstant eingesetzter PCR-Produktmenge titriert.

Tab.13: PSA-Signal in Abhängigkeit von der Oligokonzentration

Oligo (ng/ml)	PSA-Signal
0	
10	1,64
20	2,92
40	3,14

Abb.27: Gemessene OD in Abhängigkeit von der Oligokonzentration



Die ermittelte Kurve verdeutlicht, dass eine Erhöhung der Oligonukleotidkonzentration auf 20 ng/ml im Hybridisierungspuffer durchaus mit einer Verstärkung des PSA-PCR-Signals einhergeht. Eine weitere Steigerung um 20ng auf 40ng/nl führt zu keinerlei weiteren signifikanten Amplifikation des gemessenen Signal bei 422nm.

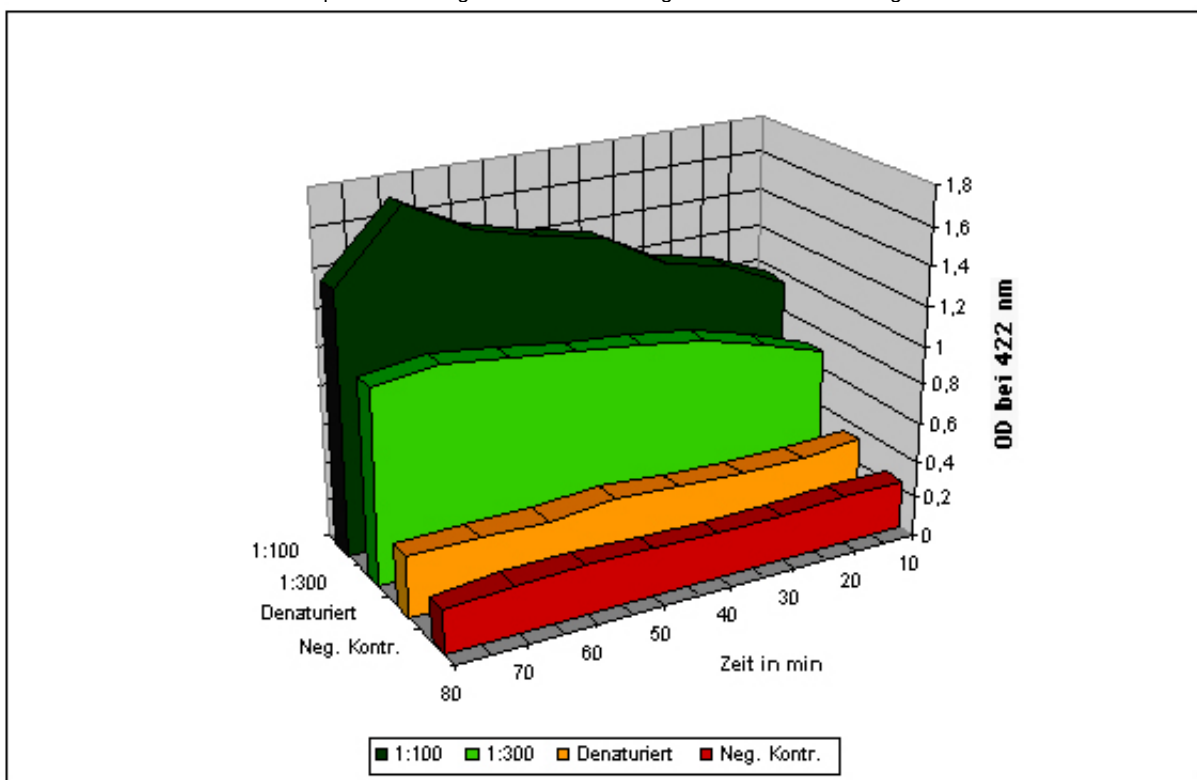
4.7.5 Streptavidinbindungskinetik von beidseitig 5'-markierten PCR-Fragmenten

Eine weitere grundlegende Frage, die beantwortet werden sollte, galt der Bindungskinetik zwischen biotinylierten PCR-Produkt und dem Streptavidin-beschichteten Probenröhrchen. Hierzu wurde eine PCR angesetzt, in der die Primer L282bio und das digoxinierte Detektionsoligo D0 Verwendung fanden. Das entsprechende PCR-Produkt wurde in zwei Verdünnungsstufen getestet. Ferner wurde zur Generierung einer Negativkontrolle dasselbe PCR-Produkt vor seinem Einsatz in 800mM NaOH für 10min 95°C denaturiert. Als weitere Negativkontrolle diente das Amplifikat einer BGP-PCR.

Tab.14: Streptavidinbindungskinetik von beidseitig 5'-markierten PCR-Fragmenten in Verdünnungsstufen

Zeit (min)	1:100	1:300	Denaturiert PCR-Produkt	Neg. Kontr.
10	0,96	0,69	0,33	0,25
20	1,11	0,8	0,31	0,25
30	1,18	0,9	0,32	0,23
40	1,38	0,94	0,33	0,23
50	1,45	0,98	0,35	0,24
60	1,54	1,02	0,32	0,25
70	1,72	1,06	0,33	0,24

Abb.28: Streptavidinbindungskinetik von beidseitig 5'-markierten PCR-Fragmenten



Anhand der gemessenen Werte wird deutlich, dass schon nach 10min Inkubation des spezifischen PSA-PCR Produkts im Probenröhrchen ein positiver Wert, der sich klar vom Hintergrund der Negativkontrollen abhebt, in beiden Verdünnungsstufen messbar ist. Ferner wird das gemessene

Signal um so höher, je länger die Inkubation andauert, wobei das Maximum bei 70min lag (längere Inkubation erzielten keine höheren Signale).

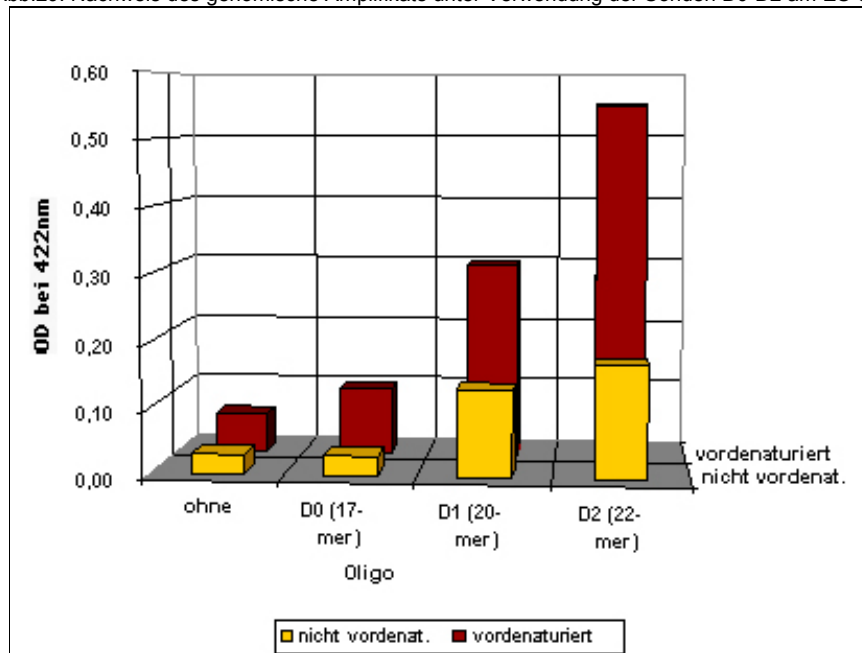
4.7.6 Denaturierungsbedingungen für den Nachweis des genomischen PSA-Fragments (1,9 kb)

Um eine Positivkontrolle für die beiden PCRs zu erlangen, welche im ES-300 unter Verwendung derselben detektierenden Gensonde jedoch ein schwächeres Signal ergibt, diente die 1,9 kb große Bande des genomischen Fragments. Das genomische Fragment sollte bei fehlender PSA cDNA oder bei geringer Menge dieser (co-)amplifiziert werden und im ES-300 durch eine Teilhybridisierung der Hybridisierungssonde nachweisbar sein, jedoch ein deutlich schwächeres Resultat in der optischen Dichte liefern. Da die erwähnte Bande jedoch um ein Vielfaches größer als die cDNA Bande ist, wurde getestet, ob eine Vordenaturierung der PCR-Produkte für 10min bei 94°C in 800mM NaOH eine Verstärkung des genomischen Signals ermöglicht. In dieser Reihe wurden alle drei Oligonukleotide D0-D2 getestet.

Tab.15: Nachweis des genomischen PSA-Fragments (1,9 kb)

Oligo	nicht vordenaturiert	vordenaturiert
Ohne	0,03	0,06
D0 (17-mer)	0,03	0,10
D1 (20-mer)	0,13	0,30
D2 (22-mer)	0,17	0,55

Abb.29: Nachweis des genomische Amplifikats unter Verwendung der Sonden D0-D2 am ES-300



Die Grafik verdeutlicht, dass der Nachweis des genomischen Amplikats im ES-300 durchaus möglich ist. Das gemessene Signal ist dabei umso höher, je länger die eingesetzte Gensonde ist, was durch eine größere Menge an partiell-hybridisierenden Produkten erklärbar ist. Ferner zeigen die ermittelten OD-Werte stärkere Ausschläge zugunsten der Vordenaturierung in NaOH. Erklärend kann hier erwähnt werden, dass eine kurze Denaturierung für kürzere PCR-Produkte ausreichend sein mag, größere Amplikate jedoch nur insuffizient denaturiert sind und somit einer folgenden Hybridisierung nicht zur Verfügung stehen. Abschließend erreichen die Werte jedoch nicht eine optische Dichte, die bei spezifischen PCR-(cDNA) Produkten erzielt werden (siehe Tabelle oben).

