

*Aus dem Lehrstuhl für  
Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. T.E. Reichert)  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg*

**Etablierung einer Methode zur Gewinnung von RNA aus  
Bürstenbiopsien der Mundschleimhaut**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

vorgelegt von  
Stefan Wagener

2013



*Aus dem Lehrstuhl für  
Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. T.E. Reichert)  
der medizinischen Fakultät  
der Universität Regensburg*

**Etablierung einer Methode zur Gewinnung von RNA aus  
Bürstenbiopsien der Mundschleimhaut**

**Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

vorgelegt von  
Stefan Wagener

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert  
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Kühnel  
Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2013

Meinem Vater

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METHODEN ZUR ERFASSUNG ORALER MALIGNOME UND DEREN VORSTUFEN .....</b>	<b>3</b>
2.1. VISUALISIERUNGSHILFEN .....	4
2.1.1. <i>Autofluoreszenz</i> .....	4
2.1.2. <i>Induzierte Fluoreszenz</i> .....	5
2.1.3. <i>Reflektion und Absorption von Licht</i> .....	6
2.1.4. <i>Toluidinblau</i> .....	6
2.2. ZYTOPATHOLOGISCHE DIAGNOSTIK .....	7
2.2.1. <i>Konventionelle histopathologische Diagnostik</i> .....	7
2.2.2. <i>Computergestützte zytopathologische Analyse</i> .....	8
2.2.3. <i>DNA Zytometrie</i> .....	8
<b>3. RNA .....</b>	<b>10</b>
3.1. KLASSEFIKATION UND AUFBAU .....	10
3.1.1. <i>Transkription</i> .....	10
3.1.2. <i>Posttransskriptionelle Modifikation</i> .....	11
3.1.3. <i>Translation</i> .....	12
3.2. RIBONUKLEASEN (RNASEN).....	14
3.2.1. <i>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</i> .....	15
3.2.2. <i>Guanidinthiocyanat</i> .....	15
3.2.3. <i>Proteinase K</i> .....	16
3.2.4. <i>Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol</i> .....	16
<b>4. GRUNDLAGEN DER RNA-ISOLATION .....</b>	<b>17</b>
4.1. FLÜSSIGKEITSBASIERTE PHASENAUFTRENNUNG .....	17
4.2. SÄULENCHROMATOGRAPHIE .....	18
<b>5. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>19</b>
5.1. GERÄTSCHAFTEN UND REAGENZIEN.....	19
5.1.1. <i>RNA- Isolationskits</i> .....	19
5.1.2. <i>Weitere Reaktionskits</i> .....	20
5.1.3. <i>Weitere Reagenzien</i> .....	20
5.1.4. <i>Gerätschaften</i> .....	21
5.1.5. <i>Sequenzen der verwendeten Primer</i> .....	21
5.2. PATIENTENGUT UND PROBENGEWINNUNG.....	22
5.2.1. <i>Prozedur RNA-Isolation mit RNeasy Minikit (Säulenchromatographie)</i> .....	22
5.2.2. <i>Prozedur RNA-Isolation mit peqGOLD RNAPure (flüssigkeitsbasierte Phasenauf trennung)</i> .....	23
5.2.3. <i>Prozedur RNA-Isolation mit peqGold MicroSpin RNA Kit (Säulenchromatographie)</i> .....	24
5.2.4. <i>Prozedur RNA-Isolation mit mRNA Capture Kit</i> .....	25

<b>5.3. WEITERVERARBEITUNG DER PROBEN .....</b>	<b>25</b>
5.3.1. <i>Photometrische Vermessung der isolierten RNA .....</i>	25
5.3.2. <i>Umschreibung der isolierten RNA in cDNA mittels RT-PCR .....</i>	25
5.3.3. <i>Semiquantitative Bestimmung des RNA-Gehalts durch Amplifikation der cDNA mittels PCR und anschließender Elektrophorese.....</i>	26
5.3.4. <i>Ermittlung der RNA-Qualität durch Elektrophorese des RNA-Isolats .....</i>	26
<b>6. ERGEBNISSE.....</b>	<b>28</b>
6.1. MESSWERTE .....	28
6.2. ELEKTROPHORESE .....	33
6.2.1. <i>RNeasy Minikit.....</i>	33
6.2.2. <i>peqGOLD RNAPure.....</i>	34
6.2.3. <i>RNeasy Microkit.....</i>	36
6.2.4. <i>mRNA Capture Kit .....</i>	37
6.2.5. <i>PCR Gel Nachkontrolle .....</i>	38
6.2.6. <i>Denaturierendes RNA Gel .....</i>	40
6.2.7. <i>Poolversuch.....</i>	40
6.2.8. <i>Ergebnisse der Elektrophorese mit modifizierter Isolationsmethode .....</i>	41
<b>7. DISKUSSION DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>43</b>
7.1. VERSCHIEDENE FRÜHERKENNUNGSMETHODEN UND IHRE PRAKTISCHE RELEVANZ.....	43
7.2. DER MOLEKULARBIOLOGISCHE ANSATZ – DISKUSSION DER EXPERIMENTELLEN ERGEBNISSE .....	46
7.3. RELEVANZ DER RESULTATE .....	49
<b>8. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>51</b>
<b>9. TABELLENANHANG.....</b>	<b>53</b>
<b>10. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>62</b>
<b>11. BILDNACHWEIS .....</b>	<b>66</b>

## 1. Einleitung

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist die am häufigsten auftretende maligne Entartung der Kopf-Hals-Region **{Scully 2009}** mit einer Inzidenz von etwa 500 neu aufgetretenen Erkrankungen pro 100.000 Einwohner auf dem nordamerikanischen und europäischen Kontinent **{McDowell 2006}**. Trotz intensiver Bemühungen in der Vergangenheit, die Therapieschemata zur Behandlung dieser Tumorentität zu optimieren, liegt das mittlere 5-Jahres-Überleben unverändert bei etwa fünfzig Prozent **{Warnakulasuriya 2009}**. Dies ist zum einen auf die frühe lymphogene Metastasierung dieser Tumore, zum anderen aber auch auf die Tatsache, dass die Diagnose oft erst in einem relativ fortgeschrittenen Stadium gestellt werden kann, zurückzuführen **{Warnakulasuriya 2009}**. Da auch die Metastasierung ein zeitabhängiges Geschehen ist, zeigen solche Patienten, deren Diagnose früh gestellt wurde, eine deutlich bessere Prognose. Deutlich wird dies, wenn man bedenkt, dass das Karzinom der Lippe mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von bis zu fünfundneunzig Prozent eine wesentlich günstigere Prognose bietet als die entsprechenden Karzinome der Mundhöhle, ein Umstand der mit einiger Wahrscheinlichkeit schlicht auf die exponierte Lage und damit auf die leichtere klinische Erfassbarkeit zurückzuführen ist **{Scully 2009}**. Dies und die Tatsache, dass die Entstehung von oralen Malignomen eng mit bestimmten Risikofaktoren wie dem Genuss von Tabak und Alkohol oder dem Kauen von Betel assoziiert ist, lassen annehmen, dass sich die Chancen auf eine kurative Therapie gerade bei dieser Tumorentität durch die Entwicklung einer validen Früherkennungsmethode wesentlich erhöhen könnten **{Fedele 2009}**. Der Versuch eine solche Methode zur Früherkennung maligner Entartungen im Bereich der Mundhöhle zu etablieren, muss dabei jedoch nicht nur dem Prinzip der Validität Rechnung tragen, sondern auch praktische Kriterien wie Invasivität, Handhabung, Beeinträchtigung des Patienten und Kosten des Verfahrens mit einbeziehen. In diesem Zusammenhang sind in der Vergangenheit Versuche unternommen worden, entartete Zellen und deren Vorstufen nicht nur mit Hilfe pathologisch-zytologischer Merkmale, sondern anhand von Veränderungen im Genom der jeweiligen Zellen zu identifizieren. Einen besonderen Platz bei diesen Betrachtungen nimmt die mRNA (das Transkriptom) ein, da sie direkte Rückschlüsse über die tatsächlichen Aktivitäten der Zelle bezüglich ihrer Genexpression zulässt und somit wertvolle Informationen über den Entartungsgrad der Zelle liefern könnte. Als nicht-invasive, kostengünstige und leicht

durchzuführende Methode an das benötigte Zellmaterial zu gelangen, hat sich die Bürstenbiopsie als ein möglicherweise geeignetes Verfahren herauskristallisiert. Doch auch wenn die Kombination dieser Entnahmetechnik mit anschließender molekularbiologischer Auswertung des Materials zunächst viel versprechend klingt, tun sich in der Praxis viele Probleme auf, die nicht erst bei der Identifikation eines geeigneten Markers anfangen, sondern im Wesentlichen Dinge wie die Gewinnung einer ausreichenden Menge an Zellmaterial sowie die Quantität und vor allem die Qualität des RNA-Isolats betreffen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Methode zu etablieren, die es erlaubt aus oralen Zellproben, die mit Hilfe einer Bürstenbiopsie gewonnen wurden, zuverlässig ein RNA-Isolat herzustellen, das diesen eben genannten Kriterien gerecht wird und als Grundlage für weitere molekularbiologische Analysen geeignet ist. Zum besseren Verständnis und Einordnung in den klinischen Kontext werden im Folgenden zunächst die wichtigsten bisher beschriebenen Methoden zur Bewertung und Analyse oraler Plattenepithelkarzinome und deren Vorstufen kurz beschrieben. Im Anschluss soll dann die genaue Problematik, die bei dem beschriebenen molekularbiologischen Ansatz auftritt, unter Klärung einiger Grundlagen beleuchtet werden.

## 2. Methoden zur Erfassung oraler Malignome und deren Vorstufen

In den letzten Jahrzehnten gab es viele Bemühungen die Diagnostik von Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle besonders im Hinblick auf die Früherkennung maligner bzw. prämaligner Läsionen zu verbessern. Um den Stellenwert, den ein bestimmtes Verfahren in der täglichen Praxis haben könnte, einzuschätzen, benötigt man objektive Kriterien nach denen eine Bewertung erfolgt und mit deren Hilfe die jeweilige Methode in Relation zu den bereits etablierten gesetzt werden kann.

Die Basis einer jeden Diagnostik ist nach wie vor die klinische Untersuchung. Ohne apparative Hilfsmittel und dem damit verbundenen Zeit- und Kostenaufwand kann der behandelnde Arzt die Mundschleimhaut nach sichtbaren Läsionen bzw. palpablen Veränderungen absuchen. Gemäß der aktuell gültigen WHO-Klassifikation werden dabei die sogenannten präkanzerösen Läsionen von den sogenannten präkanzerösen Konditionen unterschieden. Zur erstgenannten Gruppe werden die Leukoplakie, die Erythroplakie, sowie die proliferative verruköse Leukoplakie gezählt, während die sideropenische Dysphagie, der Lichen planus der Mundschleimhaut, die orale submuköse Fibrose, die Syphilis im Tertiärstadium, das Xeroderma pigmentosum, der Lupus erythematoses und die Epidermolysis bullosa dystrophica zur Gruppe der präkanzerösen Konditionen gehören **{Warnakulasuriya 2007}**.

Jedoch kann die klinische Untersuchung nie mehr als eine erste Einschätzung und damit eine Ergänzung sein, da sie allein keine definitive diagnostische Aussage treffen kann. Eine endgültige Diagnose erlaubt weiterhin nur die chirurgische Biopsie mit anschließender histologischer Begutachtung und gilt daher auch heute noch als Goldstandard in der Diagnostik des Mundhöhlenkarzinoms. Aufgrund der Invasivität, dem damit verbundenen Aufwand und allen möglicherweise auftretenden Komplikationen ist die chirurgische Biopsie jedoch nur in Fällen einer klinisch als verdächtig eingestuften Läsion indiziert. Diese Einstufung einer Läsion als potentiell maligne erfolgt jedoch stets aufgrund eines subjektiven Urteils des jeweiligen Untersuchers und damit sind entscheidende Kriterien wie Sensitivität und Spezifität in gewissem Maße abhängig von der klinischen Erfahrung sowie der Gründlichkeit des untersuchenden Arztes. Darüber hinaus stößt die klinische Untersuchung dort an ihre Grenzen, wo Veränderungen in der Mundschleimhaut mit dem bloßen Auge noch nicht auszumachen sind bzw. sich die Läsionen in einem schwer einsehbaren Bereich der Mundhöhle befinden. Im Folgenden sollen nun verschiedene Verfahren,

welche die klinische Untersuchung ergänzen und die Früherkennung prämaligner Läsionen verbessern sollen, beleuchtet werden. Der Übersicht halber werden im Rahmen dieser Arbeit zwei große Gruppen diagnostischer Hilfsmittel unterschieden. Dabei handelt es sich zum einen um verschiedene Formen von Visualisierungshilfen, die, wie der Name schon andeutet, die optische Erfassbarkeit maligner bzw. prämaligner Läsionen der Mundschleimhaut verbessern sollen, zum anderen werden einige diagnostische Verfahren auf der Grundlage zytologischer Methoden einer näheren Betrachtung unterzogen.

## 2.1. Visualisierungshilfen

### 2.1.1. Autofluoreszenz

Fluoreszenz in epithelialen Geweben hat ihren Ursprung in den sogenannten endogenen Fluorophoren. Diese Moleküle werden durch Lichteinwirkung in einen energetisch angeregten Zustand versetzt. Während der Rückkehr in den energieärmeren Zustand wird die Restenergie als Licht abgestrahlt. Die Art der Fluoreszenz wird dabei durch die Absorption und Streuung beeinflusst, die das Licht beim Durchtritt durch Epithel und Stroma erfährt **{Pavlova 2008}**. In der Zervix, deren Epithel dem der Mundschleimhaut histologisch in vielerlei Hinsicht ähnelt, entsteht die Fluoreszenz im Zytoplasma der Zellen. Das Ausmaß der entstehenden Fluoreszenz korreliert mit dem einiger metabolischer Indikatoren, Nikotinamidadenindinukleotid (NADH) und Flavinadenindinukleotid (FAD), welche im Falle einer dysplastischen Transformation vermindert auftreten **{Pavlova 2003, Chance 1959, Drezek 2001}**.

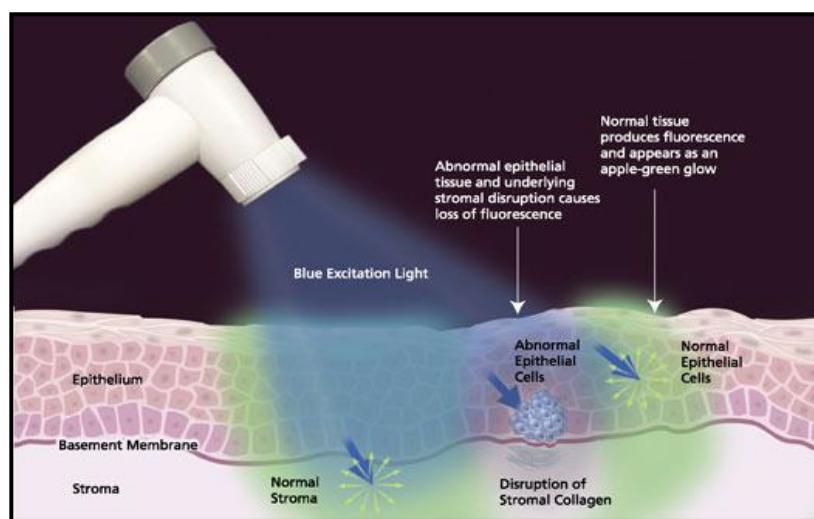


Abb. 1: Autofluoreszenz

Wird ein solches Areal Licht im blauen Wellenlängenbereich ausgesetzt, fluoreszieren die aufgrund der vorwiegend aeroben Glykolyse in normalen Zellen vorhandenen Flavine grün und bilden so einen Kontrast zu dem dunkler erscheinenden dysplastischen Gewebe **{Driemel 2007}**. Des Weiteren geht man davon aus, dass strukturelle Epithelveränderungen (Hyperkeratose, Hyperchromatin, veränderte Kern-Plasma-Relation) eine wichtige Rolle für die Entstehung der Fluoreszenz spielen **{Fedele 2009}**. Darüber hinaus wird das Fluoreszenzverhalten der Mundschleimhaut durch die Zusammensetzung des Stromas, im Besonderen durch die in dieser Schicht enthaltenen Kollagene, beeinflusst **{Sokolow 2002}**. Zusätzlich dazu müssen die verschiedenen Einflussgrößen auch noch zeitlich zueinander in Bezug gesetzt werden, da z.B. eine Veränderung des Stromas im Laufe der Karzinogenese einer Transformation des Epithels vorausgehen kann **{Ingber 2002}**.

### *2.1.2. Induzierte Fluoreszenz*

Das Prinzip der induzierten Fluoreszenz basiert ebenso wie das der Autofluoreszenz auf der Tatsache, dass sich verschiedene Gewebe auf Grund ihres individuellen Fluoreszenzverhaltens identifizieren und voneinander unterscheiden lassen. Während allerdings im Falle des Autofluoreszenzverfahrens die natürlichen Stoffwechselbedingungen, die in den zu differenzierenden Geweben vorherrschen, genutzt werden, kommt bei der induzierten Fluoreszenz ein sogenannter *Photosensitizer* zum Einsatz, ein chemisches Reagenz, das die Fluoreszenzeigenschaften des zu identifizierenden Gewebes verbessert. Für die Untersuchung der oralen Mukosa im Hinblick auf prämaligne bzw. maligne Veränderungen findet die 5-Aminolävulinsäure, die vom menschlichen Körper während der Häm-Synthese produziert wird, als *Photosensitizer* Verwendung. Eine lokale Applikation der 5-Aminolävulinsäure führt zu einem intrazellulären Anstieg und Akkumulation von Protoporphyrin IX in kanzerösen Zellen, ein Molekül welches seinerseits starke Fluoreszenzeigenschaften besitzt **{Driemel 2007}** und bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 405 nm rot fluoresziert. Die Nutzung der Aminolävulinsäure als Photosensibilisator bietet, neben der Tatsache dass es sich um einen körpereigenen Stoff handelt, den Vorteil, dass die Halbwertszeit im Körper relativ gering und eine topische Applikation möglich ist, was dem Auftreten ungewünschter Nebenwirkungen bei systemischer Gabe vorbeugt **{Zenk 1999}**.

### *2.1.3. Reflektion und Absorption von Licht*

Diese Methode zur Differenzierung von gesunden und krankhaft veränderten Schleimhautarealen basiert ähnlich wie das der Autofluoreszenz bzw. induzierten Fluoreszenz auf dem unterschiedlichen Verhalten dieser Gewebe bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Anders jedoch als bei den Fluoreszenzverfahren entsteht der optische Eindruck hier durch die verschiedenen Reflektions- bzw. Absorptionseigenschaften von dysplastischem Gewebe und gesunder Mundschleimhaut. Bevor die eigentliche Untersuchung beginnt, wird dem Patienten eine einprozentige Essigsäurespülösung verabreicht, welche dazu dient die Glykoproteinbarriere der Mundschleimhaut abzubauen **{Oh 2007}** und die Sichtbarkeit von Zellkernen, möglicherweise durch leichte Dehydratation der Zellen, zu verbessern **{Lingen 2007}**. Das für die Untersuchung benötigte Licht mit einer Wellenlänge zwischen 430 und 580 nm wird entweder elektronisch (z.B. MicroLux/DL, AdDent Inc., Danbury, CT, USA) oder mit Hilfe einer Chemilumineszenzreaktion zwischen Acetylsalicylsäure und Wasserstoffperoxid (z.B. Vizilite, Zila Inc., Fort Collins, CO, USA) erzeugt. Trifft dieses Licht nun auf die vorbehandelten Schleimhautabschnitte, so absorbiert die gesunde Schleimhaut das Licht stärker und erscheint dunkel mit einem leichten Blauton, während krankhaft veränderte Areale weiß imponieren (sog. Essigweiß-Läsionen) **{Farah 2006}**.

### *2.1.4. Toluidinblau*

Toluidinblau ist ein azidophiler, metachromatischer Farbstoff aus der Gruppe der Thiazine, der die Eigenschaft besitzt, sich selektiv an saure Gewebskomponenten (Sulfate, Carboxylate, Phosphatradikale) anzulagern und auf diese Weise sowohl DNA als auch RNA effektiv anfärbt. Das Prinzip dieser Methode zur Sichtbarmachung prämaligner bzw. maligner Läsionen im Bereich der Mundhöhle basiert auf der Tatsache, dass dysplastisches Gewebe quantitativ mehr Nukleinsäuren enthält als gesundes, sich also nach Behandlung mit Toluidinblau stärker anfärbt. Darüber hinaus nimmt man an, dass maligne verändertes Epithel möglicherweise weitere interzelluläre Kanäle aufweist, was wiederum die Penetration des Farbstoffs in die Zellen erleichtern könnte **{Epstein 1992}**. Für die Untersuchung werden dem Patienten nacheinander zunächst eine wässrige und eine essigsäurehaltige Mundspülösung verabreicht, um die Schleimhaut für die Applikation von Toluidinblau aufzubereiten. Nachdem das Toluidinblau entweder in

Form einer Spüllösung gegeben oder lokal mit einem Wattestäbchen aufgetragen wurde, können nicht gebundene Farbstoffreste durch den erneuten Einsatz einer essigsäurehaltigen Lösung entfernt werden **{Kerawala 2000}**. Weist nach dieser Prozedur ein bestimmtes Areal eine tiefblaue Färbung auf, so wird dies als Zeichen eines malignen Geschehens gewertet, wohingegen ein Ausbleiben der Färbung oder ein lediglicher Blauschimmer auf ein benignes Geschehen hinweist **{Mashberg 1980}**.

