



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 10 2006 007 249 B4 2008.07.31**

(12)

Patentschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2006 007 249.9**

(22) Anmeldetag: **15.02.2006**

(43) Offenlegungstag: **30.08.2007**

(45) Veröffentlichungstag
 der Patenterteilung: **31.07.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68 (2006.01)**

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten (§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 1 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
**Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, 24105
 Kiel, DE; Universität zu Lübeck, 23562 Lübeck, DE**

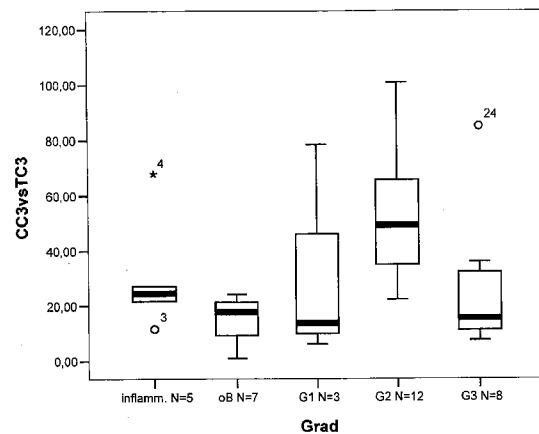
(72) Erfinder:
**Warnecke, Jens M., Dr., 23627 Groß Grönau, DE;
 Hanke, Merle, 23626 Ratekau, DE**

(74) Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
 gezogene Druckschriften:
US2004/00 38 240 A1
WO 04/0 33 641 A2
WO 02/15 770 A2

(54) Bezeichnung: **Verfahren zur Bestimmung von Blasenkarzinomen des Differenzierungsgrades G2**

(57) Hauptanspruch: Verfahren zur Bestimmung von Blasenkarzinomen des Differenzierungsgrades G2, gekennzeichnet durch die Schritte Bestimmen der mRNA-Menge mRNA_{CC3} des Proteins CC3 aus dem Urin oder dem Urinsediment eines Menschen, Bestimmen der mRNA-Menge mRNA_{TC3} des Proteins TC3 aus demselben Probenmaterial, und Berechnen des Quotienten $Q = \text{mRNA}_{\text{CC3}} / \text{mRNA}_{\text{TC3}}$, wobei ein Quotient $Q \geq 29$ das Vorliegen eines Blasenkarzinoms des Differenzierungsgrades G2 anzeigt.



Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von Blasenkarzinomen des Differenzierungsgrades G2.

[0002] In Deutschland erkranken laut Krebsregister jährlich insgesamt 15.000 Menschen neu an Harnblasenkrebs, wobei Männer etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Bezogen auf alle Tumorneuerkrankungen liegt das Harnblasenkarzinom bei den Männern an 5. (6,2%) und bei den Frauen an 11. Stelle (2,7%). Bei der Mehrzahl der Tumore (90%) handelt es sich um ein Karzinom, das aus dem Übergangsepithel der ableitenden Harnwege, dem Urothel, hervorgeht. Lediglich in 5–6% liegen Plattenepithelkarzinome und in weniger als 2% Adenomkarzinome vor (Übersichtsartikel Kirkali Z, Chan T, Manoharan M, Algaba F, Busch C, Cheng L, Kiemenev L, Kriegmair M, Montironi R, Murphy WM, Sesterhenn IA, Tachibana M, Weider J. (2005): Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology* 66 (6 Suppl 1): 4–34.).