4.7.7 Vergleich der Detektionssysteme

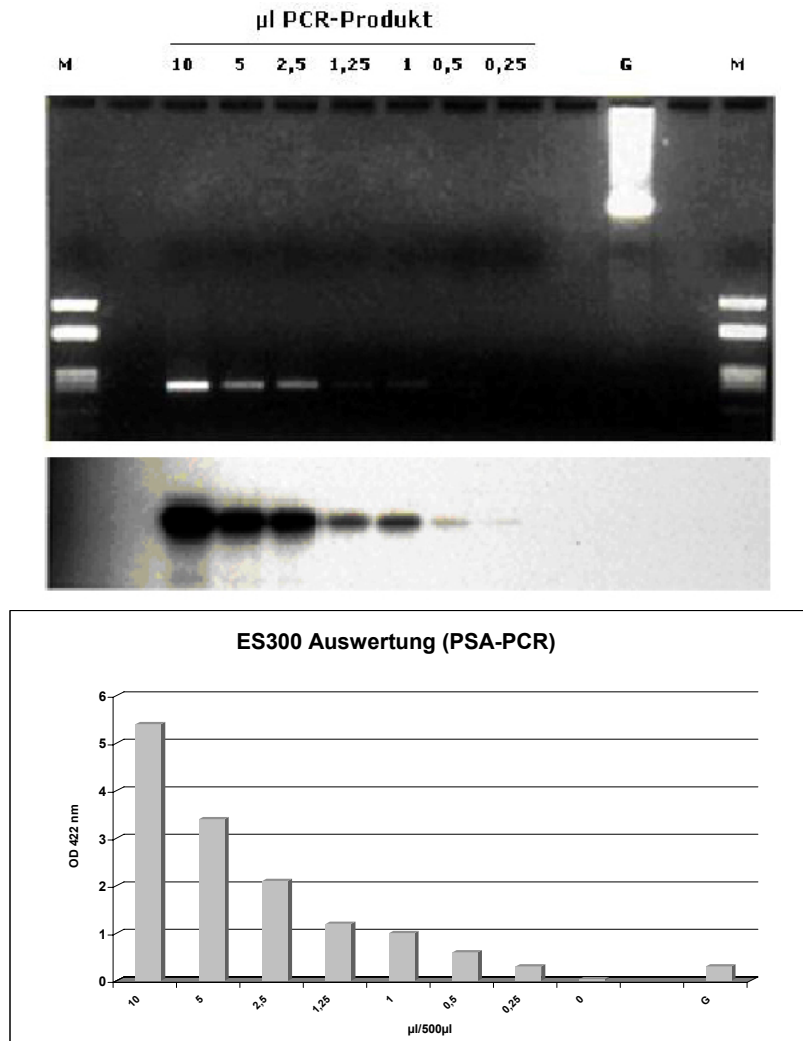
Um einen Vergleich zwischen der Methode der automatischen PCR-Produkt Analytik am ES-300 und dem klassischen Southern-Blot zum Nachweis von PCR-Proben zu ermöglichen, wurde aufgereinigtes PCR-Produkt im ES-300 Nachweis ausgetitriert. Parallel dazu wurde im klassischen Nachweis des Ethidiumbromid-Agarosegel dasselbe Volumen appliziert und folgend ein Southern Blot dieses Gels erstellt.

Beim direkten Vergleich der Nachweise von aufgereinigten PCR-Produkten ergibt sich ein deutlicher Sensitivitätsvorteil auf Seite des ES-300. Erklärend sei hier vermerkt, dass durch die erneute Amplifikation des Signals im ES-300 der Sensitivitätsvorteil auftritt. Volumina, die im Agarosegel nicht erkennbar sind, geben in der ES-300 Detektion ein deutliches Signal, welches über dem Hintergrund des genomischen Amplifikats liegt. Der wesentlich zeitaufwendigere Southern Blot ermöglicht zwar ebenfalls eine sensitive Detektion selbst sehr geringer Mengen des PSA-PCR Produkts, so war jedoch

der Nachweis des genomischen 1,9 kb-Fragment hier, wohl wegen der stringenteren Waschung bei höheren Temperaturen, nicht nachvollziehbar. Bei paralleler Detektion des genomischen Amplifikats konnten im ES-300 in titrierbare Weise das PSA cDNA Signal erfaßt werden.

Somit ist der ES-300 als Methode der automatischen PCR Analytik vergleichbar mit dem 'Goldstandard' Southern-Blot.

Abb.30: Titration von aufgereinigten PCR-Produkten im Agarose-Gel, Southern-Blot und im ES-300 unter Verwendung der Sonde D1



Legende: M: Molecular Weight Marker; G: 10µl genomisches Amplifikat aus PSA-PCR

5. Diskussion

5.1 RT-PCR in der Tumordiagnostik - ein neues diagnostisches Fenster

Das klinische Staging, welches die Basis zur Festlegung der nachfolgenden Therapie darstellt, ist für die individuelle adäquate Behandlung des Prostatakarzinoms und von Malignomen generell problematisch. Trotz der Fortschritte in bildgebenden Verfahren, wie Computer Tomographie (CT), Magnet Resonanz Tomographie (MRT) und transrektaler Ultraschall Sonographie (TRUS), werden ca. 50% aller lokalbegrenzten Erkrankungen zum Zeitpunkt des Stagings falsch, d.h. zu niedrig eingestuft (Catalona WJ et al, 1990; Wahle S et al 1990; Epstein JI et al 1993), so dass die angewandten Diagnostika als Gesamtheit bezüglich ihrer diagnostischen Sensitivität verbessert werden müssen.

Darüber hinaus wird neben weiteren z.B. bildgebenden diagnostischen Methoden in der klinischen Routine durch die Bestimmung von Tumormarkern auf Proteinbasis der Therapieerfolg der operativen Behandlung beurteilt. Tumormarker stellen jedoch per se kein Malignitätskriterium dar, zumal sie auch in erhöhten Spiegeln bei benignen Erkrankungen zu finden sind und somit im Bereich der diagnostischen Sensitivität und Spezifität Schwächen aufzeigen (Thomas L, 1992). Anders verhält es sich jedoch, wenn Tumormarker (z.B. PSA) nach Tumorextirpation z.B. eines Prostatakarzinoms im Serum nachgewiesen werden. Hier gilt ein positiver Wiederanstieg des Markers als sicheres Zeichen einer rekurrenden Erkrankung. Mit der Entwicklung sehr sensitiver molekularbiologischer Methoden wie der PCR und anderen Amplifikationstechniken sollte der Nachweis von verbliebenen und metastasierenden Tumorzellen früher gelingen. Hierbei wurden Mutationen oder die Expression tumorspezifischer Antigene als Ziel der Detektion in Betracht gezogen. Bei diesen Ansätzen ist zu berücksichtigen, dass zwar größtenteils die gleichen diagnostisch genutzten Tumormarker betrachtet werden, jedoch der Ansatz der Betrachtung dieser ein gänzlich anderer ist.

Während bei der Detektion von Proteinantigenen das Protein detektiert wird und die Spezifität durch das tumorassoziierte Antigen und die verwendeten Antikörper erlangt wird, sind es bei den molekularbiologischen Methoden die Nukleinsäuren der Tumorzelle. Das Ziel der Detektion eines solchen Assays unterliegt anderen Regulations- und Stabilitätskriterien als ein translatiertes Protein.

Eine DNA-Sequenz, welche wie bei der CML das Philadelphia-Chromosom als tumorspezifisch charakterisiert ist, liegt in doppelsträngiger Form einmal in sehr stabiler Form in der entarteten Zelle vor. Im Gegensatz hierzu ist die Detektion und deren Interpretierbarkeit eines Analyten auf mRNA-Basis schwieriger. Messenger-RNA (mRNA) stellt für sich eine Untergruppe der heterogenen Substanzklasse der Ribonukleinsäuren dar, welche unter physiologischen Bedingungen eine kurze Halbwertszeit besitzt. RNA-Stabilität kann zwar durch AU-reiche Sequenzen am 3'-Ende oder durch Aktivierung intrazellulärer Kinasen erhöht werden, jedoch ist mRNA als Zielmolekül innerhalb eines spezifischen Detek-

tionsassays durch ubiquitär presente RNAsen permanent gefährdet, degradiert zu werden. Darüber hinaus spielt für die Detektion einer spezifischen mRNA, auch eine unterschiedliche Kopienanzahl und deren Beeinflussung durch extrazelluläre Signale oder Zellzyklusbedingungen eine Rolle. Andererseits liegt mRNA beim Vergleich mit DNA in einer vielfachen Kopienzahl vor, so dass hier ein Detektionsvorteil besteht. Beide Punkte standardmäßig miteinander zu vergleichen, ist nicht möglich, zumal zellspezifische Schwankungen bei Assays, die eine einzelne Zelle fassen können - gerade die mRNA-Expression betreffend - nicht endgültig fassbar sind.