## 2.2. Zytopathologische Diagnostik

Die zytopathologische Diagnostik stellt in Form der chirurgischen Biopsie mit anschließender histologischer Auswertung den Goldstandard in der Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle dar. Da die Invasivität dieses Verfahrens jedoch eine strenge Indikationsstellung voraussetzt, wurde in der Vergangenheit nach Möglichkeiten gesucht, auf einfacherem Wege an das benötigte Zellmaterial zu gelangen, wobei sich die Bürstenbiopsie als das am ehesten geeignete Verfahren herauskristallisiert hat. Im Folgenden sollen nun einige Methoden vorgestellt werden, die aufgrund von zytopathologischen Merkmalen der mit Hilfe von Bürstenbiopsien gewonnenen Zellproben eine diagnostische Aussage bezüglich des Entartungsgrades zu treffen versuchen.

### 2.2.1. Konventionelle histopathologische Diagnostik

Mit Hilfe einer transepithelialen Bürstenbiopsie (der Begriff transepithelial soll andeuten, dass im Gegensatz zur herkömmlichen exfoliativen Zytologie alle für die Diagnose relevanten Zellschichten erfasst werden) kann bei sachgerechter Anwendung ausreichend Zellmaterial gewonnen werden, um dieses im Anschluss einer histopathologischen Analyse zu unterziehen. Dazu wird das mit der Bürste gewonnene Material umgehend nach der Entnahme auf einem Glasobjektträger verstrichen und mit reinem Ethanol für die spätere Färbung mit Hämatoxylin und Eosin fixiert. Zur Analyse und letztendlichen Bestimmung des Entartungsgrades der Zellen werden dann verschiedene Kriterien herangezogen, darunter die Anzahl der Zellkerne und deren Variationen in Größe und Form, sowie die Kern-Plasma-Relation **{Mehrotra 2008}**.

### *2.2.2. Computergestützte zytopathologische Analyse*

Die sogenannte computergestützte zytopathologische Analyse von Biopsien, die mit Hilfe von Bürstenabstrichen gewonnen wurden, kann als eine Weiterentwicklung der zuvor beschriebenen konventionellen histopathologischen Diagnostik betrachtet werden. Das gewonnene Zellmaterial wird analog auf einen Glasobjektträger übertragen und entsprechend gefärbt. Anschließend erfolgt die Auswertung durch ein Bildverarbeitungsprogramm, das speziell zu dem Zweck entworfen wurde, morphologische Eigenschaften, welche dysplastische und karzinomatöse Zellen kennzeichnen, zu erkennen. Als herausragender Vorteil gegenüber der herkömmlichen Beurteilung kann hierbei die Fähigkeit des computergestützten Systems, unter vielen Tausend normalen Zellen einige wenige entartete zu identifizieren, angesehen werden **{Sciubba 1999}**.

### *2.2.3. DNA Zytometrie*

Ein von der Norm abweichender DNA-Gehalt einer Zelle (Aneuploidie) kann als Hinweis für chromosomale Aberrationen gewertet werden und korreliert mit der Entstehung prämaligner und maligner Läsionen **{Subrata 2000}**. Die DNA-Zytometrie ermöglicht eine quantitative Messung des DNA-Gehalts (Ploidie) und den Nachweis einer eventuell vorliegenden Aneuploidie in Zellen einer als Malignitätsverdächtig eingestuften Zellpopulation. Dies wird durch einen Vergleich der sogenannten „integrated optical density“ der untersuchten Zellkerne mit einer Vergleichsgruppe, meist bestehend aus Lymphozyten, erreicht. Darüber hinaus kann mit Hilfe dieses Verfahrens eine Aussage über die Anzahl abnormaler DNA-Stammzelllinien, die Polyploidisation euploider oder aneuploider DNA-Stammzelllinien und die Existenz von Zellen mit außergewöhnlich hohem DNA-Gehalt, getroffen werden. Es gibt Überlegungen, die nahelegen, dass eine vorliegende Aneuploidie in tumorösen Zellen eines frühen Stadiums mit der Tumorprogression assoziiert sein könnte. Entsprechende Untersuchungen an Zellen des Barrett-Oesophagus und des Ovarialkarzinoms zeigen, dass das Vorliegen einer DNA-Aneuploidie mit einer verschlechterten Prognose bzw. einer hohen Rezidivrate einhergehen kann. Das Verfahren selbst beruht auf einer Färbung der gewonnenen Zellen mit der so genannten Feulgen-PAS-Technik. Dabei wird in der zu analysierenden Probe die DNA durch Chlorwasserstoffsäure hydrolysiert, wobei die Molekülverbindungen von Base und Zucker getrennt werden. Die entstehenden

freien Aldehydgruppen ergeben mit fuchsinschwefliger Säure (Schiffs-Reagenz) eine rotviolette Färbung. Die so aufbereiteten Proben werden unter einem Lichtmikroskop digital abfotografiert und im Hinblick auf die oben genannte Fragestellung computergestützt ausgewertet **{Torres-Rendon 2009}**.

### 3. RNA

#### 3.1. Klassifikation und Aufbau

Die Ribonukleinsäuren, kurz RNA, werden gemäß ihren biologischen Aufgaben in verschiedene Klassen eingeteilt, man unterscheidet die ribosomale RNA (rRNA), die Boten-RNA (mRNA, engl. messenger), die Transfer-RNA (tRNA), die kleine nukleäre RNA (snRNA, engl. small nuclear) und die kleine interferierende RNA (siRNA, engl. small interfering) {Jansohn 2006}. Ihr Grundaufbau ähnelt weitgehend dem der DNA, als Hauptunterscheidungsmerkmale sind die Präsenz einer 2'-Hydroxylgruppe (das Fehlen dieser Hydroxylgruppe ist die Basis für die Bezeichnung des Zuckermoleküls der DNA als Desoxyribose) und die Abwesenheit der Base Thymin in der RNA, welche durch die verwandte Pyrimidinbase Uracil substituiert wird. Darüber hinaus liegt die RNA im Gegensatz zur DNA als Einzelstrang vor {Farrell 2009}.

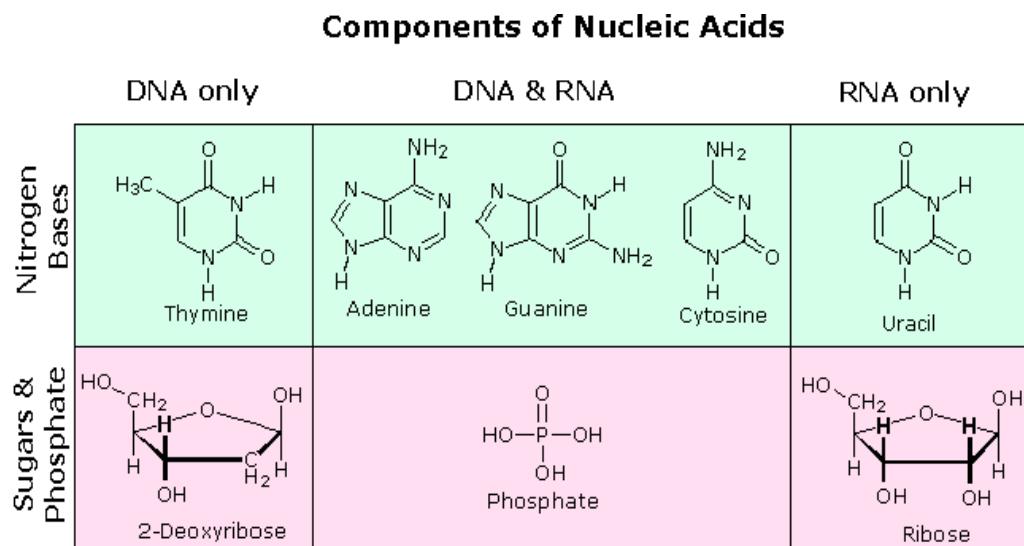


Abb. 2: Aufbau von Nukleinsäuren

Für diese Betrachtung von besonderem Interesse ist die mRNA, da sie für die von der Zelle exprimierten Proteine kodiert. Sie entsteht bei einem Vorgang, den man als Transkription bezeichnet.

##### 3.1.1. Transkription

Der Prozess der Transkription wird in drei Schritte unterteilt, man unterscheidet die Initiation, die Elongation und die Termination. Die Schlüsselenzyme dieses Vorgangs werden als RNA-Polymerasen bezeichnet, wobei für die Polymerisation der mRNA

die RNA-Polymerase II die entscheidende Rolle spielt. Während der Initiationsphase bindet die RNA-Polymerase an einen bestimmten Sequenzabschnitt auf der DNA, die sogenannte Promotorregion. Nachdem die RNA-Polymerase an die Promotor-DNA gebunden hat, wird der DNA-Strang im Bereich der Startstelle aufgetrennt und erlaubt der RNA-Polymerase die Synthese eines kurzen RNA-Abschnitts. Danach verlässt die Polymerase die Promotorregion und geht in die Elongationsphase über. Hier fungiert die RNA-Polymerase als Nucleotidyl-Transferase und verlängert die RNA-Kette durch den Einbau von Nucleotiden, wobei die 3'-Hydroxylgruppe des zuletzt eingebauten Nucleotids mit der alpha-Phosphatgruppe des nächsten Nucleotids unter Bildung einer Esterbindung reagiert. In der Terminationsphase wird das RNA-Transkript freigesetzt und die Transkription ist beendet {Schartl 2009, Klug 2007, Löffler 2002}.

### 3.1.2. Posttransskriptionelle Modifikation

Bevor die bei der Transkription entstandene mRNA in eine Polypeptidkette übersetzt werden kann, durchläuft sie zunächst eine Reihe von Modifikationen. Noch während der Transkription, also im engeren Sinne cotranskriptionell, erfolgt das sogenannte Capping der mRNA an ihrem 5'-Ende. Dabei wird durch die Triphosphataseaktivität des Capping-Enzyms die Phosphorsäureanhydridbindung zwischen der beta- und gamma-Phosphat-Gruppe des ersten Nucleosidtriphosphats hydrolysiert, wodurch am 5'-Ende der mRNA ein Nucleosiddiphosphat entsteht. Das entstandene 5'-Diphosphat bildet mit der alpha-Phosphat-Gruppe des Guanosintriphosphats eine 5'-5'-Triphosphatbindung aus. Diese Reaktion wird durch die Guanyltransferaseaktivität des Capping-Enzyms katalysiert. Zum Schluss wird der endständige Guanosinrest durch eine Methyltransferase in der Position N7 methyliert. Das entstandene modifizierte Ende wird als Cap bezeichnet. Ein weiterer tatsächlich posttranskriptional stattfindender Modifikationsschritt ist die Polyadenylierung der mRNA am 3'-Ende. Darunter versteht man die Anheftung von ungefähr 200 Adenylresten an das 3'-Ende der mRNA. Diese Polyadenylierung wird von der Poly(A)-Polymerase katalysiert. Für die Festlegung der Länge des Poly(A)-Schwanzes ist das Poly(A)-bindende Protein II verantwortlich, was wiederum die Translation, also die Übersetzung der mRNA in ein Polypeptid, maßgeblich beeinflusst. So werden mRNA-Moleküle mit kurzen Poly(A)-Schwänzen wie sie z.B. in Oozyten vorkommen in dieser Form nicht translatiert. Sollten jedoch Proteine

benötigt werden, für die eben diese RNA-Moleküle kodieren, kann der Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende durch eine zytoplasmatische Poly(A)-Polymerase verlängert werden. Zudem schützt der Poly(A)-Schwanz die mRNA vor enzymatischem Abbau durch Exonucleasen und ist damit ein wichtiger Faktor für die Stabilität bzw. die Halbwertszeit der mRNA. Eine dritte Variante der mRNA-Prozessierung wurde entdeckt als man 1977 feststellte, dass viele Gene höherer Organismen deutlich länger sind als die von ihnen erzeugte mRNA. Diese Diskrepanz liegt in der Tatsache begründet, dass aus dem primären Transkript, das auch als prä-mRNA oder heterogene nukleäre RNA (hnRNA) bezeichnet wird, erst durch das Heraustrennen bestimmter Abschnitte, die man als Introns bezeichnet, die reife mRNA entsteht. Die tatsächlich kodierenden Abschnitte werden Exons genannt und bilden das letztendliche Transkript. Der gesamte Vorgang wird durch einen multikatalytischen Komplex im Zellkern, das sogenannte Spleißosom, ausgeführt, welches wiederum neben Proteinen auch kleine RNA-Moleküle, die small nuclear RNA (snRNA), enthält. Diese Art der Modifikation wird allgemein als „Spleißen“ bezeichnet. Der letzte noch zu nennende posttranskriptionelle Modifikationsschritt ist die RNA-Editierung. Bei dieser Form der Prozessierung wird die Nucleotidsequenz einer prä-mRNA vor der Translation verändert. Daraus folgt, dass sich die Ribonukleotidsequenz der reifen mRNA von der Sequenz unterscheidet, für die in den Exons der DNA kodiert wird. Die mRNA-Editierung kann z.B. durch die Desaminierung von Cytosin oder Adenosin erfolgen {**Schartl 2009, Klug 2007, Löffler 2002**}.

### 3.1.3. *Translation*

Bei der Translation wird die genetische Information, die in der Basenabfolge der DNA gespeichert ist, mit Hilfe der mRNA in die Abfolge von Aminosäuren in Proteinen übersetzt. Den Zusammenhang zwischen den kodierenden Basentriplets auf der mRNA und der jeweiligen Aminosäure stellt die tRNA her. Die tRNA besitzt dafür zwei unterschiedliche funktionelle Zentren, das sogenannte Anticodon und das 3'-terminale Akzeptorende, auf welches die Aminosäure in einer durch die Aminoacyl-tRNA-Synthetase katalysierten Reaktion übertragen wird. Dabei erfolgt im ersten von zwei Schritten die Aktivierung der Aminosäure durch Bildung einer energiereichen Anhydridbindung zwischen der Carboxylgruppe der Aminosäure und der Phosphorylgruppe eines AMP-Moleküls. Im zweiten Schritt wird der Aminoacylrest

des entstandenen Aminoacyl-AMP auf eine Hydroxylgruppe der Ribose des endständigen Adenosinrests der tRNA unter Bildung von Aminoacyl-tRNA übertragen. Die eigentliche Proteinbiosynthese findet an den Ribosomen im Zytosol der Zelle statt. Ribosomen sind aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut und sind assoziiert mit mehreren RNA-Molekülen, sogenannten rRNAs. Die kleine Untereinheit stellt dabei das funktionelle Zentrum für die Codon-Anticodon-Wechselwirkung dar, an der großen Untereinheit findet die Knüpfung der Peptidbindung statt. Die Proteinsynthese lässt sich analog zur Transkription in drei Phasen unterteilen. Während der Initiation findet das Ribosom den Anfang der zu translatierenden mRNA. Dabei wird die Initiator-tRNA an das AUG-Startcodon in der sogenannten P-Stelle des Ribosoms gebunden. Bei der Elongation wird zunächst eine Aminoacyl-tRNA mit dem zum nachfolgenden Basentriplett der mRNA komplementären Anticodon an die A-Stelle des Ribosoms gebunden und reagiert mit der Peptidyl-tRNA in der P-Stelle unter Bildung einer Peptidbindung. Die neu entstandene Peptidyl-tRNA in der A-Stelle des Ribosoms wird nun unter Abspaltung der deacylierten tRNA in die P-Stelle transloziert. Dieser Zyklus wiederholt sich bis das gesamte mRNA-Transkript translatiert ist. Die Termination der Proteinsynthese erfolgt sobald ein sogenanntes Terminationscodon im Dekodierungszentrum erscheint {Schartl 2009, Klug 2007, Löffler 2002}.

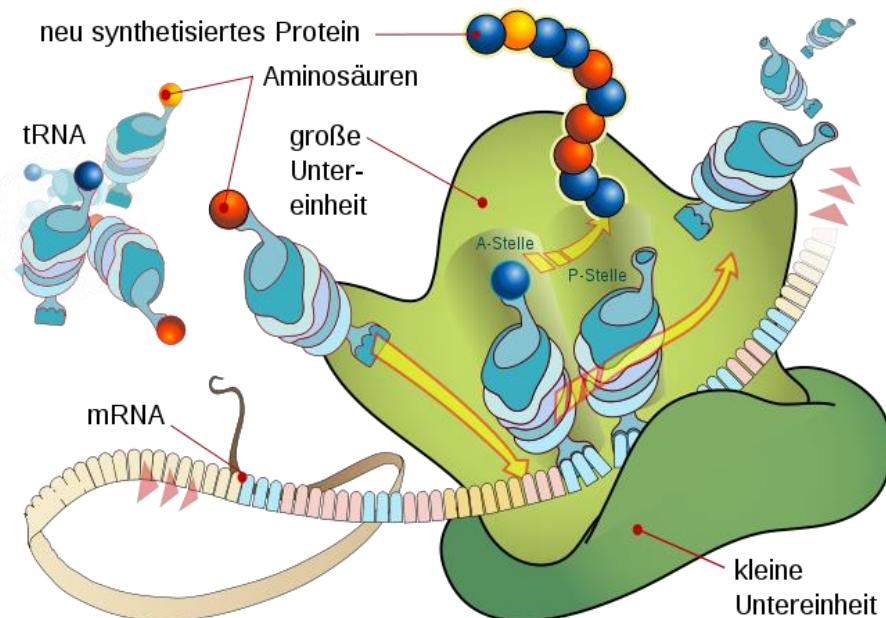


Abb. 3: Ribosomenstruktur

### 3.2. Ribonukleasen (RNasen)

Um die Prozedur der Isolation qualitativ hochwertiger RNA und die Probleme, die in diesem Zusammenhang auftreten, nachvollziehen zu können, ist nicht nur ein gewisses Verständnis für den Aufbau der RNA selbst, sondern auch die Kenntnis einer weiteren Gruppe von Molekülen voneinander, der RNasen. RNasen kommen in praktisch jeder lebendigen Zelle vor und sind in der Lage, RNA-Moleküle sowohl durch endonukleolytische als auch durch exonukleolytische Aktivität zu degradieren. Die zusätzliche 2'-Hydroxylgruppe am Ribosering bewirkt dabei eine besondere Anfälligkeit der RNA für hydrolytischen Abbau, besonders in stark alkalischer Lösung oder in Anwesenheit von Lewis-Säuren wie z.B.  $Mg^{2+}$ -Ionen. Die Tertiärstruktur der RNasen wird durch vier Disulfidbrücken stabilisiert, welche es diesen Enzymen in der Regel erlauben schnell zu renaturieren nachdem sie mit Denaturantien behandelt oder erhitzt wurden. Darüber hinaus benötigen RNasen so gut wie keine Cofaktoren und sind in einem breiten pH-Bereich aktiv. Das erklärt die ungewöhnliche Stabilität dieser Proteine.

Um die RNA während und nach der Präparation vor einer Denaturierung durch RNasen zu schützen, muss sowohl die extrinsische als auch die intrinsische RNase-Aktivität minimiert werden. Unter dem Begriff extrinsische Aktivität werden alle externen Quellen von RNase-Kontamination zusammengefasst, dies betrifft sowohl die Reagenzien selbst, als auch alle Gerätschaften, die für die Präparation notwendig sind. Als primäre externe Quelle gelten jedoch sowohl die menschliche Hautoberfläche als auch der menschliche Speichel, weshalb bei jeder RNA-Isolation Handschuhe zu tragen sind und das Sprechen zu unterlassen ist. Die intrinsische RNase-Aktivität im Gegensatz dazu bezeichnet all jene Kontaminationen, die von der Probe selbst ausgehen. Zum einen werden intrazelluläre RNasen durch Lyse der Zellen freigesetzt, zum anderen stellt im Besonderen bei einer Bürstenbiopsie aus der Mundhöhle das ubiquitäre Vorkommen der RNasen vor allem im Speichel eine große Kontaminationsgefahr dar.

Um die extrinsische und die intrinsische Aktivität der RNasen zu verhindern, werden verschiedene Ribonuklease-Inhibitoren eingesetzt **{Farrell 2009}**. Die folgende Auswahl legt ein besonderes Augenmerk auf die in den durchgeführten Experimenten verwendeten Inhibitoren.