[0003] Generell werden Tumore durch ein histo-pathologisches Klassifizierungssystem beschrieben, in das verschiedene Parameter wie die Ausbreitung und Größe, Infiltration in das umliegende Gewebe, Absiedelung von Tochter Tumoren (Metastasierung) sowie der Differenzierungsgrad, das sogenannte grading eingehen. Das Grading (G1–G4) beschreibt die histologischen Veränderungen des Tumors in Bezug auf das Ursprungsgewebe. Die Einstufung G1 beschreibt Tumorgewebe, das noch viele Charakteristika des Ursprungsgewebes besitzt. Die Entartung des Gewebes nimmt in Richtung der G4-Tumore stufenweise zu. Die Zellen eines G4-Tumors sind stark "entartet", d. h. der Übergangsepithelcharakter (das Ursprungsgewebe) ist nicht mehr erkennbar. Die sogenannten „mäßig differenzierten Karzinome" G2 sind durch bestimmte histo-pathologische Parameter von den gut differenzierten G1- und den schlecht differenzierten G3-Tumoren abgrenzbar. Trotz festgelegter Kriterien ist diese Abgrenzung nicht immer eindeutig, da sie durch Auszählen von Zellen im Gesichtsfeld im Mikroskop erfolgt. Daraus resultiert, dass zwei unabhängige, fachlich kompetente Personen zu unterschiedlichen Befunden in Bezug auf den Differenzierungsgrad kommen können. Dieser Differenzierungsgrad hat maßgebliche Auswirkungen auf die Prognose der Patienten. Die 5-Jahres-Überlebensrate für die oberflächlichen G1–G2 Tumore beträgt nach Therapie 80–95%. Für die oberflächlichen G3 Tumore, die sogenannten lokal-begrenzten high-risk-Karzinome, beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate lediglich 64%. Weiterhin bestimmt der Differenzierungsgrad – neben der Ausbreitung des Tumors – maßgeblich die Therapieform (Ref. 1). Dies ist beidem Übergang von oberflächlichen G2-Tumoren zu den lokal-begrenzten high-risk-Karzinomen (G3) von entscheidender Bedeutung, da hier teilweise bei den oberflächlichen G3-Karzinomen eine radikale Zystektomie (operative Entfernung der Blase) erfolgt, während bei G2-Tumoren eine oberflächliche Entfernung des Tumorgewebes (unter Erhaltung des Organs) mit anschließender medikamentöser Behandlung vorgenommen wird.

[0004] Neben der klassischen histologischen Untersuchung von Tumorgeweben wird schon seit einiger Zeit zunehmend das Vorhandensein von molekularbiologischen Tumormarkerproteinen in die Tumordiagnostik einbezogen. Mit der Entwicklung hochsensitiver molekularbiologischer Methoden rückt inzwischen der Nachweis und die Quantifizierung der für die entsprechenden Tumormarkerproteine codierenden mRNA-Moleküle in den Vordergrund. Die Analyse der Transkriptmenge aus peripherem Blut oder Urin ermöglicht es, in einigen Fällen auf invasive Maßnahmen wie Operationen oder über endoskopische Methoden gewonnene Biopsien zu diagnostischen Zwecken zu verzichten.

[0005] Allgemeine molekularbiologische Verfahren zur Prognose von Tumorerkrankungen unter Verwendung von u. a. durch rt-PCR ermittelten Expressionsraten sind beispielsweise aus der WO 2002/15770 A2 und der US 2004/0038240 A1 bekannt. Ein invasives Verfahren zur Klassifizierung von Blasentumoren ist beispielsweise aus der WO 2004/033641 A2 bekannt.

[0006] Aus der DE 103 26 773 A1 ist insbesondere ein diagnostisches Verfahren bekannt, dass sich die Erkenntnis zu Nutze macht, dass die Überexpression der Nukleophosmin/B23-mRNA einen prognostischer Marker zum Detektieren des wiederaufgetretenen und im fortgeschrittenen Stadium befindlichen Blasenkarzinoms darstellt. Obwohl dieses Verfahren es bereits ermöglicht, anhand von Biopsiematerial bzw. Tumorgewebe fortgeschrittene Tumorstadien zu detektieren und Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit des Wiederauftretens der Tumorerkrankung nach operativer Entfernung des Tumors erlaubt, ist es nicht dafür geeignet, eine sensitive und spezifische Diagnose des nur mäßig differenzierten (G2) Blasenkarzinoms zu ermöglichen. Ferner bezieht sich das beschriebene Verfahren auf die Untersuchung von Biopsiematerial bzw. Tumorgewebe, d. h. der Patient muss sich für dieses Verfahren psychisch und physisch belastenden invasiven Eingriffen bzw. Operationen unterziehen.

[0007] In Menke TB, Boettcher K, Kruger S, Kausch I, Boehle A, Sczakiel G, Warnecke JM. (2004): Ki-67 Protein concentrations in urothelial bladder carcinomas are related to Ki-67-specific RNA concentrations in urine. Clin Chem. 50: 1461–1463 wird eine Diagnosemethode beschrieben, die auf der Analyse der Expression des Tumormarkers Ki-67 basiert. Die im Tumorgewebe vorhandene Menge an Ki-67-Protein wird routinemäßig für die immunhistologische Analyse von Blasenkarzinomen und anderen Tumoren herangezogen. Es hat sich herausgestellt, dass die Ki-67-Expression im Tumorgewebe im Wesentlichen mit dem mRNA-Gehalt im Patientenurin übereinstimmt. Allerdings erlaubt die Analyse der mRNA-Menge von Ki-67 im Urin keine Differenzierung zwischen Blasenkarzinomen der Differenzierungsgrade G2 und G3.

[0008] Es besteht folglich ein Bedarf an nicht-invasiven diagnostischen Verfahren, die eine sensitive und spezifische Diagnose des nur mäßig differenzierten (G2) Blasenkarzinoms ermöglichen.