5.2 Standardisierung der RT-nested-PCR

In den vergangenen Jahren wurden eine beträchtliche Anzahl von PSA RT-PCR Testansätzen mit vergleichbaren Leistungsmerkmalen bezüglich des Sensitivitätslimits publiziert. Jedoch zeigen viele dieser Tests in gleichen klinischen Stadien deutlich unterschiedliche Ergebnisse. Dies führte zu kontroversen Interpretationen über die Praktikabilität der PSA RT-PCR (Diamandis EP et al., 1995a). Ein Teil des Problems mag in präanalytischen Unwägbarkeiten und einem Mangel an Standardisierung unter den Assays liegen, ein anderer mag durch stochastische Effekte an der Sensitivitätsgrenze der Assays erklärt werden.

Das hier vorgestellte PSA RT-PCR Protokoll vermeidet konkret Einflüsse, die zu einer verminderten Sensitivität führen würden, was für den Assayaufbau einerseits bedeutet, dass das Zielmolekül bestmöglich konserviert, andererseits Störfaktoren weitestgehend ausgeklammert werden mussten.

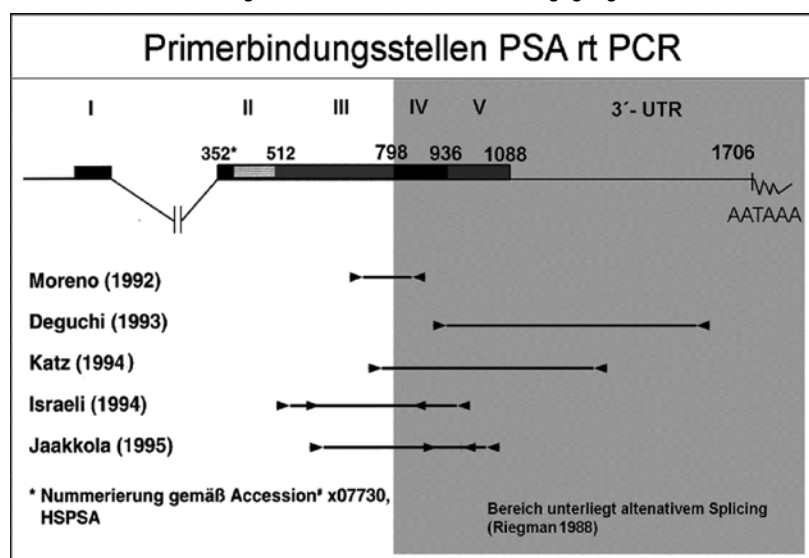
Zur Materialgewinnung wurden strikt K-EDTA antikoaguliertes Blut verwendet, da für Heparin schon in geringsten Spuren von 0,05 U/ml eine inhibitorische Wirkung auf die Taq-Polymerase gezeigt wurde (Holodniy et al 1991).

Die der Probengewinnung unmittelbar folgende komplette GITC-Lyse auf Station führte zu einer raschen und sicheren Stabilisierung des RNA-Analyten. Ein Proben-transport von nativem Material innerhalb von 2-3 Stunden ins Labor mit folgender Lyse wäre für diese Testung ungeeignet, zumal dies zu einer ausgeprägten Degradation der RNA führen würde. Durch die Lyse freigesetzte, stark Polymerase-inhibierende Substanzen wie Hämoglobin (Rolfs et al. 1992) konnten durch das Aufbereitungsprotokoll effizient entfernt werden, so dass eine einzelne PSA mRNA positive LNCAP-Zelle in 1ml K-EDTA Blut – entsprechend 10^7 kernhaltigen Leukozyten - detektiert werden konnte. Das Sensitivitätslimit entspricht dem anderen vorläufig publizierten PSA RT-PCR Assays. Im Vergleich zur Dichtegradientenzentrifugation, welche ebenfalls hämoglobinhaltige Zellen effektiv entfernt, bietet sie jedoch den Vorteil, dass die gesamte Probe in die RNA-Präparation eingeht und nicht nur ein Zellen eines bestimmten Sedimentationsverhaltens. Ferner gibt es keinerlei Auskünfte über einen etwaigen Verlust epithelialer Tumorzellen innerhalb einer Dichtegradientenzentrifugation. Innerhalb dieses Aspektes sind Aussagen über die tatsächliche quantitative Wiederfindung der Zielzellen nicht fällbar. Auf eine RNA-

Präparation mittels magnetischen Beads wurde in unserem Ansatz verzichtet, um eine ausreichend hohe Konzentration an GITC zu benutzen.

Innerhalb der RT-PCR wurden Oligonukleotide benutzt, welche ausschließlich in den Abschnitten der Exon 2 und 3 des PSA Gens binden, um möglichst alle mRNA Splicevarianten des PSA mit dem Assay zu erfassen. Mindestens sieben PSA mRNA-Splicevarianten konnten durch Northern Blot Untersuchungen und Klonierungsstudien gezählt werden. Es ist durchaus vorstellbar, dass alternatives Splicing die PSA-Detektionsrate von Assays, welche auf jenseits von Exon 3 bindenden Primern basieren, in individuellen Tumoren beeinflusst.

Abb.31: Primerbindungsstellen in PSA RT-PCRs vorangegangener Publikationen



Eine weitere Anstrengung innerhalb der Standardisierung lag in der Qualitätssicherung der RNA-Präparation für jegliche Probe durch eine der PSA RT-PCR vorgeschalteten β 2-Mikroglobulin PCR (Abb.10). Diese wurde, um einen Sensitivitätsverlust in der PSA RT-PCR zu vermeiden, nicht als multiplex-PCR, sondern parallel durchgeführt. Eine Multiplex-PCR stellt zwar ein material- und kosten-schonenderes Verfahren dar, beinhaltet jedoch auch die Notwendigkeit einer komplizierten Etablierung und einen möglichen Sensitivitätsverlust, zumal die in einer PCR verwendeten Primer vermehrt Dimere bilden können und bei der Ermittlung der einzustellenden Hybridisierungstemperatur mehrere Primer Berücksichtigung finden müssen. Des weiteren wird von Beginn der PCR an die Konzentration der zugegebenen DNA so erhöht, dass auch die Konzentration von $MgCl_2$ angeglichen werden muss.

5.3 Bisherige RT-PCR zum Nachweis PSA-exprimierender Zellen

Die hohe Sensitivität und Spezifität der RT-PCR ermutigte zahlreiche Arbeitsgruppen, die mRNA-Expression biologischer Marker, welche als prostataspezifisch gelten, im peripheren Blut und Knochenmark bei Patienten mit Prostatakarzinom zu untersuchen.

Moreno et al. demonstrierten als erste (Moreno, et al 1992), dass via PCR-Amplifikation der spezifische Nachweis Prostata-spezifischer Genexpression mit einer Empfindlichkeit für eine einzelne Tumorzelle im peripheren Blut gelingt. In den folgenden Jahren erschienen zahlreiche Veröffentlichungen zum RT-PCR-Nachweis einzelner Prostatakarzinomzellen bei soliden Tumoren, wobei hier das Prostata-spezifische Antigen (PSA) und das Prostata-spezifische Membranantigen (PSM) voranstellen (Moreno et al., 1992; Deguchi et al., 1992; Israeli et al., 1994; Katz et al., 1994; Seiden et al., 1994; Wood et al., 1994; Cama et al., 1995; Ghossein et al., 1995; Jaakkola et al., 1995). Trotz vielerlei Unterschiede im Aufbau der Nachweismethoden, wie z.B. Gewinnung der RNA, Primerbindungsstellen, Anwendung einer einfachen oder einer nested-PCR und unterschiedlicher Polymerasen und Transkriptasen, können vergleichbare hohe Sensitivitäten in Kalibrationsexperimenten durch Verdünnungsreihen von PSA-mRNA-positiver Zellen in negativen Zellen gezeigt werden. Ebenfalls wurden vergleichbare Patientengruppen untersucht.

Dennoch fallen bei Betrachtung der Ergebnisse der diversen Forschungsgruppen erhebliche Divergenzen auf: Israeli et al. detektierten PSA- und PSM-exprimierende Zellen in 77 Patienten mit Prostatakarzinom in 8% bzw. 63%, wogegen Cama et al., abhängig vom Tumorstadium, die PSA RT-PCR in 67-87% klar überlegen gegenüber der PSM RT-PCR sehen (16-50%). Bei Patienten mit organbegrenzten Tumoren fand Israeli et al. 0/18 positive Ergebnisse mittels PSA RT-PCR, wogegen Cama et al. 27/80 positiv testeten. Jaakkola et al. zeigten, dass Ergebnisse ihrer spezifischen PSA RT-PCR keinerlei Korrelation zur PSA-Konzentration oder zur Tumorausdehnung aufwiesen. Selbst Patienten mit massiv erhöhten PSA-Konzentrationen und ausgedehnten und sicher nachgewiesenen Metastasen zeigten negative Resultate in ihrer PSA-RT-PCR. Loric et al. berichten über die Überlegenheit der PSM RT-PCR im Vergleich zur PSA-RT-PCR. Sie ermittelten, dass positive Resultate in der PSA-RT-PCR beschränkt waren auf Patienten, welche sich in frühen Tumorstadien befanden, wogegen PSM-positive Testergebnisse in jeglichem Tumorpatienten nachweisbar waren.