### *3.2.1. Diethylpyrocarbonat (DEPC)*

Da die Behandlung von Reagenzien durch Autoklavieren allein das Fehlen einer Restaktivität von Ribonukleasen keinesfalls gewährleisten kann, ist es heutzutage üblich, Stock-Lösungen und Puffer mit dem potenten RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC) zu versetzen. In der Vergangenheit wurde DEPC ebenso zum Reinigen von Gerätschaften eingesetzt, wegen seines kanzerogenen Potentials aber für diesen Verwendungszweck durch weniger gefährliche Methoden ersetzt. Der Wirkmechanismus beruht auf der Tatsache, dass DEPC an primäre und sekundäre Amine unter Ausbildung kovalenter Bindungen bindet, wodurch die Aktivität der RNAsen inhibiert wird. Doch werden auf diese Weise auch alle anderen Substanzen, die primäre Amine enthalten, modifiziert und deshalb kann diese Methode bei vielen Puffern nicht angewendet werden. Darüber hinaus hat DEPC eine starke Affinität zu dem in der RNA enthaltenen Adenosin und bereits kleine Restspuren von DEPC können zu einer chemischen Modifikation durch Carboxymethylierung von Adenylresten und damit zu einer Veränderung der physikalischen Eigenschaften der RNA führen. Dies verringert die Brauchbarkeit der RNA für Anwendungen wie die Blot-Analyse oder PCR. Aus diesem Grund muss das DEPC quantitativ zersetzt werden bevor die mit dem DEPC behandelte Substanz für die Bearbeitung von RNA eingesetzt wird. Dies geschieht entweder durch Autoklavieren für fünfzehn Minuten oder durch Inkubation bei 60 Grad über Nacht **{Farrell 2009}**.

### *3.2.2. Guanidinthiocyanat*

Guanidinthiocyanat ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine im Allgemeinen und RNAsen im Speziellen denaturiert und inaktiviert. Aus diesem Grund ist Guanidinthiocyanat das Denaturierungsmittel der Wahl für die Isolation von RNA aus Geweben, die von Natur aus reich an RNAsen sind. Da Guanidinthiocyanat neben seiner denaturierenden noch eine zelllysierende Wirkung besitzt, ist es Bestandteil der meisten heutzutage verwendeten Lysepuffer, meist im Zusammenspiel mit einem reduzierenden Agens wie z.B.  $\beta$ -Mercaptoethanol **{Farrell 2009}**.

### *3.2.3. Proteinase K*

Proteinase K ist ein proteolytisches Enzym, das aus dem Schlauchpilz *Tritirachium album* gewonnen wird. In Lösung ist die Proteinase K in einem pH-Bereich von 4,0 – 12,5 und einem Temperaturbereich von 25-65 °C stabil und kann bei -20 °C mindestens ein Jahr aufbewahrt werden. Obwohl das Enzym zwei Bindungsstellen für Kalziumionen hat, ist die katalytische Aktivität auch in Abwesenheit dieser Ionen ausreichend um Proteine zu degradieren, die bei der Isolation von Nukleinsäuren häufig anzutreffen sind. Gelegentlich wird der Proteinase-K-Verdau auch im Beisein von EDTA durchgeführt um labile Mg<sup>2+</sup>-abhängige Nukleasen zu inhibieren {Farrell 2009}.

### *3.2.4. Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol*

Phenol und Chloroform sind organische Lösungsmittel, die sehr effizient zu einer Denaturierung und Präzipitation von Proteinen führen. Zwar stellt Phenol alleine bereits ein effektives Denaturierungsmittel dar, jedoch ist es nur eingeschränkt stabil und oxidiert schnell zu sogenannten Quinonen, die freie Radikale entstehen lassen, welche wiederum Phosphodiesterbrücken aufbrechen und zu einer Quervernetzung von Nukleinsäuren führen. Um diesen Effekt zu verzögern wird daher häufig eine gewisse Menge des Antioxidans 8-Hydroxyquinolon zugesetzt. Das Chloroform, das dem Phenol im Mengenverhältnis 1:1 beigemischt wird, erhöht die Effektivität der Deproteinisierung und erleichtert zudem die Entfernung von Lipiden aus der Probe. Der Isoamylalkohol reduziert das Aufschäumen der Proteine, welches durch die mechanischen Vorgänge bei der Extraktion entstehen würde. Nach Zusatz dieser drei genannten Reagenzien wird die RNase-Aktivität erfolgreich inhibiert {Farrell 2009}.

## 4. Grundlagen der RNA-Isolation

Die wesentlichen Schritte, die jeder Isolationsmethode zu Grunde liegen, bestehen aus der Zelllyse, durch welche die zellulären Strukturen aufgebrochen werden, der Inaktivierung zellulärer Nukleasen und der Auftrennung der zu isolierenden Nukleinsäuren von den übrigen Zellbestandteilen. Die beiden gebräuchlichsten Verfahren, die auch den im Rahmen dieser Arbeit durchgeföhrten Experimenten zu Grunde liegen, sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

### 4.1. Flüssigkeitsbasierte Phasenauf trennung

Bei dieser Methode zur Extraktion von RNA, zuerst beschrieben 1987 von Chomczynski und Sacchi, kommt ein Phenol-Chloroform-Guanidiniumthiocyanat-Gemisch zum Einsatz, das den Aufschluss der Zellen gewährleistet und die RNA vor Degradation schützt. Die nach der Zelllyse und der Zugabe von Chloroform auftretende Phasentrennung ermöglicht ein selektives Abschöpfen der RNA, die sich in der wässrigen Phase befindet, während Proteine und DNA in der Intermediär- bzw. organischen Phase verbleiben. Die Präzipitation der RNA erfolgt im Anschluss durch die Zugabe von Isopropanol {Chomczynski 2006, Sambrook 2001}.

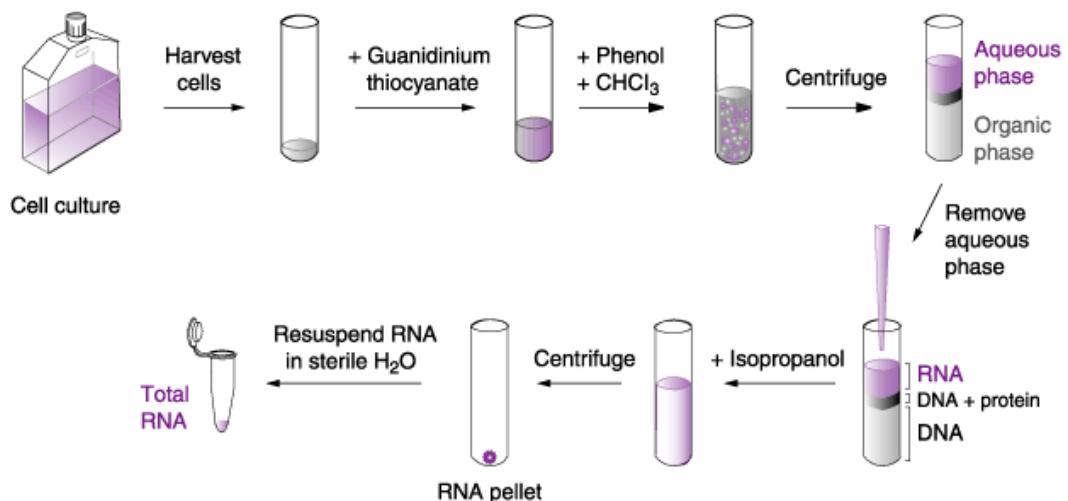


Abb. 4: Flüssigkeitsbasierte Phasenauf trennung

## 4.2. Säulenchromatographie

Im Gegensatz zu der soeben beschriebenen flüssigkeitsbasierten Phasenauf trennung binden die zu extrahierenden Nukleinsäuren bei der Säulenchromatographie an eine feste Phase. Dadurch können zunächst einige Probleme, wie zum Beispiel eine unvollständige Phasentrennung, vermieden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ausschließlich Säulen verwendet, welche die gewünschte RNA mit Hilfe einer Siliziummatrix binden. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der hohen Affinität der negativ geladenen Nukleinsäuren zu den positiv geladenen Siliziumpartikeln. Natriumionen dienen hierbei als eine Kationenbrücke, indem sie die negativ geladenen Strukturen der Nukleinsäuren anziehen und unter hohen Salzkonzentrationen die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem in Wasser enthaltenen Wasserstoff und den in der Siliziummatrix enthaltenen negativ geladenen Sauerstoffionen aufbrechen. Die nun fest gebundenen Nukleinsäuren können durch intensive Waschschrifte gereinigt und anschließend mit destilliertem Wasser oder TE-Puffer eluiert werden {Tan 2009}.

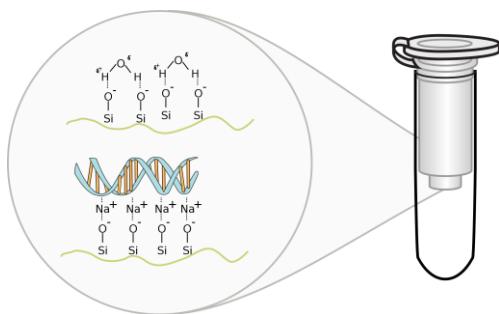


Abb. 5: Säulenchromatographie

## 5. Material und Methoden

### 5.1. Gerätschaften und Reagenzien

#### 5.1.1. RNA Isolationskits

Kit	Hersteller
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy Mini Säulen Sammelgefäß (1,5 und 2 ml) RLT Puffer RW1 Puffer RPE Puffer (Konzentrat) RNase-freies Waser	
peqGOLD RNAPure	peqLab
Einphasige Guanidinthiocyanat-Phenol-Lösung Chloroform (nicht enthalten) Isopropanol (nicht enthalten) Ethanol (nicht enthalten) Polypropylen-Zentrifugenrörchen (nicht enthalten)	
RNeasy Micro Kit	Qiagen
RNeasy MinElute Säulen Sammelgefäß (1,5 und 2 ml) RLT Puffer RW1 Puffer RPE Puffer (Konzentrat) RNase-freies Waser	
mRNA Capture Kit	Roche
Lysepuffer Oligo(dT)20, biotin-labeled Doppelt destilliertes, nukleasefreies Wasser Waschpuffer Streptavidinbeschichtete PCR-Sammelgefäß	

*Tabelle 1: Liste der verwendeten Isolationskits und deren Reagenzien*

### 5.1.2. Weitere Reaktionskits

Kit	Hersteller
RNase-free DNase Set	Qiagen
DNase I, RNase-frei (lyophilized) RDD Puffer RNase-freies Wasser	
RT-PCR	Roche
Oligo-dT-Primer Random-Hexamer-Primer RNase-freies Wasser Reaktionspuffer Desoxyribonucleotid-Mix RNase-Inhibitor Reverse Transkriptase	
PCR	
Desoxyribonucleotid-Mix $\beta$ -Aktin-Primer / P-cadherin-Primer TAQ-Polymerase	Roche TibMolBiol Peqlab

Tabelle 2: Liste der darüber hinaus verwendeten Reaktionskits und deren Reagenzien

### 5.1.3. Weitere Reagenzien

Reagenz	Hersteller
MOPS-Puffer	AppliChem
PBS-Puffer	Sigma
Ethanol	Roth
Isopropanol	Merck
Chloroform	Merck
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Agarose	Biozym
RNA loading solution	BioRad
Formaldehyd	Merck
Proteinase K	Roche

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten, nicht in den Reaktionskits enthaltenen Reagenzien

#### 5.1.4. Gerätschaften

Gerät	Hersteller
Bürsten zur Abstrichnahme	CooperSurgical
PCR-Gerät	MJ Research
RNA/DANN-Messgerät	Picodrop
Zentrifuge	Peqlab
Vortex-Gerät	Scientific Industries
Agarosegelkammer	Biometra
Geräte zum Abfotografieren der Gele	Intas

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Hilfsmittel

#### 5.1.5. Sequenzen der verwendeten Primer

##### I) $\beta$ – Aktin Primer

$\beta$  – Aktin Forward 100  $\mu$ m: CCAACCGCGAGAAGATG

$\beta$  – Aktin Reverse 100  $\mu$ m: TCCATCACGATGCCAGTG

##### II) P – Cadherin Primer

P – Cadherin forward: AGAGAGATTGGGTGGTTGCTC

P – Cadherin reverse: GCCTGGATGGTCAGTGTGTA

## **5.2. Patientengut und Probengewinnung**

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, die es erlaubt aus oralen Bürstenbiopsien RNA-Isolate zu gewinnen, welche sowohl quantitativ als auch qualitativ für weitergehende Analysen verwendbar sind. Zu diesem Zweck wurden über einen Zeitraum von etwa einem Jahr insgesamt 236 Bürstenabstriche von der oralen Mukosa gesunder Probanden genommen und weiterverarbeitet. Um die dabei gewonnenen Erkenntnisse auf ihre Praxistauglichkeit zu überprüfen, wurden im Anschluss zusätzlich 28 Proben von insgesamt 10 Patienten mit diagnostiziertem Mundhöhlenkarzinom gewonnen und die Ergebnisse der RNA-Isolation mit der unter Laborbedingungen angefertigten Testreihe verglichen. Die Bürstenköpfe wurden sofort nach der Probenentnahme vom Bürstenstiel abgetrennt und in eisgekühlten PBS-Puffer überführt. Anschließend wurden die Proben kurz gevortext und die Bürstenköpfe aus der Pufferlösung entfernt. Danach wurden die Proben für fünf Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Sofort nach Abnahme des Überstandes wurden die Proben dann in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren.

Um die RNA-Ausbeute zu erhöhen wurde nach der Bearbeitung einer gewissen Anzahl von Proben die Prozedur insoweit modifiziert, als dass die Bürstenköpfe nach Entnahme der Abstriche sofort in ein mit 600 µl Lysepuffer gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß getaucht wurden.

Die eigentliche Isolation wurde unter Verwendung verschiedener sogenannter Reaktionskits, d.h. kommerziell vertriebener Sets, die alle notwendigen Materialien und Reagenzien für die RNA-Isolation nach einem der oben beschriebenen Prinzipien enthalten, durchgeführt. Dabei kamen das RNeasy Minikit von Qiagen, das peqGOLD RNAPure Kit von PeqLab, das RNeasy Microkit von Qiagen sowie das mRNA Capture Kit von Roche zum Einsatz. Die einzelnen Schritte sollen im Folgenden kurz beschrieben werden.

### *5.2.1. Prozedur RNA-Isolation mit RNeasy Minikit (Säulenchromatographie)*

Die schockgefrorenen Proben wurden zunächst in 200 µl eisgekühltem PBS-Puffer resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 40 µl Proteinase K und eine zehnminütige Inkubation bei 55 °C. Danach wurden die Proben mit je 4 µl poly-A RNA versetzt und es erfolgte die Zugabe von 350 µl Lysepuffer zum Zellaufschluss. Dem Lysepuffer wurde zuvor 3,5 µl β-Mercaptoethanol beigemischt um den

Zellaufschluss zu verstrenken und eine zusätzliche Inhibition der RNasen zu erreichen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von zehn Minuten bei 70° zur Inaktivierung der Proteinase K erfolgte die Zugabe von 350 µl Ethanol (70%). Nach kurzem Vortexten wurden je 700 µl jeder Probe auf eine RNeasy Säule überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Proben für 15 Sekunden bei 10 000 U/min und anschließendem Verwerfen des Unterstandes. Dann erfolgte ein DNase-Verdau zur Beseitigung genomischer DNA, wobei je 10 µl DNase-Lösung und 70 µl Puffer zu jeder Probe pipettiert wurden. Die Proben wurden mit der DNase-Lösung je 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden je 700 µl Waschpuffer RW1 auf die Säule gegeben und diese für 15 Sekunden bei 10 000 U/min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Unterstandes erfolgte die Zugabe von je 500 µl RPE Puffer und eine erneute Zentrifugation für 15 Sekunden bei 10 000 U/min. Im letzten Waschschrift wurden nochmals 500 µl RPE Puffer hinzugegeben und die Proben für 2 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert. Danach wurde die jeweilige Säule in ein frisches Reaktionsgeff überführt und die RNA durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser und Zentrifugation für 1 Minute bei 10 000 U/min eluiert.

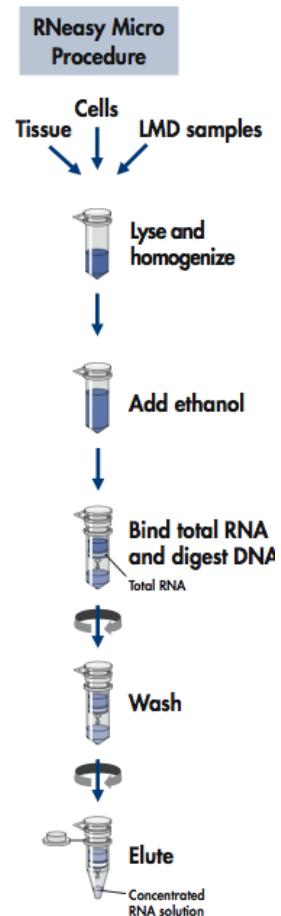


Abb. 6: Prozedur RNeasy Minikit

### 5.2.2. Prozedur RNA-Isolation mit peqGOLD RNAPure (flüssigkeitsbasierte Phasenauf trennung)

Die schockgefrorenen Proben wurden zunächst in 500 µl RNAPure-Lösung suspendiert und nach kurzem Vortexten für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde den Proben je 100 µl Chloroform beigemischt. Die Proben wurden 15 Sekunden lang kräftig geschüttelt und 5 Minuten auf Eis gestellt. Danach erfolgte eine Zentrifugation bei 13 000 U/min für 5 Minuten. Da sich die RNA nach Aufschluss der Zellen in der wässrigen Phase löst wurden von dieser je 200 µl abgenommen und in ein neues Reaktionsgeff überführt. Zur Präzipitation der RNA wurden dann je 200 µl Isopropanol hinzugegeben und kurz umgeschüttelt. Zusätzlich wurden je 2 µl Glykogen beigemengt und die Proben für 15 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer zehnminutigen Zentrifugation bei 13 000 U/min (4° C) wurde der Überstand

abgenommen und 500 µl Ethanol (75%) hinzugegeben. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 10 Minuten bei 13 000 U/min. Der Überstand wurde wieder abgenommen, das Ethanol hinzugegeben und nochmals zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Proben 20 Minuten luftgetrocknet. Die Elution der RNA erfolgte mit je 30 µl RNase-freiem Wasser. Um die Löslichkeit der RNA in Wasser zu verbessern wurden die Proben abschließend für 10 Minuten bei 55° erhitzt.

### *5.2.3. Prozedur RNA-Isolation mit peqGold MicroSpin RNA Kit (Säulenchromatographie)*

Die schockgefrorenen Zellpellets wurden zunächst mit 350 µl QVL-Puffer, der zuvor mit 7 µl β-Mercaptoethanol versetzt wurde, suspendiert. Dann wurde den Proben je 4 µl einer Carrier-RNA Lösung zugesetzt. Danach erfolgte ein Scheren der DNA durch jeweils sechsmaliges Aufziehen mit einer Spritze (gauge 21). Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 10 000 U/min wurde das geklärte Lysat in ein 1,5 ml Zentrifugationsröhrchen überführt und 350 µl Ethanol (70%) hinzugefügt. Nach kräftigem Vortexen wurden je 700 µl der Probe auf eine Hi-Bind RNA Säule geladen. Die Proben wurden dann für 15 Sekunden bei 10 000 U/min zentrifugiert und der Unterstand im Sammelgefäß verworfen. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl RNA Waschpuffer I mit anschließender Zentrifugation bei 10 000 U/min für 1 Minute und Verwerfen des Durchflusses. Danach wurde ein DNase-Verdau durchgeführt (vgl. RNeasy Minikit). Dann erfolgte die Zugabe von 500 µl RNA Waschpuffer II mit anschließender Zentrifugation bei 10 000 U/min für 30 Sekunden und Verwerfen des Durchflusses. Der Waschschnitt mit dem RNA Waschpuffer II wurde dann wiederholt. Im gleichen Sammelgefäß wurden die Hi-Bind Säulen durch Zentrifugation bei 13 000 U/min für 2 Minuten getrocknet. Danach wurden die Säulen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und die RNA durch Zentrifugation bei 13 000 U/min für 1 Minute mit je 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

#### 5.2.4. Prozedur RNA-Isolation mit mRNA Capture Kit

Die schockgefrorenen Proben wurden zunächst in 200 µl Lysepuffer suspendiert und die DNA durch sechsmaliges Aufziehen mit einer Spritze (21 gauge) geschert. Dann

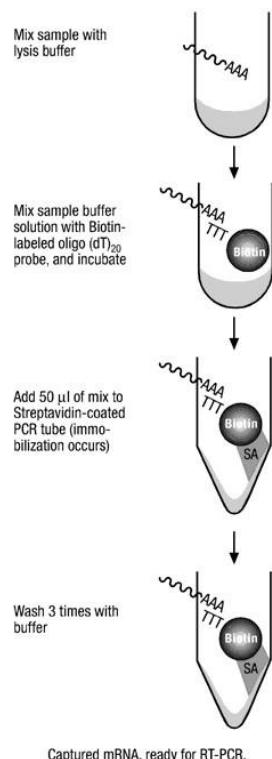


Abb. 7: Prozedur mRNA Capture Kit

wurden je 4 µl der Oligonukleotidlösung (biotin-labeled) hinzugegeben und die Proben bei 37° C 5 Minuten lang inkubiert. Danach wurden 50 µl von jeder Probe in ein mit Streptavidin beschichtetes PCR Reaktionsgefäß überführt und 3 Minuten lang bei 37° C inkubiert. Der Mix wurde dann aus dem PCR Reaktionsgefäß entfernt und dieses je dreimal mit 250 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem Waschschnitt wurde das Reaktionsgefäß direkt für die cDNA Synthese und die Amplifikation mittels PCR eingesetzt. Dies macht deutlich, dass die Handhabung dieser Methode speziell für anschließende PCR Anwendungen enorm vereinfacht ist, da keine zusätzlichen Reaktionsgefäße benötigt werden. Jedoch bleibt die isolierte RNA zu jedem Zeitpunkt an das Reaktionsgefäß gebunden und kann so nicht für andere Zwecke, wie z.B. die Auftragung auf ein Agarose-Gel, verwendet werden.