[0009] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein nicht-invasives Verfahren zur sensitiven und spezifischen Abgrenzung der mäßig differenzierten G2-Blasenkarzinome von den übrigen Grading-Typen des Blasenkarzinoms zu finden.

[0010] Die Aufgabe wird durch das Verfahren mit den Merkmalen von Anspruch 1 gelöst. Der einzige Unteranspruch gibt eine vorteilhafte Ausgestaltung der Erfindung wieder.

[0011] Die Erfindung beruht auf der von den Erfindern im Rahmen eines Screeningverfahrens nach Blasenkarzinom-assoziierten Genen gemachten Beobachtung, dass das Verhältnis der Genprodukte zweier Gene, CC3 und TC3, im Blasentumor für G2 Tumore gegenüber allen anderen Differenzierungsgraden verschieden ist und somit eine Möglichkeit zur Subklassifizierung von Blasentumoren darstellt. Dieses Verhältnis kann neben der Bestimmung des Proteingehaltes von CC3 und TC3 im Tumor auch durch den Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen für TC3 (GenAccess-No. AF092095) und CC3 (GenAccessNo. NM_006410) im Tumor, im Urin und im Urinsediment (d. h. im Wesentlichen dem Zellanteil im Urin) eines Patienten erfolgen.

[0012] Die CC3 mRNA kodiert ein Protein (synn. TIP30, Htatip2) welches stabil ist und pro-apoptotisch sowie anti-angiogenetisch wirkt und damit die Funktion eines Tumorsuppressorproteins aufweist (Emma Shtivelman (1997): A link between metastasis and resistance to apoptosis of variant small cell lung carcinoma. Oncogene 14: 2167–2173 und Xiao H, Palhan V, Yang Y, Roeder RG. (2000): TIP30 has an intrinsic kinase activity required for up-regulation of a subset of apoptotic genes. EMBO J. 19: 956–63).

[0013] Bei TC3 handelt es sich um eine Splicevariante der CC3 RNA. Das Translationsprodukt von TC3 ist sehr instabil, wirkt antiapoptotisch und kann somit als Tumorpromotor angesehen werden (Stephanie Whitman, Xia Wang, Refaat Shalaby and Emma Shtivelman (2000): Alternatively Spliced Products CC3 and TC3 Have Opposing Effects an Apoptosis. Molecular and Cellular Biology, 20: 583–593.).

[0014] Die Erfindung bedient sich somit nicht eines einzelnen unabhängigen molekularen Markers, sondern des Verhältnisses zwischen zwei funktionell miteinander konkurrierenden mRNA-Splicevarianten ein und desselben Gens, um eine Aussage über das Vorliegen eines Blasentumors mit einem bestimmten Differenzierungsgrad (G2) zu treffen. Der Fachmann würde nun grundsätzlich erwarten, dass mit steigendem Grading und somit zunehmender Aggressivität des Tumors, die Expression des Tumorsuppressorproteins CC3 sinkt und sich das Verhältnis von CC3 zu TC3 zugunsten des Tumorpromotors TC3 verschiebt. Es hat sich jedoch überraschenderweise gezeigt, dass beim Übergang vom Grading G1 zu G2 die mRNA-Konzentration von CC3 im Verhältnis zu TC3 steigt, während sie beim Übergang von G2 zu G3 wieder deutlich abfällt.

[0015] Der Anstieg des Verhältnisses der mRNA-Konzentrationen von CC3 zu TC3 über einen bestimmten Schwellenwert x lässt sich somit als diagnostischer Parameter für das Vorliegen eines Blasenkarzinoms des Differenzierungsgrades G2 nutzen. Auf der Basis der vorliegenden Daten ([Fig. 1](#), [Fig. 2](#) und Tabelle 1), die nach Art des unten aufgeführten Ausführungsbeispiels generiert wurden, lässt sich ein Schwellenwert x von 29 festlegen. Ist der Quotient Q aus der Menge an CC3 und TC3 größer oder gleich 29, ist der Test positiv. Auf der Grundlage von 35 ausgewerteten Analysen und unter der Annahme einer korrekten histopathologischen Klassifizierung lässt sich die korrekte Diagnose mit einer Sensitivität von 91,7% (richtig-positiv Rate) und einer Spezifität von 82,6% (richtig-negativ Rate) stellen (Tabelle 1, [Fig. 2](#)). Für die Zukunft ist die Analyse größerer Patientengruppen geplant. Dabei ist es wahrscheinlich, dass sich der hier angegebene Schwellenwert x mit dem steigenden Stichprobenumfang noch verändert, so dass der hier angegebene Schwellenwert x von 29 derzeit lediglich als Richtwert anzusehen ist.