Selbst Arbeitsgruppen (Olsson et al., 1996; Ellis et al., 1998; Katz et al., 1994; Cama et al., 1995), welche die methodisch selbe RT-PSA-PCR mit identischen Oligonukleotiden, RNA-Extraktionsmethode und PCR-Protokoll durchführten, veröffentlichten unterschiedliche Ergebnisse. Allen vier Veröffentlichungen ist gemeinsam, dass die Detektionsraten für Patienten mit metastasiertem Karzinom höher lagen als für Patienten mit lokal begrenztem Karzinom. Während Cama et al. in 16/20 (80%) Fällen ein positives Testergebnis bei Patienten mit metastasiertem Karzinom beschreibt, findet Ellis dies mit derselben PCR nur in 7/18 Proben. Deutlicher ist der Unterschied bei Patienten mit lokal begrenztem Prostatakarzinom der Stadien T1-2: Wo Katz et al. in 38% (25/65) und Cama in 76% (36/50) der Patientenproben ein positives Resultat erzielt, detektiert Ellis et al dies nur in 11% (3/18) der betroffenen Patienten mit derselben RT-PCR.

Tab. 16: Vergleich zwischen Veröffentlichungen und Abstracts, die die Effizienz von RT-PCR bei der Detektion von PSA-mRNA

im peripheren Blut untersuchen		
Referenz	Characteristika (stage)	RT-PCR Assays - % pos. (No./total)
Moreno et al	Metastasiert (D0-3)	33 (4/12)
Katz et al	Klinisch lokalisiert (T1-2)	38 (25/65)
Isrsele et al	Metastasiert	78 (14/18)
	post-radikaler Prostatektomie	3 (1/33)
	Metastasiert	25 (6/24)
Seiden et al	Klinisch lokalisiert	6 (6/100)
	Metastasiert	31 (11/35)
Cama et al	Klinisch lokalisiert	76 (38/50)
	Metastasiert	80 (16/20)
Jaakkola et al	Klinisch lokalisiert	0 (0/7)
	Metastasiert	50 (9/18)
Israeli et al	post-radikal Prostatektomie	0 (0/13)
	Metastasiert	22 (2/9)
Ghossein et al	Organ begrenzt	16 (4/25)
	Stage T3-4 N-	30 (3/10)
	Fernmetastasen	35 (25/72)
Oefelein et al	Präop.	27 (6/22)
	Intraop.	55 (12/22)
Olsson et al	Histologisch lokalisiert (clinical T1-T2c)	12 (7/59)
	Histologisch extended (clinical T1-T2c)	61 (29/41)
Sokoloff et al	pT1 and pT2	56 (32/57)
	pT3	92 (12/13)
	Metastasiert	88 (29/33)
Moreno et al	Transrectal ultrasound/transurethral resection of prostate/radical prostatectomy preop	4 (2/57)
	Transrectal ultrasound/transurethral resection of prostate/radical Prostatektomie postop	18(10/57)
Oefelein et al	radikal Prostatektomie präop.	25 (7/28)
	radikal Prostatektomie postop.	50(14/28)
Wood et al	unbehandelt metastasiert (M+)	53 (8/15)
	PSA stable metastasiert	32(7/22)
	Hormon-refraktär M+	47 (8/17)
Dumas et al	Lokalisiert (T2,T3,M0)	11 (3/27)
	Metastasiert (T3 M-, T4.M+)	57(17/33)
Ellis et al	Lokalisiert (stage O-C)	11 (2/18)
	Metastasiert (stage C-D)	39 (7/18)
	Hormone empfindlich	10 (3/29)
	Hormone refraktär	71(10/14)
Sokoloff et al	Kryochirurgie/needle/radikal Prostatektomie präop.	36(4/11)
	Kryochirurgie/needle/radikal Prostatektomie postop.	36 (4/11)

Widersprüchlich sind weiterhin die Resultate der PSA- bzw. PSM-RT-PCR bei Patientengruppen, die von keinerlei nachgewiesenen malignen Erkrankung betroffen waren. Patienten, die unter der gutartigen Hyperplasie der Prostata leiden, waren in den erstgenannten Publikationen häufig als Kontrollgruppe geführt worden und wiesen einheitlich negative Ergebnisse auf, was der Vorstellung entsprach, dass disseminierte Zellen in der peripheren Blutbahn nur ein Charakteristikum eines malignen Geschehens ist. Neue Information (zum Nachweis PSA-mRNA exprimierender Zellen im peripheren Blut) liefert eine Arbeitsgruppe mit einem Protokoll, welches 40 Zyklen beinhaltet, die Oligonukleotide in Exon 1 und 2 lokalisiert und damit alle bekannten Splicevarianten der PSA mRNA (z.B. PA 75, PA 424 und PA 525) berücksichtigt (Thiounn N et al., 1997). 8/94 (8.5%) der untersuchten Patienten mit benigner Prostatahyperplasie und 9/51 (17.6%) Patienten mit nicht prostatistischer Erkrankung wurden in ihrem Assay positiv getestet. In der Gruppe der Patienten mit PCa im Stadium T1 und T2 lag die Detektionsrate bei 10/46 (22%). Das Auffinden von PSA mRNA exprimierenden Zellen im Blut bei Patienten ohne bekannte Erkrankung bzw. bei Patienten ohne prostatistische

Erkrankung wird auch mit Oligonukleotiden, die in den Exons 3 bis 5 positioniert werden von einer deutschen Arbeitsgruppe berichtet: Sie finden drei von zehn positive Resultate, bei gesunden Männern, als auch bemerkenswert bei gesunden Frauen. Der Prozentsatz positiver Signale in der Gruppe liegt in ihrer Studie in der BPH-Gruppe mit 54% (6/11) sogar höher als in der Patientengruppe mit PCa 52% (5/12) (Henke et al., 1997), was die nicht mangelhafte diagnostische Spezifität von RT-PCR auf PSA-mRNA verdeutlicht.

In Moreno et al. Veröffentlichung konnten keine PSA-spezifischen Amplicons bei Patienten mit BPH und hohen PSA-Spiegel präoperativ nachgewiesen werden. Jedoch konnte mittels RT-PCR verdeutlicht werden, dass Manipulationen operativer oder bioptischer Art an der maligne oder benigne erkrankten Prostata zu positiven Testergebnissen in der RT-PCR führen. Moreno et al. konnten mit seiner PCR zeigen, dass von 42 RT-PCR-negative Patientenproben, welche vor der Manipulation entnommen wurden, 4 (9.5%) Patienten in 60min nach Behandlung durch TRUS (n=39) oder TURP (n=3) entnommenen Proben positive Ergebnisse aufwiesen und zwar unabhängig davon, ob ein malignes oder benignes pathologisches Geschehen der Prostata zugrunde liegt. Hervorzuheben ist einerseits, dass alle drei Patienten, die sich einer TURP unterzogen, eine "Konversion" zeigen, andererseits, dass selbst Patienten mit fortgeschrittenen PCa und hohen PSA-Konzentrationen von 70 ng/ml ein positives Signal präoperativ und postoperativ vermissen lassen. Der Autor kommt folgend zur Empfehlung, dass ähnlich wie bei der PSA-Protein Konzentrationsbestimmung die Probengewinnung für die RT-PCR vor der Durchführung einer TRUS bzw. TRUP erfolgen muss (Moreno et al., 1997).

Im Vergleich zwischen PSA-mRNA und KLK2-mRNA als Targetmolekül einer RT-PCR ermittelten Corey et al., dass bei 63 aus peripherem Blut und Knochenmark gewonnenen Proben von Patienten mit Prostatakarzinom vor radikaler Prostatektomie die PSA-RT-PCR in beiden Untersuchungsmaterialien und in allen Tumorstadien die höheren Detektionsraten ermittelte. Beeindruckend ist, dass für beide gewebspezifischen Marker die Detektionsraten im Knochenmark (PSA: 45/63=71,4%; KLK2: 26/63=41,3%) höher liegen als in den peripheren Blutproben (PSA: 12/63=19%; KLK2: 8/63=12,7%), was durch eine höhere Expression von PSA-mRNA verglichen zu KLK2-mRNA erklärt sein mag (Young et al). Eine Erklärung für die höhere Detektion beider Marker im Knochenmark verglichen zum peripheren Blut mag einerseits in der Filter- und Proliferationsfunktion selbst, andererseits in der sehr guten Durchblutung des Knochenmarks liegen. Ferner ist der Knochen die häufigste Fernmetastasierung beim PCa schlechthin, wobei die Faktoren, die die ossäre Fernmetastasierung gerade beim PCa und z.B. Mammakarzinom bewirken, weiterer Klärung bedarf.

5.4 Die Expression-PSAmRNA ist nicht Prostata-spezifisch

Für PSA und für viele weitere Zielmoleküle von RT-PCRs zum Mikrometastasennachweis sind die Daten zur mRNA Expression und deren Beeinflussung durch verschiedene Stimuli (z.B. hormonelle Stimulierung, Zellzyklus oder Apoptose) kaum vorhanden. Zwar ist bekannt, dass Androgene die PSA-mRNA-Spiegel bei der humanen Tumorzelllinie LNCaP erhöhen, jedoch stellen Androgene bei Patienten unter antiandrogener Therapie kein Kriterium mehr dar. Die Übertragbarkeit solcher Befunde, die unter Zellkulturbedingungen gewonnen wurden, auf in vivo-Situationen ist schwierig, zumal man einzelne Zellen detektieren kann, andererseits wenig weitere Faktoren kennt, die die PSA mRNA - Spiegel erhöhen oder negativ beeinflussen können.