### 5.3. Weiterverarbeitung der Proben

#### 5.3.1. Photometrische Vermessung der isolierten RNA

Unmittelbar nach der Elution der RNA wurde diese auf Eis zwischengelagert und die photometrische Vermessung des Isolats vorbereitet. Hierzu wurde das Messgerät zunächst mit dem verwendeten RNase-freien Wasser geeicht. Dann folgte die jeweils dreimalige Messung des RNA-Gehalts jeder Probe. Der errechnete Mittelwert wurde als Messergebnis notiert.

Zusätzlich zur eigentlichen RNA-Ausbeute wurde die Reinheit der RNA, welche sich im Verhältnis der bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge absorbierenden Strukturen ausdrückt, photometrisch bestimmt.

#### 5.3.2. Umschreibung der isolierten RNA in cDNA mittels RT-PCR

Um die isolierte RNA als Grundlage für eine PCR verwenden zu können, muss diese zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dies gelingt mit Hilfe der sogenannten

reversen Transkriptase, einem Enzym, dass die ursprüngliche Richtung der Transkription umkehrt und es so ermöglicht, aus RNA komplementäre DNA herzustellen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 3 µl der gereinigten RNA, 1 µl eines oligo-dT-Primers, 2 µl eines random-hexamer-Primers und 7 µl eines für PCR-Anwendungen aufbereiteten Wassers zu einem sogenannten Primer-Mix vermengt. Um die Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen wurde dieser Mix zunächst für 10 Minuten bei 65°C erhitzt und danach sofort auf Eis wieder abgekühlt. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 5 µl Reaktionspuffer, 2 µl eines Desoxyribonucleotid-Mix, 0,5 µl eines RNase-Inhibitors und 0,5 µl der reversen Transkriptase. Die eigentliche Umschreibung geschieht im Anschluss im PCR-Gerät, in dem die Proben zunächst für 10 Minuten auf 25°C und dann für 30 Minuten auf 55°C erhitzt werden. Durch das abschließende fünfminütige Erhitzen der Proben auf 85°C (Denaturierung des Enzyms) wird die Reaktion beendet und die Proben auf Eis gestellt.

#### *5.3.3. Semiquantitative Bestimmung des RNA-Gehalts durch Amplifikation der cDNA mittels PCR und anschließender Elektrophorese*

Das Prinzip der PCR beruht auf der enzymatischen Vervielfältigung definierter DNA-Abschnitte. Dementsprechend werden für einen Reaktionsansatz eine zu Grunde liegende DNA (in diesem Fall die zuvor synthetisierte cDNA), ein als Substrat für die entstehenden DNA-Kopien dienender Nukleotid-Mix, zwei sogenannte Primer, die den Anfang und das Ende des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts festlegen (im Rahmen dieser Arbeit kamen sowohl β-Aktin-Primer als auch P-cadherin-Primer zum Einsatz), sowie eine DNA-Polymerase (hier wurde die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnene TAQ-Polymerase verwendet) benötigt. Von den genannten Bestandteilen wurde pro Ansatz je 1 µl mit 10 µl Reaktionspuffer und 35 µl Wasser (PCR grade) versetzt und für die eigentliche Reaktion in das PCR-Gerät gegeben.

#### *5.3.4. Ermittlung der RNA-Qualität durch Elektrophorese des RNA-Isolats*

Um die Qualität der isolierten RNA bzw. die Degradation derselben beurteilen zu können, eignet sich die Darstellung der sogenannten 18s und 28s – Banden durch eine elektrophoretische Auftrennung der RNA-Bestandteile auf einem Agarose-Gel. Die Abgrenzbarkeit der genannten Banden spricht dabei für eine hohe Qualität und Integrität der eingesetzten RNA. Die Herstellung des denaturierenden Agarose-Gels erfolgte durch das Auflösen von 1 g Agarose in 87,5 ml destilliertem Wasser. Nach

mehrmaligem Aufkochen bis zur vollständigen Lösung der Agarose wurde das Gemisch kurz bis auf „Handwärme“ heruntergekühlt. Um zu gewährleisten, dass während der Elektrophorese keine zusätzliche Degradation stattfinden kann, wurde dem Ansatz 5ml 10x MOPS-Puffer sowie 7,5 ml 12,3 M Formaldehyd zugesetzt. Anschließend wurde der Agarosemix in die zuvor mit DEPC-Wasser gereinigte Gelkammer überführt und die Polymerisation des Gels abgewartet. Währenddessen wurden je 10 µl der isolierten RNA mit 10 µl der RNA *loading solution* versetzt und 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Nach einminütiger Abkühlung des Ansatzes auf Eis wurde dieser komplett auf das Gel aufgetragen und eine Spannung von ca. 90 Volt angelegt. Nach einer Laufstrecke von etwa 4 cm wurde das Gel aus der Kammer entfernt und unter UV-Licht fotografiert.

## 6. Ergebnisse

### 6.1. Messwerte

Wie zuvor beschrieben, wurde um die Degradation der RNA während der Entnahmeprozedur zu minimieren und damit die RNA-Ausbeute zu erhöhen, das von den Herstellern der jeweiligen Kits empfohlene Isolationsprotokoll in Teilen modifiziert (vgl. Abschnitt 5.2 und 7.2). Einen Überblick über die mit jedem Kit im Durchschnitt erzielte RNA-Ausbeute sowohl mit der herkömmlichen als auch mit der modifizierten Isolationsmethode gibt die folgende Tabelle.

<b>Isolationsmethode</b>	<b>Probenzahl</b>	<b>RNA-Gehalt (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
RNeasy Minikit	36	11,955 (7,795)	
RNeasy Minikit *	32	33,2975 (18,619)	1,608
peqGOLD RNAPure	64	21,212 (14,490)	
peqGOLD RNAPure *	32	86,048 (27,485)	1,498
Microkit	36	21,813 (4,879)	
Microkit *	36	92,433 (38,02)	1,793

*Tabelle 5: Messergebnisse im Durchschnitt (\* = mod. Probenentnahme, Standardabweichung in Klammern)*

Aus den durchschnittlich gemessenen Werten ist ersichtlich, dass sich durch die Modifikation der Isolationsmethode mit allen verwendeten Kits eine deutlich höhere RNA-Ausbeute erzielen ließ. Insbesondere mit dem RNAPure Kit von peqLAB und dem Microkit von Qiagen waren Steigerungen um bis zu 300% zu verzeichnen (vgl. Abbildung 8).

Zusätzlich zu den deutlich höheren Durchschnittswerten hat sich die Konstanz der Ergebnisse, besonders im Hinblick auf die Ausfallquote, d.h. die Anzahl an Proben ohne messbaren RNA-Gehalt, erheblich verbessert.

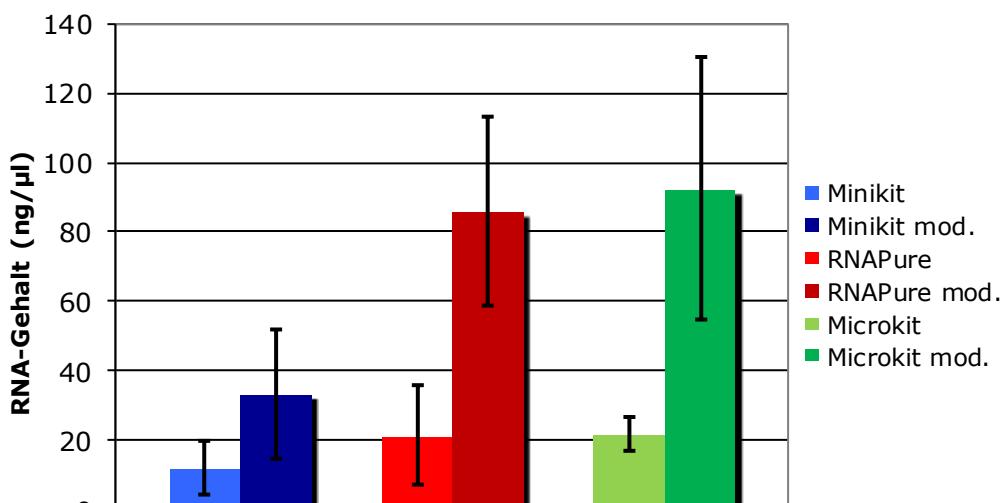


Abb. 8: Messergebnisse der RNA-Ausbeute (in ng/µl) nach Isolation mit verschiedenen Methoden

Abbildung 9 stellt die Isolationsergebnisse mit der herkömmlichen Isolationsmethode dar. Auffallend ist hier, dass bei der RNA-Isolation mit dem Minikit von Qiagen in mehreren Fällen keine photometrisch nachweisbare RNA gewonnen werden konnte. Mit dem RNAPure Kit waren dagegen zwar weniger Ausfälle zu verzeichnen, jedoch sticht hier die große Schwankungsbreite der Ergebnisse ins Auge (vgl. Standardabweichungen in Tabelle 5 bzw. Abbildung 8). Lediglich die Isolation mit dem Microkit lieferte quantitativ relativ verlässliche Werte, wenn auch auf einem recht niedrigen Niveau.

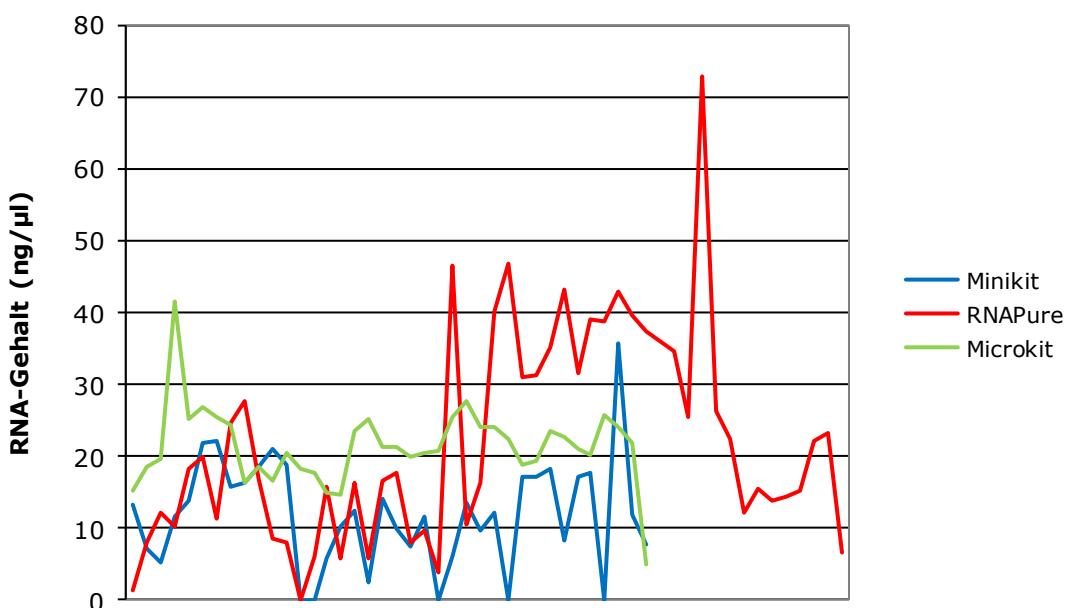
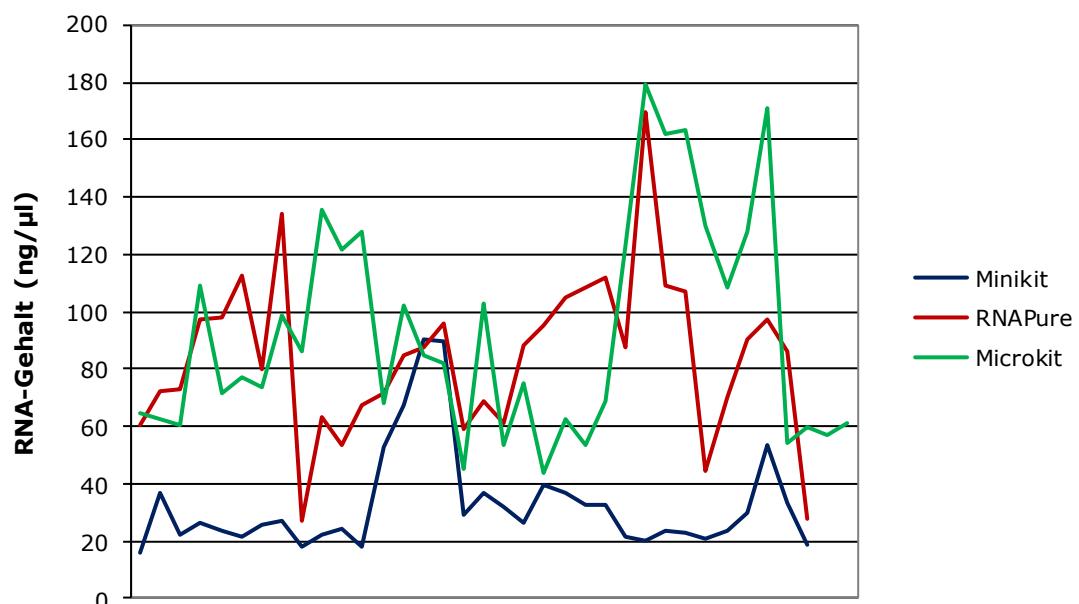


Abb. 9: Messwerte des RNA-Gehaltes von RNA-Isolationen mit Kits unterschiedlicher Hersteller (herkömmliche Isolationsmethode). Entlang der x-Achse sind die einzelnen Proben dem Entnahmedatum entsprechend chronologisch dargestellt.

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der RNA-Isolation mit modifizierter Isolationsmethode. Sowohl mit dem Minikit als auch mit dem RNAPure Kit führten sämtliche Isolationsversuche zu einem messbaren Ergebnis. Zwar zeigt sich die Schwankungsbreite der Messergebnisse mit dem Microkit ähnlich hoch wie mit dem RNAPure Kit, jedoch konnte zumindest mit dem Microkit in jedem Fall eine Ausbeute erzielt werden, die über den maximal erzielten Ergebnissen mit der herkömmlichen Methode lagen. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass sowohl die quantitative Ausbeute an RNA als auch die Konstanz der Ergebnisse durch die Modifikation deutlich gesteigert werden konnte.



Werte insgesamt. Während die Messwerte des Minikits deutlichen Schwankungen um einen akzeptablen Mittelwert von etwa 1,6 unterliegen, zeigen die Ergebnisse des RNAPure Kits zwar eine höhere Konstanz, der Durchschnittswert von etwa 1,5 weist jedoch auf eine stärkere Verunreinigung der Proben mit Proteinen hin. Ähnlich wie bei der quantitativen Messung des RNA-Gehalts wurden auch hier mit dem Microkit die besten Ergebnisse im Sinne einer möglichst geringen Verunreinigung erzielt, es konnten verlässlich Werte zwischen 1,5 und 2 (im Durchschnitt etwa 1,8) erzielt werden.

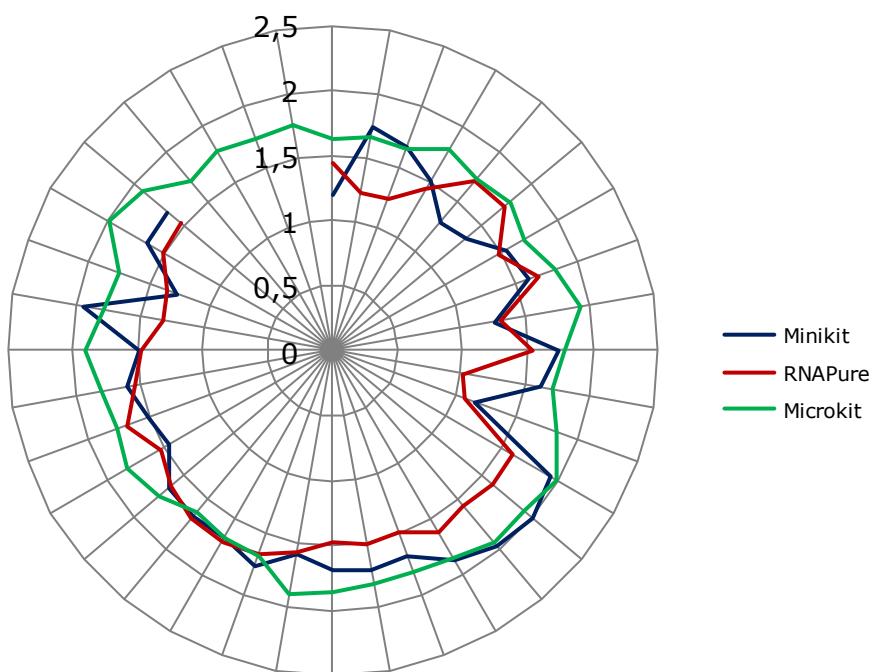


Abb. 11: Streubereich der gemessenen 260/280-Werte

Nachdem sich die modifizierte Isolationsmethode mit dempeqGOLD MicroSpin RNA Kit (Microkit) als die beste sowohl im Hinblick auf Quantität und Reinheit des Isolats, als auch in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse herauskristallisiert hatte, wurden nach diesem Verfahren 28 Bürstenbiopsien von insgesamt 10 verschiedenen Patienten gewonnen und jeweils am Tag der Gewinnung vermessen. Die Proben wurden jeweils aus dem in allen Fällen bereits makroskopisch erkennbaren und häufig bereits ulzerierten Tumorareal entnommen. Je nach Lokalisation und Schmerzempfindlichkeit der entarteten Schleimhaut unterlag die Entnahmeprozедur gewissen Schwankungen, die sicher zum Teil die

Streuungsbreite von Patient zu Patient in den Messungen erklären können. Es bleibt dennoch festzuhalten, dass aus allen diesen unter Praxisbedingungen gewonnenen Bürstenbiopsien eine ausreichende Menge RNA-Material in ausreichender Qualität isoliert werden konnte. Die einzelnen Messwerte sind in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Probe	Entnahme	Messwert (ng/ $\mu$ l)	260/280
1.1	13.02.2009	62,98	1,913
1.2	13.02.2009	23,356	1,433
1.3	13.02.2009	20,283	1,74
2.1	23.02.2009	35,286	1,523
2.2	23.02.2009	43,79	1,763
2.3	23.02.2009	54,29	1,683
3.1	04.05.2009	146,176	1,92
3.2	04.05.2009	33,23	1,856
3.3	04.05.2009	71,74	1,843
4.1	04.05.2009	37,046	1,77
4.2	04.05.2009	61,73	1,846
4.3	04.05.2009	67,48	1,772
5.1	04.05.2009	20,52	1,533
5.2	04.05.2009	37,126	1,986
5.3	04.05.2009	18,94	1,833
6.1	12.05.2009	86,716	1,723
6.2	12.05.2009	94,23	1,81
6.3	12.05.2009	107,296	1,8633
7.1	12.05.2009	188,06	1,7
7.2	12.05.2009	165,03	1,77
8.1	02.06.2009	44,503	1,62
8.2	02.06.2009	31,193	1,6233
8.3	02.06.2009	28,05	1,876
9.1	02.06.2009	144,93	1,8166
9.2	02.06.2009	195,96	1,8166
9.3	02.06.2009	253,863	1,833
10.1	02.06.2009	35	1,9
10.2	02.06.2009	30,236	1,953
<b>Mittelwert</b>		<b>76,394</b>	<b>1,775</b>

*Tabelle 6: Messergebnisse der Patientenproben im Einzelnen und im Durchschnitt. Es wurden sowohl die quantitative RNA-Ausbeute als auch der Grad der Verunreinigung in Form des 260/280-Werts gemessen.*

## 6.2. Elektrophorese

Im Rahmen dieser Arbeit sollte unter anderem gezeigt werden, dass die mit unterschiedlichen Kits isolierte RNA qualitativ gut genug ist, um im Anschluss an eine Umschreibung in cDNA ein PCR-Produkt detektieren zu können. Wie in Abschnitt 5.3.3 beschrieben, wurde zu diesem Zweck standardmäßig  $\beta$  – Aktin als Transkript der PCR nachgewiesen. Bei allen Abbildungen handelt es sich um exemplarische Darstellungen, die jeweils repräsentativ für alle weiteren mit der jeweiligen Methode erzielten Ergebnisse stehen. Mit der auf einigen Aufnahmen zu sehenden DNA-Leiter wurde nachgewiesen, dass sich das  $\beta$  – Aktin-Transkript auf der zu erwartenden Höhe (450 bp) darstellt. Bei den sogenannten Kontrollproben handelte es sich um vorbereitete Zellpellets aus unterschiedlichsten Geweben, die im Vergleich zur Bürstenbiopsie eine relativ hohe Zellzahl aufweisen und auf Grund ihrer Herkunft nicht so stark durch die Anwesenheit von RNasen belastet sind wie die entsprechenden aus der Mundhöhle gewonnen Proben. Die von einigen Herstellern zu Vergleichszwecken in den verschiedenen Kits mitgelieferte Sample RNA wurde darüber hinaus in einigen Elektrophoresen eingesetzt.

### 6.2.1. RNeasy Minikit

Obwohl das PCR-Verfahren als sehr sensitive Methode zum Nachweis von DNA gelten darf, zeigte sich, wie in der folgenden Darstellung zu sehen, bei der Gelelektrophorese nach RNA-Isolation mit dem RNeasy Minikit und anschließender Umschreibung in cDNA nur in wenigen Fällen ein verwertbares  $\beta$ -Aktin Bandenmuster.

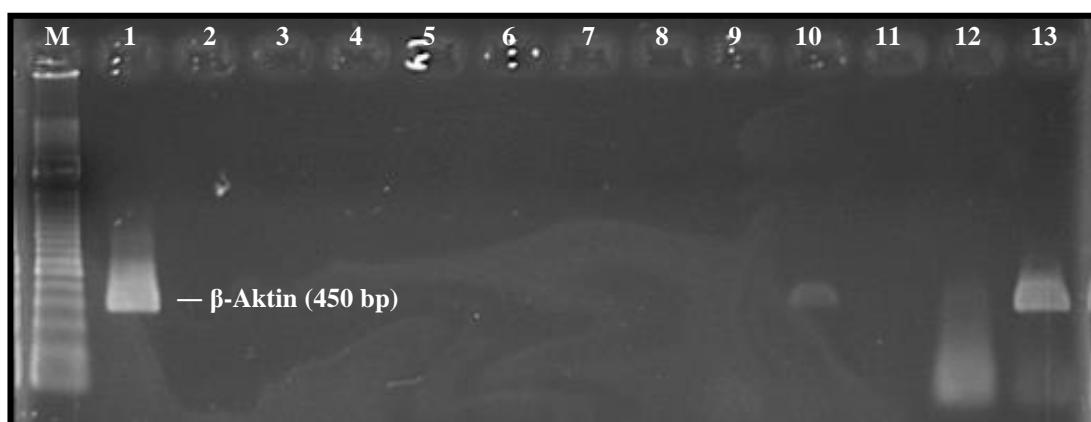


Abb. 12: Gelelektrophorese einer PCR mit  $\beta$ -Aktin-Nachweis in verschiedenen Patientenproben. Die RNA-Isolation erfolgte zuvor mit dem RNeasy Minikit. M = Marker (Markerbändern in 100 bp Schritten), Bahnen 1-12: Patientenproben 7.1-9.4, Bahn 13: Kontrollprobe

Noch gravierender stellte sich der Unterschied zwischen den eigentlichen, d.h. den aus den Bürstenbiopsien mit dem jeweiligen Kit isolierten Proben (vgl. Abschnitt 5.2) und der Kontrollprobe bei der Auswertung des RNA-Agarosegels dar. Keine der Proben, mit Ausnahme der auf Bahn 1 aufgetragenen Sample RNA, zeigte ein verwertbares Bandenmuster im Sinne einer klar zu identifizierenden 18s bzw. 28s-Bande.

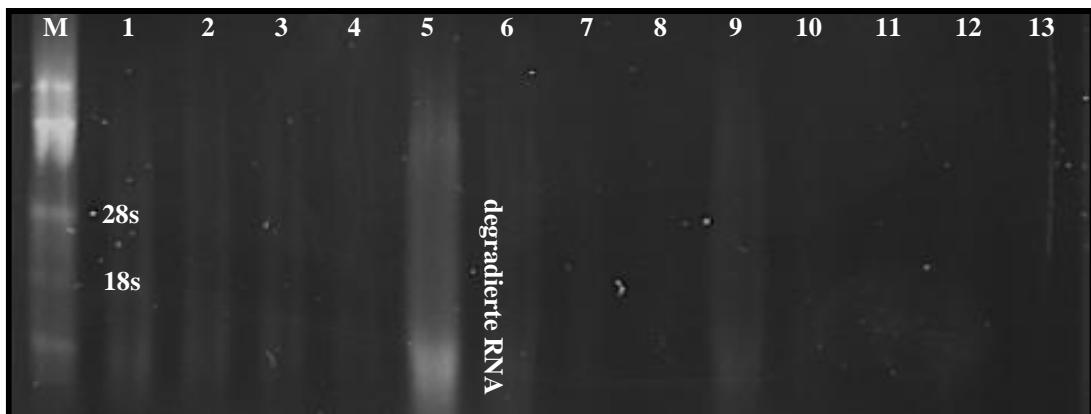
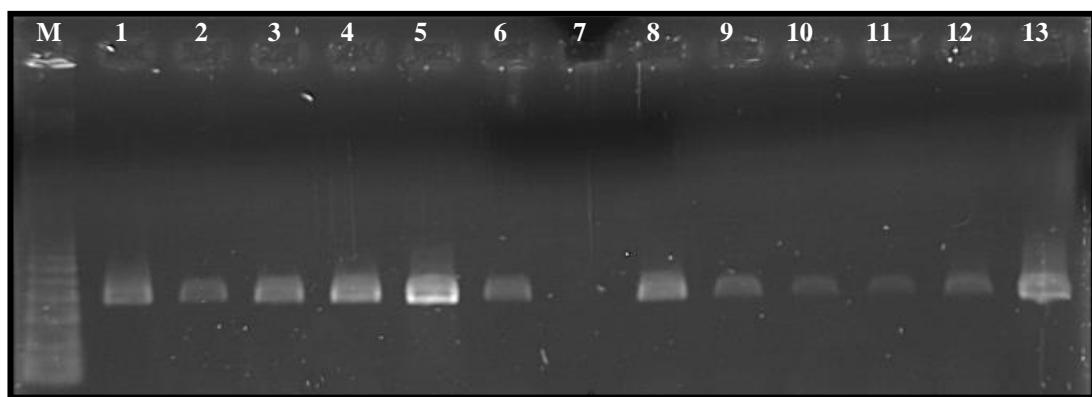


Abb. 13: Gelelektrophorese von RNA-Isolaten (Isolation mit RNeasy Minikit) aus verschiedenen Patientenproben. M = Marker für 28 und 18s – RNA. Bahnen 1-12: Patientenproben 7.1-9.4

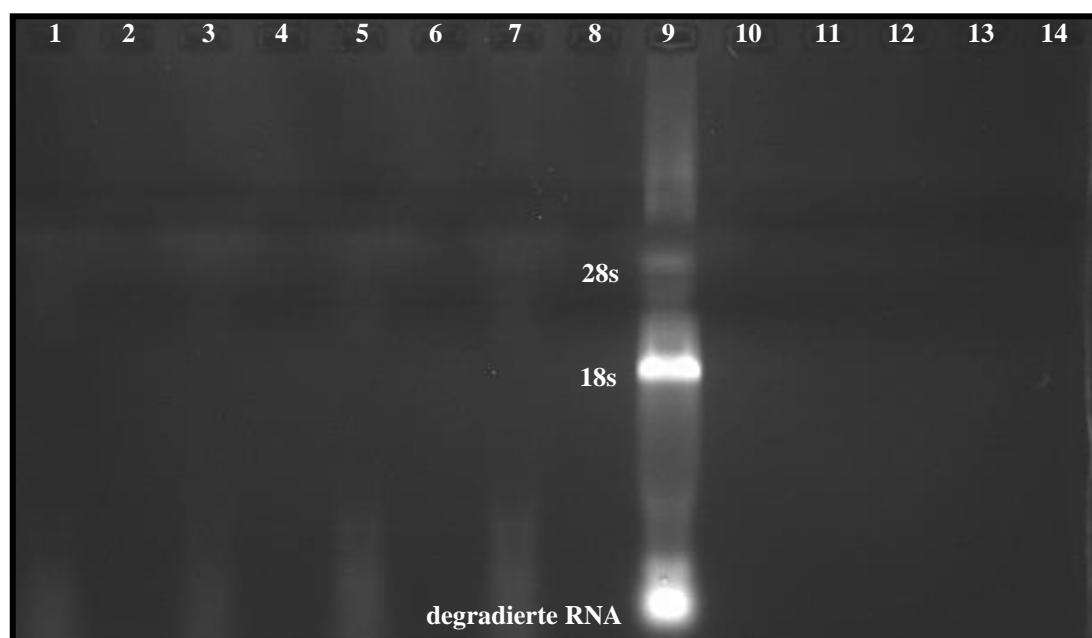
### 6.2.2. *peqGOLD RNAPure*

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode gelang ein verlässlicher Nachweis der durch RT-PCR gewonnenen DNA (vgl. Abb. 14). Die fehlende Bande auf Bahn 7 ist dabei am ehesten durch ein ungenügendes Einlaufen der flüssigen Agarose (vermutlich durch eine Luftblase verursacht) oder durch eine Beschädigung des Agarosegels beim Herausziehen des Plastikkamms, der als Platzhalter für die Vertiefungen zum Einfüllen der RNA und der RNA *loading solution* fungiert, in die bereits erstarrte Agarose zu erklären.



*Abb. 14: Gelelektrophorese einer PCR mit  $\beta$ -Aktin-Nachweis in verschiedenen Patientenproben. M = Marker (Markerbanden in 100 bp Schritten), Bahnen 1-4: Patientenproben 7.1-7.4, Bahn 5: Kontrollprobe, Bahnen 6-12: Patientenproben 4.1, 4.2, 4.4, 5.2, 6.1, 6.2, 6.3, Bahn 13: Sample RNA*

Jedoch lag auch hier die isolierte RNA in zu geringer Menge vor und zeigte eine zu starke Degradation, als dass eine Darstellung auf einem Agarosegel gelingen konnte (vgl. Abb. 15). Die Konzentration der aufgetragenen RNA ergibt sich auch hier durch die in den Bildunterschriften angegebenen Zuordnungen von Bahnen und Probennummern, wobei die einzelnen Probenwerte im Tabellenanhang detailliert aufgelistet sind (vgl. Abschnitt 9)



*Abb. 15: Gelelektrophorese von RNA-Isolaten (Isolation mit peqGOLD RNAPure) aus verschiedenen Patientenproben. Bahn 1: Probe 7.3, Bahn 3: Probe 7.4, Bahn 5: Probe 8.3, Bahn 7: Probe 8.4, Bahn 9: Kontrollprobe*

### 6.2.3. RNeasy Microkit

Auch die mit Hilfe des RNeasy Microkit von Qiagen isolierte RNA ließ sich nach der Umschreibung in cDNA und anschließender  $\beta$ -Aktin PCR reproduzierbar auf einem Agarosegel darstellen (vgl. Abb. 16).

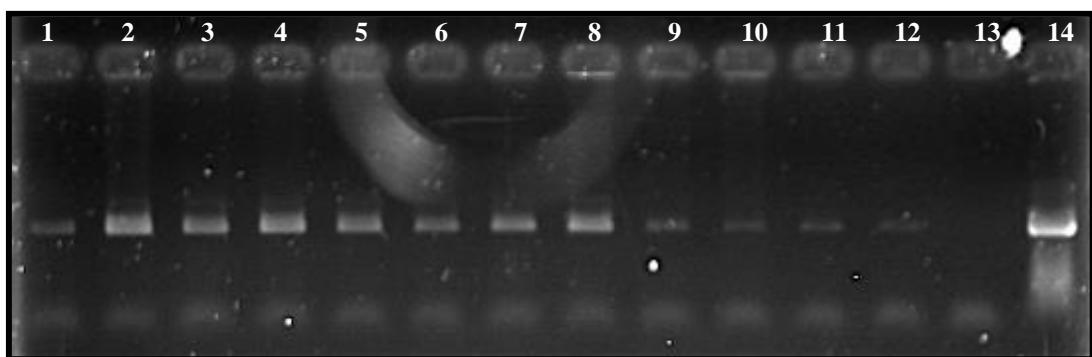


Abb. 16: Gelelektrophorese einer PCR mit  $\beta$ -Aktin-Nachweis in verschiedenen Patientenproben. Bahnen 1-12: Patientenproben 1.1-3.4, Bahn 13: Leerkontrolle, Bahn 14: Kontrollprobe

Jedoch gelang auch hier auf Grund der zu geringen Menge bzw. der zu starken Degradation kein direkter Nachweis der RNA durch die Gelelektrophorese. Die Kontrollproben zeigen das erwünschte Bandenmuster (vgl. Abb. 17).

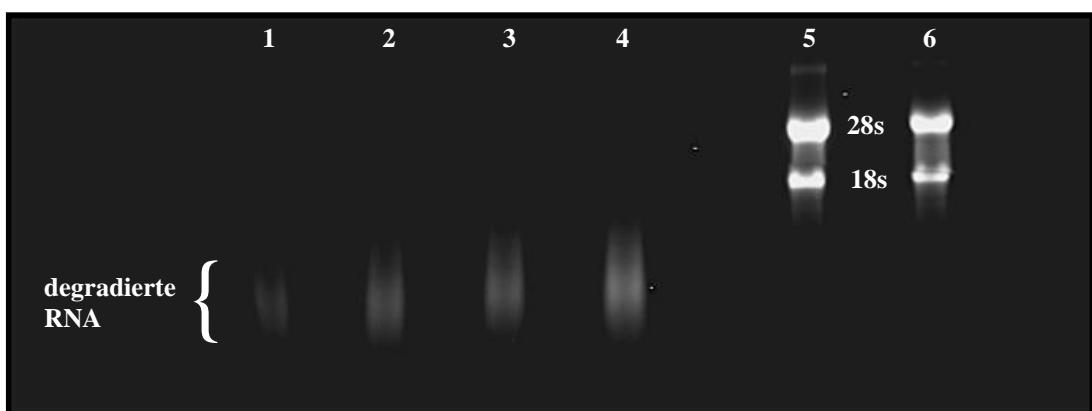


Abb. 17: Gelelektrophorese von RNA-Isolaten (Isolation mit RNeasy Microkit) aus verschiedenen Patientenproben. Bahnen 1-4: Patientenproben 1.1-1.4, Bahn 5: Kontrollprobe vom 08.09.08, Bahn 6: Kontrollprobe vom 10.09.08

#### 6.2.4. mRNA Capture Kit

Die mit dem mRNA Capture Kit von Roche isolierte und in cDNA umgeschriebene bzw. durch PCR vervielfältigte RNA wurde ebenfalls auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. Abb. 18). Zwar stellt sich die Kontrollprobe deutlich stärker dar als die eigentlichen Proben, jedoch gelang in jedem Fall ein Nachweis des PCR-Produkts.

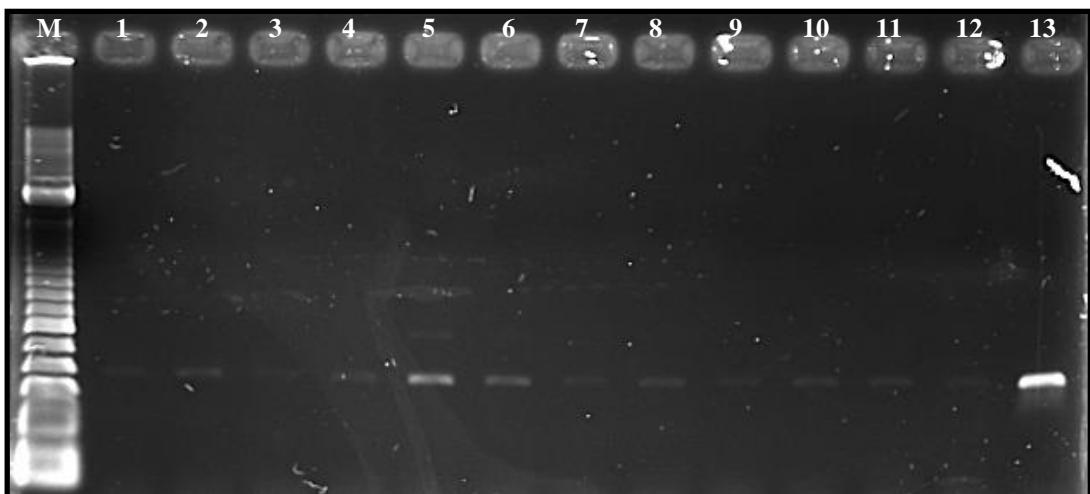


Abb. 18: Gelelektrophorese einer PCR mit  $\beta$ -Aktin-Nachweis in verschiedenen Patientenproben. Die RNA-Isolation erfolgte zuvor mit dem mRNA Capture Kit. M = Marker (Markerbanden in 100 bp Schritten), Bahnen 1-12: Patientenproben 1.1-3.4, Bahn 13: Kontrollprobe

Zusätzlich wurde im Anschluss eine PCR mit Primern, welche für die Detektion des membranständigen P-Cadherins verwendet werden, anstelle der standardmäßig im Rahmen dieser Arbeit verwendeten  $\beta$ -Aktin-Primer, durchgeführt. Der Nachweis der P-Cadherin PCR-Produkte mit richtiger Länge (650 bp) durch Gelelektrophorese gelang auch hier zuverlässig (vgl. Abb. 19).

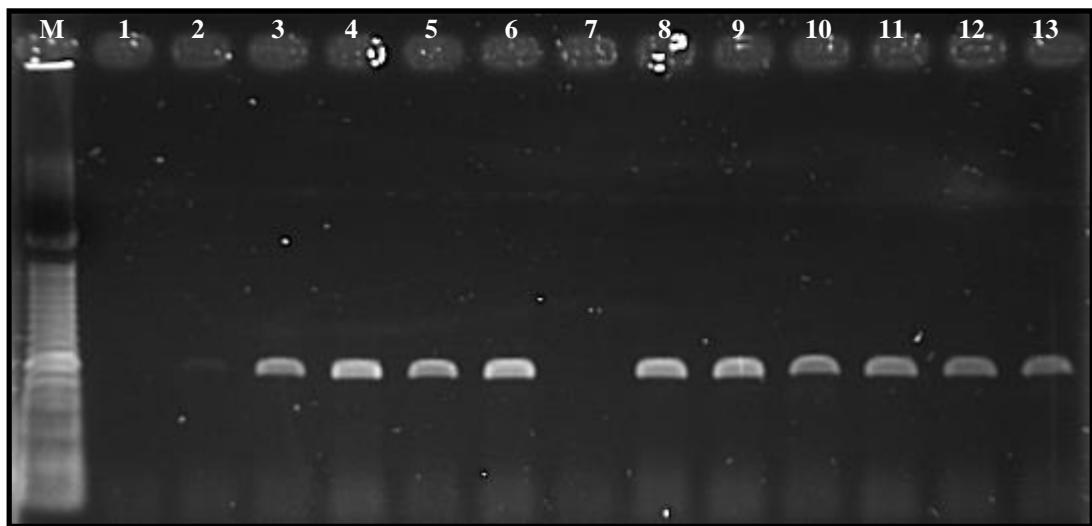


Abb. 19: Gelelektrophorese einer PCR mit P-Cadherin-Nachweis in verschiedenen Patientenproben. RNA-Isolation zuvor mit mRNA Capture Kit.  
M = Marker (Markerbanden in 100 bp Schritten), Bahnen 1-3: Proben 4.1-4.3, Bahnen 4-11: Proben 5.1-6.4, Bahn 12: Leerkontrolle, Bahn 13: Kontrollprobe

#### 6.2.5. PCR Gel Nachkontrolle

Um zu beweisen, dass auch nach längerer (in diesem Fall dreimonatiger) Lagerung bei -80° noch RNA nachzuweisen ist, wurde mit einigen Proben, die zuvor mit peqGOLD RNAPure isoliert wurden, eine Umschreibung in cDNA mit anschließender  $\beta$ -Aktin PCR durchgeführt (vgl. Abb. 20).