Komplizierend kommen Ergebnisse von diversen Gruppen hinzu, die eine PSA-mRNA Expression von nicht prostatistischen Zellen berichten (Gala et al 1998, Thiounn et al 1997, eigene Arbeit siehe Abb. 22 bis 24). Bei einer systematischen Untersuchung diverser Tumorzelllinien finden Gala et al sowohl in hämatologischen (z.B. Jurkat, U937, IM9), als auch in nicht hämatologischen Zelllinien (MCF-7) in repetitiven PCR-Testungen für PSA und PSM positive Resultate. Die in einigen Publikationen als Negativkontrolle verwendete Mammakarzinomzelllinie MCF-7 (Israeli et al) wird in 10/39 (25,6%) Testungen positiv für PSA und für PSM in 100% der 19 Testungen nachgewiesen. Die höchste Detektionfrequenz von PSA-mRNA konnte von der Arbeitsgruppe in den Zelllinien IM9 ($21/26 = 80,8\%$) und in der lymphoblastischen Jurkat T-Zelllinie ($22/30=73\%$) erzielen. Nur drei der in dieser Arbeit vorgestellten 13 untersuchten Zelllinien zeigen in repetitiven Assays für die zwei prostata-spezifischen Marker PSA und PSM konstant negative Ergebnisse: HL-60, CHO und K652. Auch innerhalb dieses RT-PCR-Ansatzes auf PSA-mRNA wurde bei diversen Tumorzelllinien ein positives Ergebnis nachgewiesen (s. Abb. 22 bis 24). So sind u.a. die Zelllinien A458, MDA-435 und MCF-7 PSA-mRNA positiv getestet worden.

In Galas Studie wurden ferner gesunde Männer und Frauen auf eine nachweisbare PSA-mRNA im peripheren Blut untersucht. Gala und Mitarbeiter finden bei 17 auf PSA-mRNA untersuchten Männern im Alter von 21-47 Jahren in zwei Fällen positive Resultate (11,8%). In repetitiven Testungen der Patientenproben sank die Positivitätsrate der untersuchten auf 3,0%. Für PSM als weiteren namentlich prostata-spezifischen Marker lag die Rate der positiven Ergebnisse um ein Vielfaches höher: 16/17 (94,1%) Männer wiesen nachweisbare PSM-mRNA im peripheren Blut auf. Erstaunlich ist bei der Untersuchung weiterhin, dass die untersuchten Frauen (im Alter von 23-70) im gleichen Assay sogar höhere Positivitätsraten zeigen als die Männer - PSA: 4/14 (28,6%); PSM: 8/8 (100%). Was für einen klinischen Assay, der nur bei Männern Anwendung finden dürfte, sicherlich weniger wichtig erscheint, vermittelt jedoch einen Eindruck über die relative Unspezifität zumindest von PSM-mRNA im peripheren Blut von gesunden Individuen und somit die Unbrauchbarkeit von PSM-mRNA als Marker für bestehendes bzw. rezidivierendes PCa. Bei den in dieser Arbeit untersuchten Proben von gesunden Patienten konnte in Gegensatz zu Galas RT-PCR jedoch kein positives Ergebnis nachvollzogen werden trotz 5-maliger, repetitiver Testung aus einer Probe.

Ein zusätzliches Kriterium, welches ein positives, unspezifisches und nicht mit einem malignem Geschehen in Verbindung zu bringendes Ergebnis bedingen mag, wird von Gala et al durch die Erhöhung

der Zykluszahlen demonstriert. Wird aus dem gleichen Ausgangsmaterial - sei es nun Tumorzelllinie oder Patientenmaterial - eine RT-nested PCR mit 2 x 19 Zyklen gefahren, so sind alle untersuchten Tumorzelllinien negativ. Durch die Erhöhung der Zykluszahlen auf 2 x 25 in der ersten und nested PCR steigt die Positivitätsrate jedoch auf bis zu 100% bei bestimmten Zelllinien. Gleiches gilt für den Nachweis von PSM-mRNA durch nested RT-PCR, welcher im Gegensatz zum PSA-mRNA Nachweis auch bei Patientenproben unter höheren Zyklusbedingungen größere Detektionsraten zeigt.

Bis heute ist nicht deutlich, ob die Methode des PCR gestützten Nachweises von Mikrometastasen von klinischem Wert als Vorsorge- oder Verlaufsparmeter ist. Das Wissen um den positiven Nachweis von PSA-mRNA bei anderen (nicht prostatisch) malignen Erkrankungen aber auch bei gesunden Männern und Frauen fordert eine weitere Verfeinerung der bestehenden Assays in quantitativer Hinsicht. Bei Anwendung des vorgestellten RT-PCR Assays auf klinische Blutproben von PCa-Patienten konnten PSA mRNA-positive Zellen in peripheren Blut nachgewiesen werden (32/40 Patienten=80 %). Der beobachtete kumulative Zuwachs positiver Ergebnisse am Sensitivitätslimit des Assays steht in Übereinstimmung zu dem statistischen Modell der Poisson'schen Verteilung (s.4.6.2). Praktisch würde dies jedoch bedeuten, dass eine Abarbeitung einer Patientenprobe im Höchstfall 5 repetitive Analysen aus einer Probe bedeuten würde. Zwar ist die benötigte Menge an K-EDTA Blut des Patienten gering, doch steht dem der enorme Kosten- und Zeitaufwand innerhalb der Laboratoriumsdiagnostik gegenüber. Es ergibt sich unweigerlich die Notwendigkeit einer internen Kontrolle und einer Quantifizierung der Ergebnisse. In dieser Arbeit werden erste Ansätze zur automatisierten Quantifizierung von RT-PCR Ergebnissen vorgestellt. Die quantitative Detektion der PSA-Amplicons war spezifisch und bedarf nur weniger Handpipettierungen. Als interne Kontrolle sollte das genomische Amplifikat von PSA (1,9kb) dienen, welches durch Teilhybridisierung nachzuweisen war. Da dieses Amplifikat unabhängig von dem cDNA Signal jedoch nicht reproduzierbar nachweisbar war (s. Abb. 16, 17), konnte es nicht als interne Kontrolle der PCR und der folgenden ES-300 Auswertung verwendet werden.

Eine quantitative RT-PCR (QRT-PCR), die eine Differenzierung zwischen malignen und benignen Gewebe anhand der Quantität der detektierten PSA-mRNA Moleküle vorschlägt, wurde von Ylikoski et al. untersucht. Die Technik des internen RNA-Standard gilt mittlerweile jedoch als überholt, da sie nicht ausschließen kann, dass eine der beiden Sequenzen (interner Standard versus spezifische mRNA) die gleichen Amplifikationschancen in der Reaktion besitzen bzw sich gegenseitig negativ beeinflussen. Auch bei klinischer Anwendung des Assays fiel die fehlende Korrelation zu PSA-Protein Spiegeln bei Patienten mit fortgeschrittenen PCa auf. Obgleich klinische Proben von Patienten mit fortgeschrittenem PCa wiederholt in drei Analysen untersucht wurden, konnten in 40% (4/10) der Fälle keine PSA-mRNA nachgewiesen werden.

Zusammengefaßt stellen diese und die zuvor dargelegten Patientenbefunde den klinischen Wert einer RT-PCR auf PSA-mRNA in der Diagnose und als Verlaufsparmeter aufgrund der nicht befriedigenden diagnostischen Spezifität sehr in Frage. Obwohl PSA serologisch einer der spezifischsten Tumormarker ist, sollte die Methode der RT-PCR auf PSA-mRNA in ihrer jetzigen Form zum Nachweis von Mikrometastasen ausgeschlossen sein.

Ansätze, die diagnostische Spezifität von RT-PCRs zu verbessern, sind nun von entscheidender Bedeutung, wobei es vor allem gilt, eine Differenzierung zwischen unspezifischer Hintergrundexpression nicht maligner Zellen und tumorassoziierter Expression der Mikrometastasen zu unterscheiden. In Kombination mit weiteren neuen Entwicklungen, die ein real-time Monitoring der RT-PCR ermöglichen, wie der Taq-Man (Applied Biosystems) oder der Light cycler (Roche), mögen entscheidende Fortschritte in der Diagnostik von Mikrometastasen bringen. Sie erlauben gerade in Kombination mit Fluoreszenz-gelabelten Farbstoffen einen Blick in die eigentliche Reaktion der PCR, und dadurch potentiell eine Unterscheidung zwischen schwacher Hintergrundexpression nicht maligner Zellen und einer stärkeren und dadurch früher detektierbaren tumorassoziierter Expression maligner Mikrometastasen. Es bleibt zu zeigen, ob die Übertragung dieser Methoden auf RT-PCRs auf neuere, erst kürzlich beschriebene (Dhanasekaran SM et al.) PCa-spezifische Marker (pim-1 eine Serin/Threonin Kinase; Hepsin, eine transmembranöse Serin Protease) weitere Erkenntnisse schafft, die eine valide Diagnose von Mikrometastasen erlaubt.

6. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom gehört zu den drei häufigsten Karzinomen des Mannes und PSA ist der entscheidende Tumormarker innerhalb des Screenings, der Diagnose und des Monitoring.