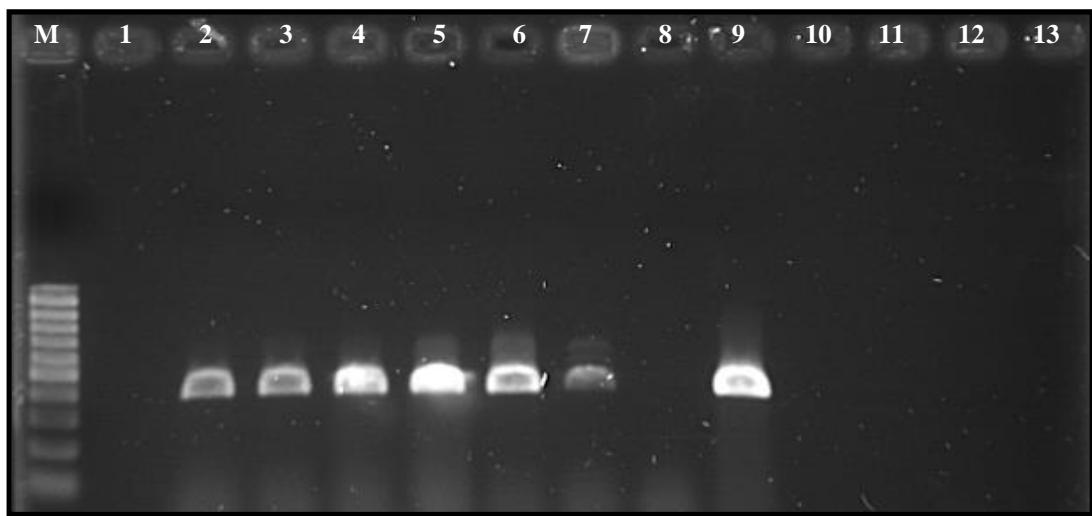


Abb. 20: Gelelektrophorese einer PCR mit  $\beta$ -Aktin-Nachweis in verschiedenen Patientenproben nach vorheriger RNA-Isolation mit peqGOLD RNAPure und anschließender dreimonatiger Zwischenlagerung bei -80°. M = Marker (Markerbanden in 100 bp Schritten), Bahnen 2-7: Patientenproben 12.1-13.2, Bahn 8: Leerkontrolle, Bahn 9: Kontrollprobe

Wie in den vorhergehenden Experimenten zu erkennen ist, lassen sich nach RNA-Isolation und anschließender Umschreibung zwar PCR-Produkte erkennen, die Qualität der RNA ist aber noch ungenügend. Der erfolgreiche Nachweis von qualitativ guter RNA in Proben, die bereits einige Zeit vor der eigentlichen Analyse bzw. Umschreibung der RNA in cDNA gewonnen wurden, ist besonders im Hinblick auf die Praxistauglichkeit der eingesetzten Methode von entscheidender Bedeutung, da es im klinischen Alltag häufig logistisch nur schwer möglich ist, die von einem Patienten entnommenen Bürstenbiopsien einer sofortigen Bearbeitung im Labor zuzuführen.

Um die Ausbeute an RNA und im Besonderen deren Qualität weiter zu verbessern, wurden, wie im Folgenden beschrieben, weitere Versuche unternommen, um zum einen mögliche verfahrensimmanente Fehlerquellen auszuschalten (vgl. Abschnitt 6.2.6) und zum anderen durch Erweiterung oder Vereinfachung der Isolationsschritte ein optimales Ergebnis zu erzielen (vgl. Abschnitt 6.2.7 und 6.2.8).

### 6.2.6. Denaturierendes RNA Gel

Um eine Denaturierung der RNA während der Laufzeit auf dem Gel auszuschließen wurde allen Gelen, die nach dem unten abgebildeten entstanden sind, 5 ml 10x MOPS und 7,5 ml 12,3 M Formaldehyd zugesetzt. Die Ergebnisse wurden durch diese Maßnahme aber nicht sichtlich beeinflusst, nur die Kontrollbahn zeigt das erwünschte Bandenmuster.

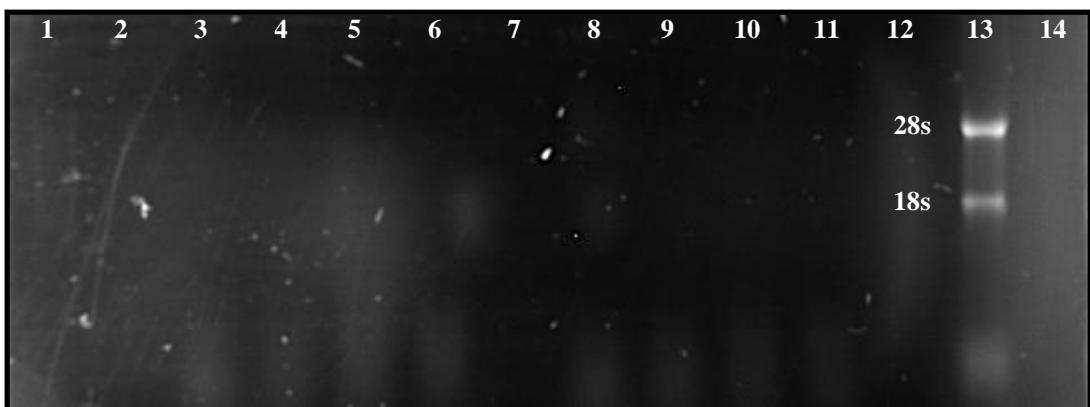


Abb. 21: Auftrag von RNA-Isolaten aus verschiedenen Patientenproben auf ein denaturierendes RNA Gel und anschließender Elektrophorese

### 6.2.7. Poolversuch

Um eine möglichst hohe RNA-Ausbeute zu erhalten, wurden mit dem Minikit, dem Mikrokit und dem RNAPure Kit je 12 „gepoolte“, d.h. zusammengeführte Zellproben bearbeitet. Das Ergebnis fiel jedoch nur geringfügig besser aus, beim Minikit schlug der Versuch sogar komplett fehl. Die mit dem Mikrokit und dem RNAPure Kit isolierte RNA wurden zusammen mit zwei Vergleichsproben auf ein RNA-Gel aufgetragen.

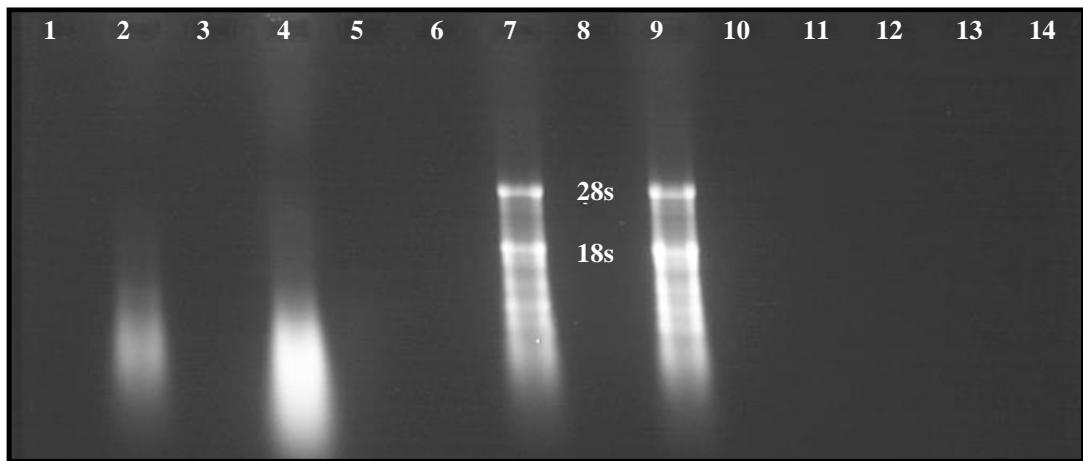


Abb. 22: RNA-Gel Poolversuch. Von Patienten gewonnene Zellproben wurden gepoolt, mit unterschiedlichen Kits isoliert und auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Bahn 2: Microkit (47,2 ng/ $\mu$ l), Bahn 4: RNAPure Kit (85,4 ng/ $\mu$ l), Bahn 7 und 9: Kontrollproben (425 ng/ $\mu$ l bzw. 750 ng/ $\mu$ l)

#### 6.2.8. Ergebnisse der Elektrophorese mit modifizierter Isolationsmethode

Durch die im Vorfeld beschriebene Modifikation der Isolationsmethode (vgl. Abschnitt 5.2) konnte eine durchgehend bessere elektrophoretische Darstellung der jeweiligen PCR-Produkte (auf Basis einer qualitativ hochwertigeren cDNA) erreicht werden. Wie auf Abbildung 23 zu sehen, stellen sich die eigentlichen Proben ebenso scharf und deutlich dar, wie die durchgeführte Kontrollprobe.

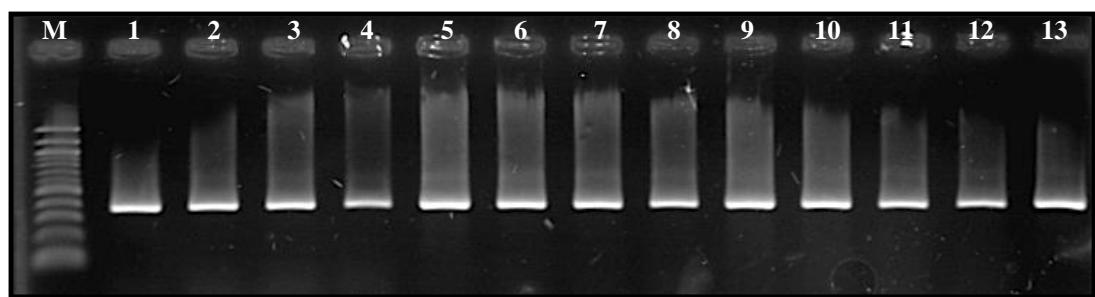


Abb. 23: Gelelektrophorese einer PCR mit  $\beta$ -Aktin-Nachweis in verschiedenen Patientenproben. M = Marker (Markerbanden in 100 bp Schritten), Bahnen 1-4: Proben 1.1-1.4 (Minikit), Bahnen 5-8: 4.1, 5.1-5.3 (RNAPure Kit), Bahnen 9-12: Proben 2.1-2.4 (Microkit), Bahn 13: Sample RNA

Auch die direkte Auftragung der so isolierten RNA auf ein Agarosegel führte zu den gewünschten Ergebnissen (Sichtbarkeit der 28s und 18s Bande), wenn auch die Intensität des Bandenmusters nicht dem der Kontrollproben entspricht. Nichtdestotrotz bleibt festzuhalten, dass die Qualität der RNA durch die Modifikation der Isolationsmethode um ein Vielfaches gesteigert werden konnte.

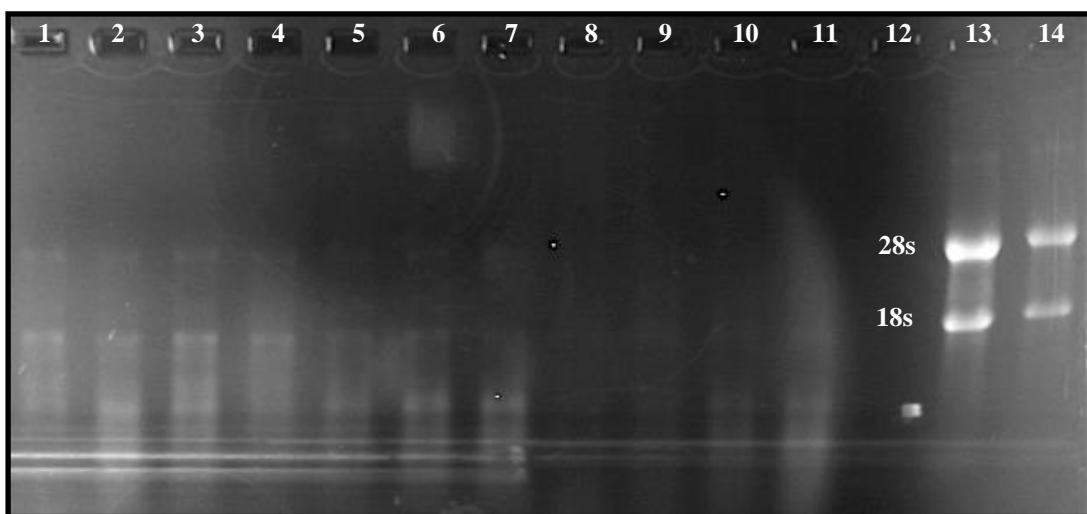


Abb. 24: Gelelektrophorese von RNA-Isolaten aus verschiedenen Patientenproben. Die RNA-Isolation erfolgte unter Verwendung unterschiedlicher Kits nach der beschriebenen modifizierten Isolationsmethode. Bahnen 1-3: 3.1-3.3 (Microkit), Bahnen 4-7: 4.1-4.4 (Minikit), Bahnen 8-11: 1.1-1.4 (RNAPure Kit), Bahn 12: Leerkontrolle, Bahnen 13-14: Kontrollproben

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die elektrophoretische Darstellung der aus den RNA-Isolaten hergestellten PCR-Produkte sowohl mit der nicht modifizierten als auch mit der modifizierten Isolationsmethode relativ verlässlich gelang. Jedoch steigerte sich die Intensität und Schärfe der Banden nach modifizierter Isolation deutlich (vgl. Abb. 23). Die direkte elektrophoretische Darstellung der RNA-Isolate gelang unter Verwendung der nicht modifizierten Isolationsmethode nicht. Auch die Verwendung eines denaturierenden Gels (vgl. Abschnitt 6.2.6) oder das Zusammenführen mehrerer Proben (vgl. Abschnitt 6.2.7) führten nicht zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Nur mit der modifizierten Methode konnte letztendlich RNA in so guter Qualität gewonnen werden, dass die elektrophoretische Darstellung der 18s und 28s Bande gelingen konnte (vgl. Abb. 24).

## 7. Diskussion der Ergebnisse

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle ist mit einem Anteil an bösartigen Neubildungen von vier Prozent (westliche Welt) bis hin zu vierzig Prozent (indischer Subkontinent) **{Mehrotra 2006}** und einer altersbereinigten Inzidenz von 10,5 / 100 000 zwischen 1999 und 2003 (Vereinigte Staaten) **{Bhoopathi 2008}** eine sowohl zahlenmäßig als auch von der Schwere des Krankheitsverlaufes her ernstzunehmende und gesundheitspolitisch relevante Erkrankung. Dennoch ist es trotz fortschrittlichster Therapieschemata in mehreren Jahrzehnten nicht gelungen die Prognose dieses Tumorleidens wesentlich zu verbessern. Da man heute davon ausgeht, dass die Heilungschancen eng mit dem Zeitpunkt der Diagnosestellung und damit dem Stadium, in dem sich der Tumor befindet, verknüpft sind, gilt ein besonderes Augenmerk verschiedenen Ansätzen und Methoden, welche die frühere Erkennung maligner Entartungen der Mundhöhle ermöglichen können. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe verschiedener Methoden ein RNA-Isolat aus Zellproben, die durch eine Bürstenbiopsie gewonnen wurden, herzustellen und dieses hinsichtlich Quantität und Qualität der vorliegenden RNA zu optimieren. Die auf diesem Wege isolierte RNA kann dann als Ausgangsmaterial für weitere molekularbiologische Analysen dienen. Inwiefern es überhaupt als sinnvoll betrachtet werden kann diesen Ansatz zu verfolgen, soll nun im Folgenden anhand einer kritischen Auseinandersetzung mit den Ergebnissen der bisher getesteten und vorher in ihrer Funktionsweise beschriebenen Methoden bewertet werden.

### 7.1. Verschiedene Früherkennungsmethoden und ihre praktische Relevanz

Um die Aussagekraft einer diagnostischen Untersuchungsmethode differenziert

		Disease present	Disease absent
		a True positive	b False positive
Test result	+		
	-	c False negative	d True negative

Sensitivity =  $\frac{a}{a+c}$       Specificity =  $\frac{d}{b+d}$   
PPV =  $\frac{a}{a+b}$       NPV =  $\frac{d}{c+d}$

beurteilen zu können, wird eine Vielzahl von Parametern herangezogen, unter denen die so genannte Sensitivität und die Spezifität eine besonders wichtige Rolle einnehmen. Unter der Sensitivität einer Methode versteht man die Wahrscheinlichkeit, mit der ein kranker Patient auch als solcher identifiziert wird. Die Spezifität eines Verfahrens gibt die Wahrscheinlichkeit

Abb. 25: Sensitivität und Spezifität

wieder, mit der ein als gesund identifizierter Patient auch tatsächlich gesund ist. Im Kontext dieser Arbeit würde eine hohe Sensitivität also bedeuten, dass ein hoher Prozentsatz der Patienten, deren Mundschleimhaut eine maligne Läsion aufweist, durch die jeweilige Untersuchungsmethode erkannt würde. Eine hohe Spezifität stünde im diesem Zusammenhang für eine sichere Abgrenzung von malignen Entartungen, die zu einem positiven Testergebnis führen würden, zu anderen, gutartigen Veränderungen der Mundschleimhaut. Somit minimiert eine hohe Sensitivität die sogenannten falsch-negativen, eine hohe Spezifität die sogenannten falsch-positiven Ergebnisse. Eine Übersicht, inwiefern die im Vorfeld diskutierten Früherkennungsmethoden diesen Kriterien genügen, gibt die folgende tabellarische Darstellung.

<b>Autor</b>	<b>Fallzahl</b>	<b>Sensitivität</b>	<b>Spezifität</b>
<i>Autofluoreszenz</i>			
Onizawa et al (1996)	32	88%	94%
Onizawa et al (1999)	130	91%	84%
<i>Induzierte Fluoreszenz</i>			
Sharwani et al (2006)	71	83-90%	79-89%
Leunig et al (2000)	58	99%	60%
<i>Reflektion und Absorption von Licht</i>			
Ram and Siar (2005)	40	100%	14%
Farah et al (2006)	55	100%	0%
<i>Toluidinblau</i>			
Onofre et al (2001)	50	77%	67%
Ram and Siar (2005)	46	70%	25%
Gandolfo et al (2006)	18	100%	56%
<i>Konventionelle histopathologische Diagnostik</i>			
Mehrotra et al (2008)	79	77%	93%
<i>Computergestützte zytopathologische Analyse</i>			
Rick et al (2004)	100	90%	3%
Poate et al (2004)	112	72,4%	32%
Scheifele et al (2004)	103	92%	94%
Sciubba et al (1999)	945	100%	100%
<i>DNA Zytometrie</i>			
Torres-Rendon et al (2008)	42	33%	88%
Maraki et al (2004)	98	100%	97,40%

*Tabelle 7: Verschiedene Früherkennungsmethoden in der Übersicht*

Zunächst sollte festgehalten werden, dass die Menge an aussagekräftigen Studien für einige Methoden nicht als ausreichend betrachtet werden kann, um eine endgültige Beurteilung zu dem jeweiligen Verfahren abzugeben. Davon abgesehen zeigen die Daten durchaus viel versprechende Resultate, was die Frage aufwirft, warum sich bis heute keines dieser diagnostischen Hilfsmittel in der Praxis durchsetzen konnte. Ein zentraler Punkt in der Klärung eben dieser Frage ist, inwiefern eine Methode die Aussagekraft der alleinigen klinischen Untersuchung wesentlich verbessern kann. Eine Studie aus dem Jahr 2011, in deren Rahmen die Mundschleimhaut von 108 Patienten auf das Vorhandensein von dysplastischen Arealen untersucht wurde, zeigt eine Sensitivität bzw. Spezifität der konventionellen klinischen Untersuchung von 25% bzw. 82% **{Farah et al 2011}**. Diese Werte lassen Raum für Verbesserungen, insbesondere die Sensitivität der alleinigen klinischen Untersuchung der Mundhöhle auf prämaligne bzw. maligne Veränderungen kann nicht als ausreichend betrachtet werden. Es bleibt allerdings zu bedenken, dass eine höhere Sensitivität häufig auf Kosten einer niedrigeren Spezifität erreicht wird. Eine aktuelle Untersuchung zeigt, dass z.B. der Einsatz von diagnostischen Hilfsmitteln, welche sich das Prinzip der Autofluoreszenz zunutze machen, zwar die Sensitivität deutlich steigern können (von 17% auf 100%), dies aber zu Lasten der Spezifität geht (97% auf 74%) **{Rana et al 2012}**. Es müssten sich also in der Folge wesentlich mehr Patienten einer Skalpellbiopsie unterziehen um eine endgültige Diagnose zu erhalten. Auf Grund der niedrigeren Spezifität würde ebenso die Anzahl der falsch-positiven Ergebnisse und damit die Anzahl der unnötig biopsierten Patienten steigen. Ob Kosten, in gesundheitlicher wie auch in ökonomischer Hinsicht, und Nutzen dabei einander die Waage halten, muss in jedem Fall kritisch untersucht werden.

Es bleibt festzuhalten, dass keine der vorgestellten Methoden eine ausreichende Sensitivität bzw. Spezifität bietet um eine tatsächliche Diagnose zu stellen. Die Ergebnisse können lediglich im Sinne einer Verdachtserhärtung interpretiert werden und somit die chirurgische Skalpellbiopsie nicht ersetzen. In diesem Zusammenhang sind die hervorragenden Werte, die in einigen Studien erzielt wurden, äußerst kritisch zu betrachten. Exemplarisch soll das an dieser Stelle kurz am Beispiel der Untersuchung von Scubbia et al aus dem Jahr 2004 erläutert werden. Die Ergebnisse der besagten Studie weisen eine Sensitivität und eine Spezifität für ein bestimmtes computergestütztes, zytopathologisches Verfahren (OralCDx) zur Erkennung von präkanzerösen bzw. kanzerösen Arealen der Mundschleimhaut von

jeweils 100% aus (vgl. Tabelle 3). Dabei wurden jedoch die in die Studie eingeschlossenen Patienten in zwei Gruppen aufgeteilt. Die erste Gruppe enthielt diejenigen Patienten mit einer bereits im Vorfeld klinisch als verdächtig eingestuften Läsion, die zweite Gruppe die Patienten, deren Mundschleimhautveränderungen klinisch als harmlos bzw. gutartig gewertet wurden. Da sich die angegebene Sensitivität und Spezifität aber nur auf die Patienten der Gruppe eins bezieht, und Patienten der Gruppe zwei, die zytopathologisch als unauffällig eingestuft wurden, sich keiner Skalpellbiopsie unterziehen mussten, ist die Aussagekraft der Untersuchung eingeschränkt **{Rick and Slater 2004}**. Darüber hinaus kommen weitere Studien anderer Autoren zu deutlich schlechteren Ergebnissen was Sensitivität und Spezifität betrifft (vgl. Tabelle 3). Kritisch zu sehen sind außerdem die Verbindungen der Verfasser der Studie zum Hersteller des untersuchten Verfahrens.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass keines der bis heute entwickelten Verfahren zur Früherkennung des Karzinoms der Mundhöhle wirklich unumstritten ist. Neben der immer noch ungenügenden Datenlage zur eigentlichen Validität der einzelnen Testmethoden spielen dabei zusätzlich noch viele andere Faktoren eine wichtige Rolle, darunter solche wie Zeitaufwand, Invasivität und Kosteneffektivität. Daher bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt die chirurgische Biopsie, trotz des damit verbundenen Aufwands und der Beeinträchtigung des Patienten, der Goldstandard in der Diagnostik des Karzinoms der Mundhöhle.

## **7.2. Der molekularbiologische Ansatz – Diskussion der experimentellen Ergebnisse**

Die Gewinnung von RNA aus Zellproben ist ein seit Jahren gängiges und etabliertes Verfahren. Die im Rahmen dieser Arbeit als Kontrollproben verwendeten, konservierten Zellpellets aus unterschiedlichsten Geweben lieferten durchweg gute Ergebnisse bei der RNA-Isolation, relativ unabhängig von der eingesetzten Methode. Die Schwierigkeiten, die sich bei dem Versuch aus den mit Hilfe von Bürstenbiopsien der Mundschleimhaut gewonnen Zellen quantitativ und qualitativ ausreichende RNA zu gewinnen, ergeben, lassen sich daher auf zwei Sachverhalte zurückführen. Zum einen ist die Anzahl an Zellen, die auf diese Weise entnommen werden können, im Vergleich zu einer chirurgischen Biopsie deutlich begrenzt. Zum anderen stellt das

Milieu, aus dem die Proben genommen werden, ein nicht zu unterschätzendes Problem dar, denn an kaum einer anderen Stelle im menschlichen Körper finden sich so große Konzentrationen an RNA abbauenden Enzymen (RNasen). Zu Beginn der experimentellen Arbeit konnte mit der in unserem Labor standardmäßig verwendeten Methode (RNeasy Minikit von Qiagen) nur in etwa vierzig Prozent der Fälle überhaupt RNA in photometrisch nachweisbaren Mengen isoliert werden, wobei auch hier die Quantität und im Besonderen die Qualität des Isolats nicht den gewünschten Ergebnissen entsprach. Ein zentrales Ziel dieser Arbeit war es also ein Verfahren zu finden, das verlässlich und reproduzierbar gute Ergebnisse liefert. Gerade unter Praxisbedingungen ein nicht zu unterschätzender Faktor, da die Belastung des Patienten und der laborchemische Aufwand so auf ein Minimum reduziert werden können. Erfreulicherweise konnten mit der empfohlenen Vorgehensweise durchweg konstante Ergebnisse (im Sinne einer ausreichenden Quantität) erzielt werden. Da die Weiterverarbeitung der genommenen Proben in der klinischen Praxis jedoch häufig nur mit einem gewissen Zeitversatz erfolgen kann, war es außerdem wichtig zu zeigen, dass die Ausbeute an genetischem Material durch eine Lagerung der Bürstenköpfe mitsamt der darin enthaltenen Zellen in dem verwendeten Lyse-Puffer kaum beeinträchtigt wird. Auf diese Art und Weise konnte auch unter praktischen Bedingungen bei einer zeitlichen Differenz von mehreren Stunden bis zu einem Tag zwischen Probennahme in der Klinik und Isolation im Labor quantitativ zufrieden stellende Ergebnisse erzielt werden. Liegt die RNA dann in ihrer Reinform vor, kann sie ohne Probleme bei -80 °C über einen Zeitraum von mehreren Monaten gelagert werden. Wesentlich schwieriger jedoch als die Optimierung der quantitativen Ausbeute gestaltete sich die Messung der Qualität des gewonnenen RNA-Materials. Zwar kann mit Hilfe des ebenfalls photometrisch mitbestimmten 260/280-Quotienten eine gewisse Aussage über die Reinheit des Isolats bezüglich einer möglichen Verunreinigung durch DNA-Bestandteile und andere Proteine getroffen werden, der Grad der Degradierung der RNA kann auf diese Weise aber nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund wurde in der vorher beschriebenen Art und Weise ein Agarose-Gel angefertigt, auf dem bei entsprechender Qualität des aufgetragenen Materials nach der Elektrophorese und bei Bestrahlung mit UV-Licht zwei charakteristische Banden sichtbar werden, die sogenannte 18s und 28s Bande. Diese Banden repräsentieren die ribosomale RNA (rRNA), welche die größte RNA-Fraktion darstellt (etwa 85-90%) **{Becker et al 2009}**. Die untersuchte RNA wird als qualitativ

hochwertig angesehen, wenn das Verhältnis 28s/18s in etwa 2,0 beträgt {Schroeder et al 2006}.

Wie aus den exemplarischen Darstellungen im Ergebnisteil ersichtlich ist, gelang zunächst mit dem mittels Bürstenbiopsie gewonnenem Material überhaupt kein Nachweis des erwähnten Bandenmusters. Die daneben aufgetragenen Kontrollproben hingegen lieferten verlässlich die erwünschten Ergebnisse, so dass ein grundsätzlicher Fehler in der Durchführung der Gelelektrophorese als ausgeschlossen gelten kann. Um das Verfahren dennoch den gegebenen Umständen ein wenig besser anzupassen wurde dem Agarosegelansatz 10x MOPS-Puffer, 12,3 M Formaldehyd und mit DEPC aufbereitetes Wasser zugesetzt. Dies sollte der Tatsache Rechnung tragen, dass die Ausgangsmenge an qualitativ ausreichendem Material von Anfang an als gering betrachtet werden konnte und deshalb eine weitere Denaturierung während der Elektrophorese besonders zu vermeiden war. Doch weder diese Maßnahme, noch ein Zusammenführen („pooling“, siehe Punkt 6.2.7) mehrerer Proben führten zunächst zu einer Verbesserung der Ergebnisse. Der eigentliche Durchbruch gelang dann durch eine im Grunde relativ einfache Modifikation der grundsätzlichen Vorgehensweise. Die offiziellen Isolationsprotokolle der Hersteller der verwendeten Kits setzen zu einem Zeitpunkt an, an dem bereits ein Zellisolat, z.B. in Form eines Pellets, vorliegt. Da im Falle der Bürstenbiopsie die abgestrichenen Zellen an der Bürste haften, wurde, nachdem der Bürstenkopf in ein mit TRIS-Puffer gefülltes Eppendorf-Cup getaucht wurde, zunächst versucht, die Zellen mittels mechanischer Irritation (Vortex) von der Bürste zu trennen und nach Entnahme des Bürstenkopfes durch Zentrifugation am Boden des Cups zu konzentrieren. Der Überstand wurde dann vorsichtig abgenommen und das verbliebene Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Modifikation, die zugleich eine enorme Vereinfachung darstellt, besteht nun darin die Bürsten sofort nach der Entnahme in ein mit Lyse-Puffer gefülltes Reaktionsgefäß zu geben und dort zu belassen, um dann zu einem späteren Zeitpunkt mit der Isolation nach bekanntem Protokoll fortzufahren. Das erste positive Resultat dieser Veränderung ist die Tatsache, dass unabhängig von der verwendeten Methode keinerlei Ausfälle mehr zu verzeichnen waren, das heißt jede Isolation erbrachte auch verwertbares Material. Darüber hinaus verbesserte sich die absolute Ausbeute ebenfalls deutlich, bis hin zu einem Niveau, das durchaus mit dem der verwendeten Kontrollzellproben

vergleichbar ist. Darüber hinaus konnten durch die Modifikation auch Fortschritte im Hinblick auf die Qualität des Isolats gemacht werden. Die erkennbaren Bandenmuster in Abbildung 24 lassen auf eine deutlich geringere Degradation des genetischen Materials als in den Versuchen zuvor schließen, wenngleich sicherlich festzustellen ist, dass die Ergebnisse noch Raum für Verbesserungen lassen und nicht an die Qualität der Kontrollproben heranreichen.

### 7.3. Relevanz der Resultate

Die Analyse der RNA einer Zelle bietet den großen Vorteil, dass sie eine Aussage über den momentanen Status der Genexpression jener Zelle liefern kann. Um von der isolierten RNA auf das Maß, in dem bestimmte Gene in Zellen exprimiert werden, rückschließen zu können, wird ein Verfahren namens qPCR (quantitative PCR) angewendet. Es handelt sich hierbei um eine Weiterentwicklung der klassischen Polymerasekettenreaktion, mit deren Hilfe nicht nur das Vorhandensein eines bestimmten Gens in Form eines Bandenmusters nachgewiesen, sondern auch eine quantitative Aussage getroffen werden kann. Nachdem nun also ein Verfahren gefunden wurde, mit dem verlässlich eine ausreichende Menge RNA aus Bürstenbiopsien der Mundschleimhaut isoliert werden kann, gilt es nun festzustellen, ob die gewonnene RNA auch den Qualitätskriterien für eine Weiterverarbeitung mittels qPCR genügt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Qualität bzw. der Grad der Degradierung der vorliegenden RNA mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophoresen bestimmt. Der Nachteil dieser weit verbreiteten und gut erprobten Methode besteht darin, dass sie die subjektive Bewertung des Bandenmusters durch den Untersucher erfordert und somit die erzielten Ergebnisse nicht ohne weiteres mit denen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar sind **{Schroeder et al 2006}**. Um die Degradation von isolierter RNA zu objektivieren steht seit kurzem eine chip-basierte Technologie zur Verfügung, die durch Kapillarelektrophorese und anschließende Detektion der RNA-Bestandteile durch laserinduzierte Fluoreszenz eine reproduzierbare Bestimmung der RNA-Qualität ermöglicht **{Bustin 2002, Lightfoot 2002, Mueller et al 2000}**. Zusätzlich zum 28s/18s-rRNA-Verhältnis errechnet eine entsprechende Software einen Zahlenwert (RIN = RNA Integrity Number) zwischen eins und zehn, wobei ein Wert von zehn eine intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA von sehr hoher Qualität, ein Wert von eins eine komplett degradierte und fragmentierte RNA von geringster Qualität repräsentiert **{Becker et al 2009}**. Mit Hilfe dieses Wertes ist

es nicht nur möglich Untersuchungsergebnisse verschiedener Labore einfach und schnell zu vergleichen, es ist ebenso denkbar einen Schwellenwert für die Qualität von RNA, die als Substrat für eine qPCR dienen soll, zu definieren. Mit der Frage, ob sich ein RIN-Wert, der für eine verlässliche Weiterverarbeitung mittels qPCR nicht unterschritten werden sollte, festlegen lässt, beschäftigen sich einige aktuelle Untersuchungen. Dabei zeigte sich, dass ein hoher Degradierungsgrad bzw. ein niedriger RIN-Wert zwar das Ergebnis einer Genexpressionsanalyse durch eine qPCR negativ beeinflussen kann, jedoch eine gewisse Degradation der zu analysierenden RNA bis zu einem RIN-Wert von fünf durchaus noch zu brauchbaren Expressionsprofilen führt **{Fleige et al 2006}**. Inwiefern die im Rahmen dieser Arbeit aus Bürstenbiopsien gewonnenen RNA-Isolate diesen Minimalanforderungen gerecht werden können und ob die mit Hilfe von Agarosegelen dargestellte RNA-Qualität einem RIN-Wert von wenigstens fünf entspricht, muss durch weitergehende Experimente geklärt werden.

## 8. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, die es ermöglicht aus Bürstenbiopsien der oralen Mukosa zuverlässig und reproduzierbar RNA-Isolate zu gewinnen, die sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Hinsicht für eine weitergehende Analyse z.B. mittels qPCR geeignet sind. Zu diesem Zweck wurde aus über 250 gewonnenen Zellproben zunächst RNA isoliert, die dann im ersten Schritt photometrisch vermessen wurde. Im Anschluss wurde die vorliegende RNA entweder direkt auf ein Agarosegel aufgetragen oder mittels RT-PCR in cDNA umgeschrieben, welche dann als Substrat für eine  $\beta$ -Aktin-PCR diente, deren Produkt ebenfalls auf ein Agarosegel aufgetragen wurde. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die Gele abfotografiert und ausgewertet.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das Kriterium der Reproduzierbarkeit mit der letztendlich auch im Praxistest eingesetzten Methode (Isolation der RNA mit RNeasy Micro Kit von Qiagen) erfüllt werden konnte. Die Qualität der gewonnenen RNA konnte im Laufe der verschiedenen Versuchsreihen durch den Einsatz einer modifizierten Isolationsmethode (vgl. Abschnitt 5.2 und 7.2) zwar gesteigert werden, ob diese jedoch ausreicht um ein aussagekräftiges Ergebnis einer anschließenden qPCR zu gewährleisten, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Im Vergleich zu anderen in dieser Arbeit vorgestellten Methoden zur frühzeitigen Erkennung maligner Entartungen der Mundschleimhaut hat die gentechnische Analyse von Bürstenbiopsien noch keinen Stellenwert in der täglichen Praxis. Die Gründe hierfür liegen zum Einen in der relativ komplizierten und zeitaufwendigen labortechnischen Handhabung, vor allem aber daran, dass bis heute noch kein genetisches Merkmal identifiziert ist, an dem sich eine entartete Mundschleimhaut eindeutig als solche erkennen lässt. Die Schwierigkeiten, die sich bei der Entwicklung einer letztendlich auch im klinischen Alltag einsetzbaren Früherkennungsmethode auf molekularbiologischer Basis auftun, sind dabei nicht zuletzt der Komplexität des Sachverhalts geschuldet. Dennoch bietet der Ansatz, das Verständnis über die grundlegenden Vorgänge in einer Zelle zur Basis einer solchen Methode zu machen, möglicherweise gleichermaßen große Chancen und sollte daher nach Meinung des Autors intensiv weiter verfolgt werden. Dabei muss es das erklärte Ziel sein, die Skalpellbiopsie mit anschließender pathologischer Auswertung als Goldstandard in der Diagnose der prämalignen und malignen Entartungen der Mundschleimhaut abzulösen und auf diese Weise auf lange Sicht die Sterblichkeit

einer Krankheit zu senken, die bei rechtzeitiger Diagnose auch heute schon heilbar ist.

## 9. Tabellenanhang

Im Folgenden wurden die mit den verschiedenen Methoden erzielten Messwerte entsprechend der Farblegende tabellarisch nach Nummerierung, Datum der Entnahme und Messwert in ng/µl bzw. 260/280-Wert aufgeschlüsselt.

- ◆ *Isolation mit RNeasy Minikit*
- ◆ *Isolation mit RNeasy Minikit (modifiziert)*
- ◆ *Isolation mit peqGOLD RNAPure*
- ◆ *Isolation mit peqGOLD RNAPure (modifiziert)*
- ◆ *Isolation mit peqGOLD MicroSpin RNA Kit*
- ◆ *Isolation mit peqGOLD MicroSpin RNA Kit (modifiziert)*

Probe	Entnahme	Messwert (ng/µl)
1.1	18.02.2008	13,25
1.2	18.02.2008	7,08
1.3	18.02.2008	5,12
1.4	18.02.2008	11,49
2.1	18.02.2008	13,66
2.2	18.02.2008	21,93
2.3	18.02.2008	22
2.4	18.02.2008	15,6
3.1	18.02.2008	16,17
3.2	18.02.2008	18,48
3.3	18.02.2008	20,98
3.4	18.02.2008	18,66
<b>Mittelwert</b>		<b>15,36833333</b>