Trotz jüngster Weiterentwicklungen in analytischen Verfahren, wie PSA-Density (PSAD), PSA-Velocity, PSA-Q, erlaubt keine dieser Methoden die Detektion von Mikrometastasen. Molekularbiologische Amplifikationstechniken, wie die RT-PCR auf PSA-mRNA positive Zellen, können zirkulierende Karzinomzellen im peripheren Blut und Knochenmark detektieren. Um die hohe analytische Sensitivität der RT-PCR der klinischen Anwendung nutzbar zu machen, wurde in der vorliegenden Arbeit:

1. eine spezifische und neue RT-nested PCR auf PSA mRNA etabliert, die es erlaubt, eine PSA mRNA positive LNCaP Zelle / ml Blut nachzuweisen,
2. 40 periphere Blutproben von PCa-Patienten diesem Assay zugeführt und
3. ein Ansatz zur Automatisierung am ES-300 entwickelt.

Die standardisierte, hocheffiziente RT-nested PCR berücksichtigte alle bekannten Splicevarianten der PSA-mRNA und detektierte titrierbar eine PSA m-RNA positive LNCaP Zelle / ml K-EDTA Blut. Zur Qualitätssicherung der RNA-Präparation wurde eine unmittelbare RNA-Stabilisierung durch ein GITC-Lyse-System direkt auf Station durchgeführt und durch eine β 2-Mikroglobulin RT-PCR verifiziert. Überraschenderweise wurden im Verlauf der Etablierung auch nicht prostatistische Tumorzelllinien wie MCF-7 positiv getestet, was die diagnostische Spezifität des Nachweises senkt.

Bei Anwendung des Assays auf 40 klinische Proben von PCa-Patienten ergab sich nach erster Testung eine Positivitätsrate von 31%. In weiteren kumulativen Testungen stieg diese auf 80% an, wobei 20% der Patienten, wie auch die nicht erkrankten Kontrollpatienten, in 5 repetitiven Assays negativ blieben. In kumulativen Testungen am Sensitivitätslimit folgte das Auftreten von nachweisbaren PCa-Tumorzellen weitgehend dem Poissonschen Verteilungsmodell.

Um eine quantitative Detektion der Amplifikate zu ermöglichen, wurden Ansätze für ein Testsystem am ES-300 entwickelt, welche einen automatisierten, spezifischen und titrierbaren Nachweis der PSA-cDNA Amplicons ermöglicht. Als interne Kontrolle sollte das genomische Amplifikat von PSA (1,9kb) dienen, welches durch Teilhybridisierung nachzuweisen war. Da dieses Amplifikat unabhängig von dem cDNA Signal jedoch nicht reproduzierbar in der PCR nachweisbar war, konnte es nicht als interne Kontrolle der PCR und der folgenden ES-300 Auswertung verwendet werden.

Folglich müssen neue Verbesserungen vorhandener Techniken entwickelt werden, die RT-nested PCR Ergebnisse quantifizierbar und kontrollierbarer machen, um damit die bisher nicht befriedigende diagnostische Spezifität von RT-nested PCRs zu optimieren und eine breitere klinische Verwendung dieser Assays zu ermöglichen.

Literaturverzeichnis:

Baker A.R., and Shine, J, Human kidney kallikrein: cDNA cloning and sequence analysis. DNA 4, 445-450, 1985

Benoit RM, Naslund MJ: Detection of latent prostate cancer from routine screening: comparison with breast cancer screening. Urology 46: 533-537, 1995

Benson MC, Whang IS, Olsson CA, McMahon DJ, Cooner WH: The use of prostate specific antigen density to enhance the predictive value of intermediate levels of serum prostate specific antigen. J.Urol. 147(3 Pt 2): 815-6, 1992

Beutler E, Gelbart T and Kuhl W. 1990. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. Biotechniques 9:166

Brendler CB, Carmichael M, Walsh PC, Epstein JI: Radical prostatectomy (RP) for nonpalpable prostate cancer diagnosed by needle biopsy: pathologic and clinical findings. J.Urol. 149: 378A (abstract 660), 1993

Brossart P, Schmier JW, Kruger S, et al. A polymerase chain reaction-based semiquantitative assessment of malignant melanoma cells in peripheral blood. Cancer Res 1995; 55: 4065-4068.

Burchill SA, Bradbury MF, Pittman K, Southgate J, Smith B, Selby P. Detection of epithelial cancer cells in peripheral blood by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Br J Cancer 1995; 71: 278-281.

Bush CE, Donovan RM, Peterson WR, Jennings MB, Bolton V, Sherman DG, Vanden Brink KM, Beninsig LA, Godsey JH: Detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma samples from high-risk pediatric patients by using the self-sustained sequence replication reaction. J Clin Microbiol 1992 Feb;30(2):281-286

Cailleau R et al. J.Natl. Cancer Inst. (Betheda) 53: 661-674, 1974

Cama C, Olsson CA, Raffo AJ, Perlman H, Buttyan R, O'Toole K, Mc Mahon D, Benson MC and Katz AE. Molecular staging of prostate cancer. II: A comparison of the application of an enhanced reverse transcriptase polymerase chain reaction assay for the prostate specific antigen versus the prostate specific membrane antigen. J. Urol. 153, 1373-1378 (1995).

Literaturverzeichnis

Carter HB, Pearson JD, Metter EJ et al.: Longitudinal evaluation of prostate-specific antigen levels in men with and without prostate disease. JAMA 267(16): 2215-20, 1992

Catalona WJ, Hudson MA, Scardino PT et al.: Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: Receiver Operator Characteristic Curves. J.Urol. 151: 449A (abstract 885), 1994

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Dodds / Coplen / Yuan / Petros/ Andriole : Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer., N Engl. J. Med, 324: 1156-1161.1991.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL et al.: Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. New England Journal of Medicine 324(17):1156-1161, 1991.

Catalona WJ, Smith DS, Ratliff TL, Basler JW: Detection of organ-confined prostate cancer is increased through prostate specific antigen-based screening. JAMA 270(8): 948-54, 1993

Catalona WJ, Bigg SW. Nerve-sparing radical prostatectomy: Evaluation of results of 250 patients. J Urol 1990; 143:538-544

Chromczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem 1987; 162: 156-159.

Corey E, Arfman EW, Oswin MM, Melchior SW, Tindall DJ, Young CY, Ellis WJ, Vessella RL. Detection of circulating prostate cells by reverse transcriptase-polymerase chain reaction of human glandular kallikrein (hK2) and prostate-specific antigen (PSA) messages. Urology 1997 Aug;50(2):184-8

Dalkin BL, Ahmann F, Southwick P, Bottaccini MR: Derivation of normal prostate specific antigen (PSA) level by age. J.Urol. 149: 413A, 1993

Deguchi T, Doi T, Ehara H, Ito S, Takahashi Y, Nishino Y, Fujihiro S, Kawada Y, et al; Dtection of micrometastatic prostate cancer cells in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res 1992; 53, 5350-5354

Dhanasekaran SM, Barrette TR, Ghosh D, Shah R, Varambally S, Kurachi K, Pienta KJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM.

Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer., Nature. 2001 Aug 23;412(6849):822-6.

Literaturverzeichnis

Diamandis EP, Yu H. Prostate cancer, prostate-specific antigen, and the polymerase chain reaction (Editorial). *Clin Chem* 1995a; 41:1177–9.

Diamandis EP, Yu H. New biological functions of prostate-specific antigen? (Editorial). *J Clin Endocrinol Metab* 1995b;80:1515-7

Ellis WJ, Vessella RL, Corey E, Arfman EW, Oswin MM, Melchior S, Lange PH. The value of a reverse transcriptase polymerase chain reaction assay in preoperative staging and followup of patients with prostate cancer. *J Urol*. Apr;159(4):1134-8, 1998

Epstein JI, Carmichael MJ, Pizov G, Walsh PC. Influence of capsular penetration on progression following radical prostatectomy: a study of 196 cases with long term follow-up. 1993 *J Urol*; 150: 135-141

Espana F, Gilabert J, Estelles A, Romeu A, Aznar J, Cabo A. Functionally active protein C inhibitor / plasminogen activator inhibitor-3 (PCI/PAI-3) occurs at high concentrations in human seminal plasma and complexes with prostate specific antigen. *Thromb Res* 1991;64: 309-320

Fahy E, Kwok DY, Gingeras TR: Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. *PCR Methods Appl* 1991 Aug;1(1):25-33

Foss AJ, Guille MJ, Occleston NL, Hykin PG, Hungerford JL, Lightman S. The detection of melanoma cells in peripheral blood by reverse transcription-polymerase chain reactor. *Br J Cancer* 1995; 72: 155-159.

Fukushima, D., Kitamura, N., Nakamishi, S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for human pancreatic kallikrein. *Biochemistry* 24, 8037-8043, 1985

Gerber GS, Chodak GH: Routine screening for cancer of the prostate. *Journal of the National Cancer Institute* 83(5): 329-335, 1991.

Ghossein RA, Scher HI, Gerald WL, Kelly WK, Curley T, Amsterdam A, Zhang ZF and Rosai J. Detection of circulating tumor cells in patients with localized and metastatic prostatic carcinoma: clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 13, 1195-1200 (1995)

Gillespie HH. Dissolve and capture: a strategy for analysing mRNA in blood. *Nature* 1994; 367: 390-1

Literaturverzeichnis

Gingeras TR, Prodanovich P, Latimer T, Guatelli JC, Richman DD, Barringer KJ: Use of self-sustained sequence replication amplification reaction to analyze and detect mutations in zidovudine-resistant human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 1991 Dec;164(6):1066-1074

Golomb M, Grandegenett DD. Endonuclease activity of purified of RNA-directed DNA-polymerase from avian myeloblastosis virus. 1979, *J Biol Chem* 254, 1606-1613

Gotley DC, Reeder JA, Fawcett J, et al. The deleted in colon cancer (DCC) gene is consistently expressed in colorectal cancers and metastases. *Oncogene* 1996; 13: 787-795.

Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, Reeder JA, Simmons DL, Antalis TM. Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1996; 74: 342-351.

Gunn J, McCall J, Yun K, Wright P. Detection of micrometastases in colorectal cancer patients by K19 and K20 reverse-transcription polymerase chain reaction. *Lab Invest* 1996; 75: 611-616.

Gusterson B. Are micrometastases clinically relevant ? *Br J Hospital Med* 47: 247-248, 1991

Hara M, Koyanagi Y, Inoue T, Fukuyama T. Physico-chemical characteristics of α -seminoprotein, an antigenic component specific for human seminal plasma. *Jap J Legal Med* 1971;25; 322-324

Henke W, Jung M, Jung K, Lein M, Schlechte H, Berndt C, Rudolph B, Schnorr D, Loening S.A Increased analytical sensitivity of RT-PCR of PSA mRNA decreases diagnostic specificity of detection of prostatic cells in blood. 1997 *Int J Cancer*: 70: 52-56.

Henttu P, Lukkariinen O, Vihko P. Expression of the gene coding for human prostate-specific antigen and related hgk-1 in benign and malignant tumors of the human prostate. *Int J Cancer* 1990; 45 ; 654-660

Henttu P, Liao SS, Vihko P: Androgens up-regulate the human prostate-specific antigen messenger ribonucleic acid (mRNA), but down-regulate the prostatic acid phosphatase mRNA in the LNCaP cell line. *Endocrinology* 1992 Feb; 130(2): 766-772

Hinman F. Screening for prostatic carcinoma. *J.Urol.* 145(1): 126-130, 1991.

Hölzel D; Epidemiologie des Prostatakarzinoms. *Fortschr. Med.*109 (26): 521-525, 1991

Literaturverzeichnis

Holodniy M, Kim S, Katzenstein D, Konrad M, Groves EW, Merigan TC: Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin. *J. Clin Microbiol*, 1991 29; 676-679.

Israeli RS, Powell T, Fair WR, Heston WDW. Molecular cloning of a complementary DNA encoding a prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.*, 53: 227-230, 1993

Israeli RS, Powell T, Fair WR, Heston WDW. Expression of the prostate-specific membrane antigen. *Cancer Res.*:54: 1807-1811, 1994.

Israeli RS, Miller WH, Su S, Powell T, Samadi DS, Fair WR, Huryk RF, DeBlasio A, Edwards ET, Wise GJ, Heston WDW. Sensitive nested rt-PCR detection of circulating prostate tumor cells: Comparison of prostate-specific membrane antigen and prostate specific antigen-based assays. *CancerRes.*: 54 : 6306-6310, 1994.

Israeli RS, Miller WH, Su S, Powell T, Samadi DS, Huryk RF, DeBlasio A, Edwards ET, Wise GJ, Heston WDW, Fair WR. Sensitive detection of prostatic hematogenous tumor cell dissemination using specific prostate specific antigen and prostate specific membrane-derived primers in the polymerase chain reaction. *J Urol* . 153, 573-577

Jaakkola S, Vornanen T, Leinonen J, Ranniko S, and Stenman UH. Detection of prostatic cells in peripheral blood: Correlation with serum concentrations of prostate-specific antigen. *Clin. Chem.* 41, 1705-1709 (1995)

Jonas S, Windeatt S, O-Boateng A, Fordy C, Allen-Mersh TG. Identification of carcinoembryonic antigen-producing cells circulating in the blood of patients with colorectal carcinoma by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Gut* 1996; 39: 717-721.

Kabalin JN, McNeal JE, Price HM, Freiha FS, Stamey TA: Unsuspected adenocarcinoma of the prostate in patients undergoing cystoprostatectomy for other causes: incidence, histology and morphometric observations. *J.Urol.* 141(5): 1076-83, 1989

Katz AE, Olsson CA, Raffo AJ, Cama C, Perlman H, Seaman E, O'Toole KM, McMahon D. Molecular staging of prostate cancer with the use of an enhanced reverse transcriptase-PCR assay. *Urology* 43, 765-775, 1994.

Kievits T, Gemen van B, Soonamen R, Lens PF. Enzymatic amplification of nucleic acids in vitro at one temperature. VIIIth International Congress of Virology. Berlin, August 1990, Abstract P 30-024, p 290.

Literaturverzeichnis

Kwoh DY, Davis GR, Whitfield KM, Chappelle HL, DiMichele LJ, Gingeras TR Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 Feb;86(4):1173-1177.

Lee C, Keefer M, Zhao ZW, Kroes R, Berg L, Liu X, Sensibar J. Demonstration of the role of prostate-specific antigen in semen liquefaction by two-dimensional electrophoresis. *J Androl* 1989;10:432-438.

Lehman TA, Scott F, Seddon M, Kelly K, Dempsey EC, Wilson VL, Mulshine JL, Modali R; Detection of K-ras oncogene mutations by polymerase chain reaction-based ligase chain reaction *Anal Biochem* 1996 Aug 1 239 (2): 153-159 .

Lilja H, Christensson A, Dahlen U, Matikainen MT, Nilsson O, Pettersson K, Lövgren T. Prostate specific antigen in human serum occurs predominantly in complex with α 1-anti-chymotrypsin. *Clin Chem* 1991; 37:1618-25.

Lundwall, Å und Lilja, H Molecular cloning of prostate specific antigen cDNA. *FEBS Letters*, 214: 317-322, 1987.

Lundwall, Å. Characterisation of the gene for prostate-specific antigen, a human glandular kallikrein. *Biochem Biophys Res Comm*, 161: 1151-1159, 1989.

MacDonald RJ, Margolius HS, Erdös EG. Molecular biology of tissue kallikrein. *J Biochem* 1988; 253; 313-321.

Moreno JG, Crocetti CM, Fischer R, et al. Detection of hematogenous micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer Res* 52: 6110-6112, 1992

Moreno JG, O'Hara M, Long JP, Veltri RW, Ning X, Alexander AA, Gomella LG. Transrectal ultrasound-guided biopsy causes hematogenous dissemination of prostate cells as determined by RT-PCR. *Urology* 49:515-520, 1997

Molino A, Colombatti M, Bonetti F, et al. A comparative analysis of three different techniques for the detection of breast cancer cells in bone marrow. *Cancer* 67:1033-1036, 1991.

Muir CS, Nectoux J, Staszewski J. The epidemiology of prostate cancer: Geographical distribution and time-trends. *Acta Oncol* 1991; 30 : 133-140.

Mueller JD, Putz B, Hofer H: Self-sustained sequence replication (3SR): an alternative to PCR. *Histochem Cell Biol* 1997 Oct ;108 (4-5): 431-437.

Neumaier M, Gerhard M, Wagener C. Diagnosis of micrometastases by the amplification of tissue-specific genes. *Gene* 1995; 159: 43-47.

Olsson CA, De Vries GM, Benson MC, Raffo A, Buttyan R, Cama C, O'Toole K, Katz AE. The use of RT-PCR for prostate-specific antigen assay to predict potential surgical failures before radical prostatectomy: molecular staging of prostate cancer. *Br J Urol* Mar;77(3):411-7, 1996

Olsson CA, de Vries GM, Raffo AJ, Benson MC, O'Toole K, Cao Y, Buttyan RE, Katz AE. Preoperative reverse transcriptase polymerase chain reaction for prostate specific antigen predicts treatment failure following radical prostatectomy. *J Urol* May;155(5):1557-62, 1996

Oesterling JE, Suman VJ, Bostwick DG, Zincke H: PSA-detected (clinical stage T1c or B0) prostate cancer: pathologically significant tumors. *Urol.Clin.N.Am.* 20(4): 687-93, 1993.

Oesterling, JE: Prostate specific antigen: a critical assessment of the most useful tumor marker for adeno-carcinoma of the prostate. *J. Urol.*, 145: 907-923,1991.

Oesterling JE, Jacobsen SJ, Chute CG et al.: Serum prostate-specific antigen in a community-based population of healthy men: establishment of age-specific reference ranges. *JAMA* 270(7): 860-4, 1993.

Qiu SD, Young CY, Bilhartz DL, Prescott JL, Farrow GM, He WW, Tindall DJ. In situ hybridization of prostate-specific antigen mRNA in human prostate. *J Urol* 1990 Dec;144(6):1550-6

Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput J, Brinkmann AO, Trapman J. The promotor of the prostate-specific antigen contains a functional androgen responsive element. *Mol Endocrinol* 1991; 5; 1921-30.

Riegman PH, Vlietstra RJ, van der Korput J. Molecular cloning and characterisation of novel prostate antigen cDNA's. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*,155: 181-188, 1988.

Riesenberg R, Oberneder R, Kriegmair M, et al. Immunocytological double-staining of cytokeratin and prostate specific antigen in individual prostatic tumor cells. *Histochemistry* 99: 61-66, 1993.

Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, Dutrillaux B, Lefrancois D, Theillet C. CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR-based study of splice variants. *Int J Cancer* 1995; 64: 347-354.

Rolfs A, Schuller I, Finckh U, and Weber-Rolfs I, (edited by): Substances affecting PCR: Inhibition or enhancement. In: *PCR: Clinical Diagnostics and Research*, Berlin: Springer-Verlag, 1992, p 51-60.