Probe	Entnahme	Messwert (ng/µl)
4.1	20.02.2008	0
4.2	20.02.2008	0
4.3	20.02.2008	5,84
4.4	20.02.2008	10,21
5.1	20.02.2008	12,49
5.2	20.02.2008	2,37
5.3	20.02.2008	14,05
5.4	20.02.2008	9,78
6.1	20.02.2008	7,43
6.2	20.02.2008	11,54
6.3	20.02.2008	0
6.4	20.02.2008	6,04
<b>Mittelwert</b>		<b>6,645833333</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
7.1	22.02.2008	13,53
7.2	22.02.2008	9,57
7.3	22.02.2008	12,09
7.4	22.02.2008	0
8.1	22.02.2008	17,15
8.2	22.02.2008	17
8.3	22.02.2008	18,2
8.4	22.02.2008	8,13
9.1	22.02.2008	17,19
9.2	22.02.2008	17,62
9.3	22.02.2008	0
9.4	22.02.2008	35,73
<b>Mittelwert</b>		<b>13,85083333</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
1.1	02.09.2008	15,71	1,2
1.2	02.09.2008	36,97	1,74
1.3	02.09.2008	22,45	1,66
1.4	02.09.2008	26,5	1,5
2.1	02.09.2008	23,47	1,29
2.2	02.09.2008	21,43	1,35
2.3	02.09.2008	25,99	1,55
2.4	02.09.2008	26,72	1,61
3.1	02.09.2008	18,18	1,26
3.2	02.09.2008	22,41	1,74
3.3	02.09.2008	24,45	1,63
3.4	02.09.2008	18,07	1,17
<b>Mittelwert</b>		<b>23,52916667</b>	<b>1,475</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
4.1	17.09.2008	52,84	1,93
4.2	17.09.2008	67,65	2,01
4.3	17.09.2008	89,98	1,97
4.4	17.09.2008	89,63	1,87
<b>Mittelwert</b>		<b>75,025</b>	<b>1,945</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
5.1	30.10.2008	29,35	1,68
5.2	30.10.2008	36,94	1,71
5.3	30.10.2008	31,86	1,69
5.4	30.10.2008	26,54	1,59
6.1	30.10.2008	39,9	1,76
6.2	30.10.2008	37,12	1,66
6.3	30.10.2008	32,53	1,67
6.4	30.10.2008	32,45	1,64
7.1	30.10.2008	21,28	1,45
7.2	30.10.2008	20,44	1,51
7.3	30.10.2008	23,89	1,6
7.4	30.10.2008	22,97	1,49
<b>Mittelwert</b>		<b>29,605833</b>	<b>1,620833</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
8.1	04.11.2008	20,52	1,95
8.2	04.11.2008	23,52	1,28
8.3	04.11.2008	30,18	1,65
8.4	04.11.2008	53,58	1,66
<b>Mittelwert</b>		<b>31,95</b>	<b>1,635</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
1.1	25.02.2008	1,17
1.2	25.02.2008	7,84
1.3	25.02.2008	12,10
1.4	25.02.2008	10,26
2.1	25.02.2008	18,18
2.2	25.02.2008	19,93
2.3	25.02.2008	11,15
2.4	25.02.2008	24,61
3.1	25.02.2008	27,74
3.2	25.02.2008	16,73
3.3	25.02.2008	8,47
3.4	25.02.2008	7,95
<b>Mittelwert</b>		<b>13,84416667</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
4.1	27.02.2008	0
4.2	27.02.2008	6,05
4.3	27.02.2008	15,82
4.4	27.02.2008	5,77
5.1	27.02.2008	16,4
5.2	27.02.2008	5,87
5.3	27.02.2008	16,67
5.4	27.02.2008	17,78
6.1	27.02.2008	7,95
6.2	27.02.2008	9,61
6.3	27.02.2008	3,8
6.4	27.02.2008	46,62
<b>Mittelwert</b>		<b>12,695</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
7.1	29.02.2008	10,5
7.2	29.02.2008	16,27
7.3	29.02.2008	40,09
7.4	29.02.2008	46,72
8.1	29.02.2008	31,07
8.2	29.02.2008	31,12
8.3	29.02.2008	35,16
8.4	29.02.2008	43,28
<b>Mittelwert</b>		<b>31,776</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
9.1 - 9.4	04.03.2008	15,813
10.1 - 10.4	04.03.2008	11,69
11.1 - 11.4	04.03.2008	18,36
<b>Mittelwert</b>		<b>15,287</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
12.1	05.03.2008	31,62
12.2	05.03.2008	38,98
12.3	05.03.2008	38,63
12.4	05.03.2008	42,93
13.1	05.03.2008	39,54
13.2	05.03.2008	37,49
13.3	05.03.2008	36,11
13.4	05.03.2008	34,5
<b>Mittelwert</b>		<b>37,475</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
14.1	07.03.2008	25,41
14.2	07.03.2008	72,9
14.3	07.03.2008	26,14
14.4	07.03.2008	22,44
15.1	07.03.2008	12,18
15.2	07.03.2008	15,4
15.3	07.03.2008	13,84
15.4	07.03.2008	14,36
16.1	07.03.2008	15,14
16.2	07.03.2008	22,08
16.3	07.03.2008	23,22
16.4	07.03.2008	6,45
<b>Mittelwert</b>		<b>22,46333333</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
1.1	13.10.2008	60,48	1,45
1.2	13.10.2008	72,14	1,24
1.3	13.10.2008	72,64	1,25
1.4	13.10.2008	97,56	1,43
<b>Mittelwert</b>		<b>75,705</b>	<b>1,3425</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
2.1	13.11.2008	98,25	1,7
2.2	13.11.2008	112,68	1,72
2.3	13.11.2008	79,86	1,48
2.4	13.11.2008	134,12	1,68
<b>Mittelwert</b>		<b>106,2275</b>	<b>1,645</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
3.1	21.11.2008	27,3	1,31
3.2	21.11.2008	62,88	1,54
3.3	21.11.2008	53,78	1,02
3.4	21.11.2008	67,51	1,08
<b>Mittelwert</b>		<b>52,8675</b>	<b>1,2375</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
4.1	24.11.2008	71,85	1,59
4.2	24.11.2008	84,83	1,61
4.3	24.11.2008	87,24	1,56
4.4	24.11.2008	95,76	1,62
5.1	24.11.2008	59,19	1,49
5.2	24.11.2008	68,72	1,52
5.3	24.11.2008	61,25	1,47
5.4	24.11.2008	88,43	1,58
6.1	24.11.2008	95,41	1,67
6.2	24.11.2008	105,08	1,7
6.3	24.11.2008	108,37	1,69
6.4	24.11.2008	111,83	1,63
<b>Mittelwert</b>		<b>86,49666667</b>	<b>1,5941666</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
7.1	25.11.2008	87,86	1,53
7.2	25.11.2008	169,92	1,69
7.3	25.11.2008	108,97	1,54
7.4	25.11.2008	107,19	1,47
8.1	25.11.2008	44,53	1,32
8.2	25.11.2008	70,28	1,36
8.3	25.11.2008	90,55	1,5
8.4	25.11.2008	97,1	1,52
<b>Mittelwert</b>		<b>97,05</b>	<b>1,49125</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
1.1	02.04.2008	15,15
1.2	02.04.2008	18,39
1.3	02.04.2008	19,72
1.4	02.04.2008	41,66
<b>Mittelwert</b>		<b>23,73</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
2.1	03.04.2008	25,04
2.2	03.04.2008	26,79
2.3	03.04.2008	25,47
2.4	03.04.2008	24,33
3.1	03.04.2008	16,26
3.2	03.04.2008	18,45
3.3	03.04.2008	16,51
3.4	03.04.2008	20,52
4.1	03.04.2008	18,23
4.2	03.04.2008	17,79
4.3	03.04.2008	14,84
4.4	03.04.2008	14,74
<b>Mittelwert</b>		<b>19,91416667</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
5.1	07.04.2008	23,41
5.2	07.04.2008	25,28
5.3	07.04.2008	21,34
5.4	07.04.2008	21,33
6.1	07.04.2008	19,88
6.2	07.04.2008	20,52
6.3	07.04.2008	20,67
6.4	07.04.2008	25,56
7.1	07.04.2008	27,74
7.2	07.04.2008	23,98
7.3	07.04.2008	24,13
7.4	07.04.2008	22,34
<b>Mittelwert</b>		<b>23,015</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>
8.1	08.04.2008	18,89
8.2	08.04.2008	19,22
8.3	08.04.2008	23,56
8.4	08.04.2008	22,62
9.1	08.04.2008	20,93
9.2	08.04.2008	20,12
9.3	08.04.2008	25,69
9.4	08.04.2008	24,17
<b>Mittelwert</b>		<b>21,9</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
1.1	08.09.2008	64,89	1,63
1.2	08.09.2008	62,32	1,67
1.3	08.09.2008	60,57	1,65
1.4	08.09.2008	109,15	1,8
2.1	08.09.2008	71,23	1,73
2.2	08.09.2008	76,85	1,78
2.3	08.09.2008	73,91	1,7
2.4	08.09.2008	98,45	1,82
<b>Mittelwert</b>		<b>77,17125</b>	<b>1,7225</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
3.1	12.09.2008	86,04	1,93
3.2	12.09.2008	135,55	1,79
3.3	12.09.2008	121,89	1,71
3.4	12.09.2008	127,89	1,84
<b>Mittelwert</b>		<b>117,8425</b>	<b>1,8175</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
4.1	07.11.2008	67,86	1,99
4.2	07.11.2008	102,01	1,92
4.3	07.11.2008	84,71	1,93
4.4	07.11.2008	81,9	1,85
5.1	07.11.2008	45,47	1,81
5.2	07.11.2008	102,89	1,82
5.3	07.11.2008	53,52	1,86
5.4	07.11.2008	74,73	1,91
<b>Mittelwert</b>		<b>76,63625</b>	<b>1,88625</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
6.1	11.11.2008	43,58	1,68
6.2	11.11.2008	62,55	1,67
6.3	11.11.2008	53,58	1,62
6.4	11.11.2008	68,58	1,75
<b>Mittelwert</b>		<b>57,0725</b>	<b>1,68</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messung</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
7.1	11.11.2008	11.11.2008	123,28	1,82
7.2	11.11.2008	12.11.2008	179,4	1,76
7.3	11.11.2008	14.11.2008	161,89	1,81
7.4	11.11.2008	17.11.2008	163,4	1,91
<b>Mittelwert</b>			<b>156,9925</b>	<b>1,825</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messung</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
8.1	11.11.2008	11.11.2008	129,94	1,8
8.2	11.11.2008	12.11.2008	108,52	1,75
8.3	11.11.2008	14.11.2008	127,69	1,99
8.4	11.11.2008	17.11.2008	170,86	1,91
<b>Mittelwert</b>			<b>134,2525</b>	<b>1,8625</b>

<b>Probe</b>	<b>Entnahme</b>	<b>Messung</b>	<b>Messwert (ng/µl)</b>	<b>260/280</b>
9.1	11.11.2008	11.11.2008	54,45	1,7
9.2	11.11.2008	12.11.2008	59,65	1,78
9.3	11.11.2008	14.11.2008	57,16	1,73
9.4	11.11.2008	17.11.2008	61,23	1,76
<b>Mittelwert</b>			<b>58,1225</b>	<b>1,7425</b>

## 10. Literaturverzeichnis

1. Scully C, Bagan JV. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases* 2009; doi: 10.1111/j.1601-0825.2009.01563.x
2. McDowell JD. An overview of epidemiology and common risk factors for OSCC. *Otolaryngol Clin N Am* 2006; 39: 277–294
3. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45(4–5): 309–16
4. Fedele S. Diagnostic aids in the screening of oral cancer. *Head & Neck Oncology* 2009; 1:5, doi:10.1186/1758-3284-1-5
5. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 575-80
6. Pavlova I, Williams M, El-Naggar A, Richards-Kortum R, Gillenwater A. Understanding the biological basis of autofluorescence imaging for oral cancer detection: high-resolution fluorescence microscopy in viable tissue. *Clin Cancer Res* 2008; 14(8)
7. Pavlova I, Sokolov K, Drezek R, Malpica A, Follen M, Richards-Kortum R. Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser-scanning fluorescence confocal microscopy; *Photochemistry and Photobiology* 2003; 77(5): 550-555
8. Chance B, Thorell B. Localization and kinetics of reduced pyridine nucleotide in living cells by microfluorometry; *The Journal of Biological Chemistry* 1959; 234(11)
9. Drezek R, Brookner C, Pavlova I, Boiko I, Malpica A, Lotan R, Follen M, Richards-Kortum R. Autofluorescence microscopy of fresh cervical-tissue sections reveals alteration in tissue biochemistry with dysplasia. *Photochemistry and Photobiology* 2001; 73(6): 636-641
10. Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H, Reichert TE. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *JDDG* 2007; 5:1095-1100
11. Sokolov K. Realistic three-dimensional epithelial tissue phantoms for biomedical optics. *J Biomed Opt.* 2002; 7(1): 148-56
12. Ingber et al; *Cancer as a Disease of Epithelial-Mesenchymal Interactions and Extracellular Matrix Regulation; Differentiation*, Volume 70, Issues 9-10, December 2002, Pages 547-560
13. Zenk et al. Visualizing carcinomas of the mouth cavity by stimulating synthesis of fluorescent protoporphyrin IX. *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie* 1999; 3(4):205-9
14. Oh ES, Laskin DM. Efficacy of the ViziLite system in the Identification of oral Lesions. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65:424-426
15. Lingen MW, Kalmar JR, Garrison T, Speight PM. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncology* 2008; 44: 10-22
16. Farah C, McCullough MJ. A pilot case control study on the efficacy of acetic acid wash and chemiluminescent illumination (ViziLite) in the visualisation of oral mucosal white lesions. *Oral Oncology* 2007; 43: 820-824
17. Epstein et al. Toluidine blue and Lugol's iodine application in the assessment of oral malignant disease and lesions at risk of malignancy. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(4): 160-3

18. Kerawala et al. The role of vital tissue staining in the marginal control of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2000; 29(1): 32-5
19. Mashberg et al. Reevaluation of toluidine blue application as a diagnostic adjunct in the detection of asymptomatic oral squamous carcinoma: a continuing prospective study of oral cancer III. *Cancer* 1980; 46(4): 758-63
20. Mehrotra R, Singh MK, Pandya S, Singh M. The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: a study of 94 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106: 246-53
21. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. *JADA* 1999; 130: 1445-1457
22. Subrata et al. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 82-8
23. Torres-Rendon A, Stewart R, Craig GT, Wells M, Speight PM. DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression. *Oral Oncology* 2009; 45: 468-473
24. Jansohn, M. Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag; Auflage: 4.A. 2006
25. Farrell R. RNA Methodologies. Elsevier Ltd, Oxford; Auflage: 4th edition 2009
26. Schartl M, Gessler M, von Eckardstein A. Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH 2009
27. Klug W, Cummings M, Spencer C. Genetik. Pearson Studium; Auflage: 8, 2007
28. Löffler G, Petrides, P. Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag GmbH; Auflage: 6. 2002
29. Sambrook J, Russel D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA, 3rd edition, 2001
30. Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenolchloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* 2006; 1:2, 581–585
31. Tan, SC, Yiap BC. DNA, RNA and protein extraction: the past and the present, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009
32. Mehrotra R, Gupta A, Singh M, Ibrahim R. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Molecular Cancer* 2006; 5:11, doi:10.1186/1476-4598-5-11
33. Bhoopathi V, Kabani S, Mascarenhas AK. Low positive predictive value of the oral brush biopsy in detecting dysplastic oral lesions. *Cancer* 03/2009; 1036-40
34. Onizawa K, Saginoya H, Furuya Y, Yoshida H. *Cancer Lett* 11/1996; 108(1): 61-66
35. Onizawa K, Saginoya H, Furuya Y, Yoshida H, Fukuda H. Usefulness of fluorescence photography for diagnosis of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1999; 28(3): 206-210
36. Sharwani A, Jerjes W, Salih V, MacRobert AJ, El-Maaytah M, Khalil HS, Hopper C. Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. *J Photochem Photobiol B*. 04/2006; 83(1): 27-33
37. Leunig A, Betz CS, Mehlmann M, Stepp H, Arbogast S, Grevers G, Baumgartner R. Detection of squamous cell carcinoma of the oral cavity by imaging 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence. *Laryngoscope* 01/2000; 110(1): 78-83

38. Ram S, Siar Ch. Chemiluminescence as a diagnostic aid in the detection of oral cancer and potentially malignant epithelial lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 07/2005; 34(5): 521-527
39. Farah CS, McCullough MJ. A pilot case control study on the efficacy of acetic wash and chemiluminescent illumination (ViziLite) in the visualisation of oral mucosal white lesions. *Oral Oncology* 09/2005; 43(8): 820-824
40. Onofre MA, Spoto MR, Navarro CM. Reliability of toluidine blue application in the detection of oral epithelial dysplasia and *in situ* and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 05/2001; 91(5): 535-545
41. Gandolfo S, Pentenero M, Broccoletti R, Pagano M, Carrozzo M, Scully C. Toluidine uptake in potentially malignant oral lesions *in vivo*: clinical and histological assessment. *Oral Oncol.* 01/2006; 42(1): 89-95
42. Mehrotra R, Singh MK, Pandya S, Singh M. The use of an oral brush biopsy without computer-assisted analysis in the evaluation of oral lesions: a study of 94 patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 08/2008; 106(2): 246-253
43. Rick GM. Oral brush biopsy: the problem of false positives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 09/2003; 96(3): 252
44. Poate TW, Buchanan JA, Hodgson TA, Speight PM, Barrett AW, Moles DR, Scully C, Porter SR. An audit of the efficacy of the oral brush biopsy technique in a specialist Oral Medicine unit. *Oral Oncol.* 09/2004; 40(8): 829-834
45. Scheifele C, Schmidt-Westhausen AM, Dietrich T, Reichart PA. The sensitivity and specificity of the OralCDx technique: evaluation of 103 cases. *Oral Oncol.* 09/2004; 40(8): 824-828
46. Sciubba JJ. Improving detection of precancerous and cancerous oral lesions. Computer-assisted analysis of the oral brush biopsy. U.S. Collaborative OralCDx Study Group. *J Am Dent Assoc.* 10/1999; 130(10): 1445-1457
47. Torres-Rendon A, Stewart R, Craig GT, Wells M, Speight PM. DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression. *Oral Oncol.* 06/2009; 45(6): 468-473
48. Maraki D, Becker J, Boecking A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 08/2004; 33(7): 398-404
49. Farah CS, McIntosh L, Georgiou A, McCullough MJ. Efficacy of tissue autofluorescence imaging (VelScope) in the visualization of oral mucosal lesions. <http://www.wileyonlinelibrary.com>, 04/2011; doi:10.1002/hed.21834
50. Rana M, Zapf A, Kuehle M, Gellrich NC, Eckardt AM. Clinical evaluation of an autofluorescence diagnostic device for oral cancer detection: a prospective randomized diagnostic study. *Eur J Cancer Prev.* 09/2012; 21(5): 460-466
51. Rick and Slater; doi:10.1016/S1079-2104(03)00362-7
52. Becker et al; RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionanalytik; BIOspektrum 05/2009
53. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Molecular Biology* 2006; 7:3 doi:10.1186/1471-2199-7-3
54. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* 2002; 29: 23-29

55. Lightfoot et al, 2002; Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer, ribogreen analysis and UV spectrometry; Agilent Application Note 2002; publication number 5988-7650EN
56. Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D. A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. Electrophoresis 2000; 21: 128-134
57. Fleige S, Walf V, Huch S, Prgomet C, Sehm J, Pfaffl MW. Comparison of relative RNA quantification models and the impact of RNA integrity in quantitative realtime RT-PCR. Biotechnol Lett 2006; 28: 1601–1613
58. Poh et al; Direct Fluorescence Visualization of Clinically Occult High-Risk Oral Premalignant Disease Using a Simple Hand-Held Device; Head & Neck-DOI 10.1002/hed, January 2007

## 11. Bildnachweis

1	Autofluoreszenz	<a href="http://www.drpetrosky.com/images/Velscope03.jpg">http://www.drpetrosky.com/images/Velscope03.jpg</a>
2	Aufbau von Nukleinsäuren	<a href="http://dna-rna.net/wp-content/uploads/2011/05/dna-rna.gif">http://dna-rna.net/wp-content/uploads/2011/05/dna-rna.gif</a>
3	Ribosomenstruktur	<a href="http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/88/Ribosom_mRNA_translation_de.svg/440px-Ribosom_mRNA_translation_de.svg.png">http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/8/88/Ribosom_mRNA_translation_de.svg/440px-Ribosom_mRNA_translation_de.svg.png</a>
4	Flüssigkeitsbasierte Phasenauf trennung	<a href="http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture9/AMG5.1a.gif">http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc471/pages/Lecture9/AMG5.1a.gif</a>
5	Säulenchromatographie	<a href="http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/a/ad/Minicolumn.svg">http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/a/ad/Minicolumn.svg</a>
6	Prozedur RNeasy Minikit	Link nicht mehr aktuell, Quelle: <a href="http://www.qiagen.com">http://www.qiagen.com</a>
7	Prozedur mRNA Capture Kit	<a href="http://www.roche-applied-science.com/US/ProdInfo/images/mrna_capture_kit_flow01.jpg">http://www.roche-applied-science.com/US/ProdInfo/images/mrna_capture_kit_flow01.jpg</a>
8	Messergebnisse der RNA-Ausbeute mit verschiedenen Methoden (Balkendiagramm)	Eigene Grafik
9	Messergebnisse der RNA-Ausbeute mit verschiedenen Methoden (Liniendiagramm)	Eigene Grafik
10	Messergebnisse der RNA-Ausbeute mit verschiedenen Methoden, modifiziert (Liniendiagramm)	Eigene Grafik
11	Streubereich der 260/280 Werte (Netzdiagramm)	Eigene Grafik
12	Gelelektrophorese PCR β-Aktin Minikit Proben 7.1 - 9.4	Eigene Aufnahme
13	Gelelektrophorese RNA Minikit Proben 7.1 - 9.4	Eigene Aufnahme
14	Gelelektrophorese PCR β-Aktin RNAPure Proben 7.1 - 7.4, 5.2, 6.1 - 6.3	Eigene Aufnahme
15	Gelelektrophorese RNA RNAPure Proben 7.3, 7.4, 8.3, 8.4	Eigene Aufnahme

16	Gelelektrophorese PCR β-Aktin Microkit Proben 1.1 - 3.4	Eigene Aufnahme
17	Gelelektrophorese RNA Microkit Proben 1.1 - 1.4	Eigene Aufnahme
18	Gelelektrophorese PCR β-Aktin mRNA Capture Kit Proben 1.1 - 3.4	Eigene Aufnahme
19	Gelelektrophorese PCR P-Cadherin mRNA Capture Kit Proben 4.1 - 4.3, 5.1 - 6.4	Eigene Aufnahme
20	Gelelektrophorese PCR β-Aktin Zwischenlagerung Proben 12.1 - 13.2	Eigene Aufnahme
21	Denaturierendes RNA-Gel	Eigene Aufnahme
22	Poolversuch	Eigene Aufnahme
23	Gelelektrophorese PCR β-Aktin (verschiedene Methoden)	Eigene Aufnahme
24	Gelelektrophorese RNA (verschiedene Methoden)	Eigene Aufnahme
25	Sensitivität und Spezifität	Lingen MW, Kalmar JR, Garrison T, Speight PM. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. Oral Oncology 2008; 44:13

*Tabelle 8: Auflistung der Bildnachweise (Spalte 1: Abbildungsnummer, Spalte 2: Bezeichnung (gekürzt), Spalte 3: Quelle)*

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert in seiner Funktion als Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie der Universität Regensburg für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen, bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Richard Bauer, der mir jederzeit bei der Ausfertigung sowohl des theoretischen als auch des praktisch-experimentellen Teils der Arbeit mit Rat und Tat und nicht zuletzt mit großer Geduld zur Seite stand.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeitern des biotechnischen Labors für Ihre Unterstützung und Hilfestellung bei den von mir durchgeführten Experimenten.