Literaturverzeichnis

Sakr WA, Haas GP, Cassin BF, Pontes JE, Crissman JD: The Frequency of Carcinoma and Intraepithelial Neoplasia of the Prostate in Young Male Patients. J.Urol. 150: 379-385, 1993.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory

Scaletsky R, Koch MO, Eckstein CW, Smith JA Jr: Pathologic findings in prostate cancer detected because of PSA elevation. J.Urol. 149: 303A (abstract 361), 1993.

Schaller J, Akiyama K, Tsuda R, Hara M, Marti T, Rickli E. Isolation, characterisation and amino-acid sequence of γ -seminoprotein, a glycoprotein from human seminal plasma. Eur J biochem 1987; 170: 111-120.

Schedlich LJ, Bennets BH, Morris BJ, Primary structure of a human glandular kallikrein gene. (1987) DNA 6, 429-437.

Schulz P., Stucka R., Feldmann H., Combriato G., Klobeck H-G., Fitler F. Sequence of a cDNA clone encompassing the complete mature human prostate specific antigen (PSA) and an unspliced leader sequence. Nucl.Acids Res.,16: 3980, 1988.

Seiden MV, Kantoff PW, Krithivas K, Propert K, Bryant M, Haltom, E, Gaynes L, Kaplan I, DeWolf W. Detection of circulating tumor cells in men with localized prostate cancer. J Clin Oncol. 12, 2634-2639, 1994

Shimizu H; Ross RK; Bernstein L; Yatani R ; Henderson BE, Mack TM: Cancer of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angelis County. Br J Cancer 1991; 63: 963-966.

Sheldon CA, Williams RD, Fraley EE: Incidental Carcinoma of the Prostate: A Review of the Literature and Critical Reappraisal of Classification. J.Urol. 124(5): 626-31, 1980.

Smith B., Selby, P., Southgate, J., Pittman, K., Bradley, C., and Blair, G. E. Detection of melanoma cells in peripheral blood by means of reverse transcriptase and polymerase chain reaction; Lancet 338: 1227-1229, 1991.

Smith, MR, Biggar S, Hussain, M. (1995) Prostate-specific antigen messenger RNA is expressed in non-prostate cells: implications for detection of micrometastases. Cancer Res 55, 2640-44.

Literaturverzeichnis

Soeth E, Roder C, Juhl H, Kruger 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 disease. *Int J Cancer* 1996; 69: 278-282.

Sooknanan R, Malek L, Wang XH, Siebert T, Keating A; Detection and direct sequence identification of BCR-ABL mRNA in Ph+ chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol* 1993 Dec; 21(13): 1719-1724

Stamey TA, Yang N, Hay AR, McNeal JE, Freiha FS, Redwine E. Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med* 1987 Oct 8;317(15):909-16

Stamey TA, Kabalin JN: Prostate Specific Antigen in the Diagnosis and Treatment of Adenocarcinoma of the Prostate. I.Untreated Patients. *J.Urol.* 141: 1070-1075, 1989

Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H et al.: A complex between prostate-specific antigen and α 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: Assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res.* 51(1): 222-226, 1991

Thiounn N, Saporta F, Flam TA, Pages F, Zerbib M, Vieillefond A, Martin E, Debré B, Chevillard S. Positiv prostate specific antigen circulating cells detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction does not imply the presence of prostatic micrometastases. 1997 *Urology* 50: 245-250.

Thomas L, Labor und Diagnose, vierte und erweiterte Auflage, Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg, 1992

Wahle S, Reznicek M, Fallon B, Platz C, Williams R. Incidence of surgical margin involvement in various forms of prostatectomy. *Urology* 1990;36: 23-26

Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17: 159-63.

Wood DP Jr, Banks ER, Humphreys S, McRoberts JW, Rangnekar VM. Identification of bone marrow micrometastasis in patients with prostate cancer. *Cancer* 74, 2533-2540, 1994

Yokozaki H, Ito R, Nakayama H, Kuniyasu H, Taniyama K, Tahara E. Expression of CD44 abnormal transcripts in human gastric carcinomas. *Cancer Lett* 1994; 83: 229-234.

Yoshida K, Sugino T, Bolodeoku J, et al. Detection of exfoliated carcinoma cells in colonic luminal washings by identification of deranged patterns of expression of the CD44 gene. *J Clin Pathol* 1996; 49: 300-305.

Young, CL., Baker, WC, Tomaselli, CM, Dayhoff MO. Atlas of protein sequence and structure. Dayhoff M.O. Ed. (National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, MD) vol. 5, Suppl. 3, pp. 73-93

Young CY, Seay T, Hogen K, Charlesworth MC, Roche PC, Klee GG, Tindall DJ. Prostate-specific human kallikrein (hK2) as a novel marker for prostate cancer. Prostate Suppl. 1996;7:17-24.

Danksagung

Es gibt Menschen, bei denen ich mich ganz herzlich bedanken möchte:

Bei Prof. Dr. Michael Neumaier für seine fachliche und menschliche Betreuung während der gesamten Arbeit. Sein Engagement, mein analytisches Denken und meine Kreativität zu fördern und zu prägen, sein unerschöpflicher Optimismus gerade in schwierigen Situationen dieser Arbeit und seine Offenheit auch bei nicht wissenschaftlichen Fragen werden mir immer vorbildlich sein.

Bei Prof. Dr. C Wagener für die Möglichkeit, in seinem Institut forschen zu dürfen und für die Überlassung des behandelten Themas.

Krimhild Scheike danke für ihre die menschliche Aufnahme im Labor, ihre exzellente technische Unterstützung und Hilfestellung während der gesamten Arbeit. Von und mit ihr zu lernen, hat einfach Spaß gemacht.

Bei Dr. Peter Nollau und Dr. Roman Jung für die zahlreichen und konstruktiven Diskussionen zum Thema.

Den Mitarbeitern des Hormonlabors und des Notfalllabors des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf für ihre Kooperation und ihre freundliche Aufnahme.

Bei Dr. Peter Hammerer für seine Einweisung und Hilfestellung in der Urologie.

Bei Dr. Angela Barkowsky und bei Dr. Ramunas Martynas Vabulas bedanke ich mich für ihre Motivation und ihre Geduld beim Schreiben dieser Arbeit.

Meinen Freunden und meiner Familie danke ich ganz besonders für jegliche Form ihrer Unterstützung.

P A R V I Z A H M A D – N E J A D

PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtstag: 1.8.1970

Geburtsort: Teheran - Iran

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

Seit Mai 2001: Assistenzarzt / Wissenschaftlicher Mitarbeiter unter Prof. Dr. H. Wagner (PhD), Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München

Dezember 1998 – Mai 2000: Arzt im Praktikum, Institut für Med. Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München; in diesem Rahmen ebenfalls Ableistung der Zivildienstes (bis Januar 2001)

SCHULBILDUNG

1976-1980: Grundschule Schwelm

1980-1990: Märkisches Gymnasium Schwelm

Mai 1990: Allgemeine Hochschulreife

MEDIZINISCHE AUSBILDUNG

WS 1990: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg

August 1992: Ärztliche Vorprüfung – Physikum

März 1994: 1. Staatsexamen

März 1997: 2. Staatsexamen

Juni 1998: 3. Staatsexamen

PRAKTISCHES JAHR

1. Terial Innere Medizin: I. und II. Medizinische Abteilung des Allgemeinen Krankenhaus St. Georg, Hamburg (Prof. Kuck und Prof. Begemann)

2. Terial Anästhesiologie und operative Intensivmedizin: Anästhesiologische Abteilung des Allgemeinen Krankenhaus Altona, Hamburg (Prof. Bause)

3. Terial Chirurgie: Abteilung für Unfall - und Wiederherstellungschirurgie des Allgemeinen Krankenhaus St. Georg (Prof. Eggers)

VERÖFFENTLICHUNGEN

Jung, R., Ahmad-Nejad, P., Wimmer, M., Gerhard, M., Wagener, Ch., Neimaier, M. Quality management in PCR assays exemplified in the detection of single epithelial tumor cells. J Hematotherapy, 5, 563, (1996)

Jung, R., Ahmad-Nejad, P., Wimmer, M., Gerhard, M., Wagener, Ch., Neimaier, M. Quality management and influential factors for the detection of single metastatic cancer cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction. Eur. J Clin Chem Clin Biochem 1997; 35: (1): 3-10

Ahmad-Nejad P, Häcker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM and Wagner H. Bacterial CpG-DNA and Lipopolysaccharides activate cognate Toll-like receptors (TLRs) at distinct cellular compartments (submitted to J Biol Chem)

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, da Costa C, Miethke T, Kirschning CJ, Hacker H, Wagner H. Endocytosed hsp60s use toll-like receptor 2 (tlr2) and tlr4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. J Biol Chem 2001 Aug 17; 276(33):31332-31339

Vabulas RM, Ahmad-Nejad P, Ghose S, Kirschning CJ, Issels RD, Wagner H. HSP70 as Endogenous Stimulus of the Toll/Interleukin-1 Receptor Signal Pathway. J Biol Chem published Feb 12, 2002.

Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, Rammensee HG, Wagner H, Schild HJ. The ER-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the TLR2/4 pathway (submitted)

Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, daß ich die Arbeit selbständig 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.

Parviz Ahmad-Nejad