[0016] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus folgender Beschreibung. Dabei werden

die Abbildungen näher beschrieben:

[0017] Fig. 1: Darstellung des Quotienten Q aus CC3 mRNA zu TC3 mRNA in den untersuchten Proben. Als Darstellung wurde ein gruppierter Boxplot gewählt. Die Patientengruppen sind entsprechend des histopathologischen gradings (G1–G3) gruppiert. Als weitere untersuchte Gruppen sind gesunde Probanden (o. B.) und Patienten mit Blasenentzündungen (entzündl.) dargestellt. Der Median (der Wert, unterhalb und oberhalb dessen jeweils 50% der ihrer Größe nach geordneten Werte liegen) ist durch den Balken gekennzeichnet, die Boxen markieren unten das 25er Perzentil (der Wert unterhalb dessen 25% der ihrer Größe nach geordneten Werte liegen) und oben das 75er Perzentil (der Wert oberhalb dessen 25% der ihrer Größe nach geordneten Werte liegen). Die Striche markieren das 95% Konfidenzintervall (der Wertebereich in dem sich mit 95%iger Wahrscheinlichkeit die Messpunkte dieser Gruppe befinden). Sterne und Punkte bezeichnen Messwerte außerhalb des 95% Konfidenzintervalls. Das Verhältnis von CC3 zu TC3 ist bei Patienten mit einem Blasen-tumor des Differenzierungsgrades G2 gegenüber allen anderen Patientengruppen deutlich erhöht. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch, dass das Vorliegen einer Blasenentzündung keinen Einfluss auf das CC3/TC3-Verhältnis hat. Somit ist der Test auch dann durchführbar und aussagekräftig, wenn der zu untersuchende Patient an einer akuten Blasenentzündung leidet, was gerade bei Patienten mit Blasenkarzinom häufig der Fall ist.

[0018] Fig. 2: Möglichkeit der Unterscheidung von G2-Tumoren von anderen Tumoren und Kontrollgruppen durch das Verfahren. Darstellung in Form eines Receiver-Operator-Graphen (ROC-curve). Aufgetragen ist die Sensitivität (y-Achse) gegen 1-Spezifität (x-Achse). Basierend auf den in Tabelle 1 dargestellten Daten zeigt die Kurve den Zusammenhang zwischen der Abnahme der Spezifität bei Zunahme der Sensitivität. Je steiler die Kurve ist desto spezifischer kann ein Verfahren bei hoher Sensitivität ein Ereignis detektieren (Weiss HL, Niwas S, Grizzle WE, Piyathilake C. (2003–2004): Receiver operating characteristic (ROC) to determine cut-off points of biomarkers in lung cancer patients Dis. Markers. 19: 273–278.

[0019] Das Maß der Fläche unter der Kurve gibt hierbei die diagnostische Verwertbarkeit an. Für Werte von $> 0,75$ ist die Möglichkeit einer diagnostischen Nutzung gegeben. Für das dargestellte Testsystem beträgt der Wert $0,87$. Der Pfeil bezeichnet den auf dem derzeitigen Stichprobenumfang von $n = 35$ basierenden Schwellenwert x (ein Verhältnis von CC3 RNA zu TC3 RNA von ≥ 29) bei dem die Unterscheidung von G2 Tumoren zu allen anderen untersuchten Klassen mit einer Sensitivität von $91,7\%$ und einer Spezifität von $82,6\%$ möglich ist.

[0020] Schließlich zeigt die im Anschluss an den Text der Beschreibung wiedergegebene Tabelle 1 die der ROC-Kurve (Fig. 2) zugrunde liegenden Werte-Paare Sensitivität (Angabe, wieviele der positiven Proben durch den Test positiv erkannt wurden) und Spezifität (Angabe, wieviele der negativen Proben durch den Test negativ erkannt wurden) und enthält darüber hinaus die Information, welche jeweiligen Trennwerte (s. u.) den entsprechenden Werte-Paaren zugeordnet sind (Spalte ganz links). Wenn man einen Trennwert von 29 als Schwellenwert x definiert, bekommt man ein Wertepaar von $91,7\%$ Sensitivität und $82,6\%$ Spezifität (dargestellt als $1-0,174$). Man kann die gleiche Sensitivität auch mit einem Schwellenwert von 22 erreichen, dann jedoch sinkt die Spezifität, weil mehr negative Kontrollen fälschlicherweise als positiv erkannt werden, da sie in diesem Fall über dem Schwellenwert x liegen. a Der kleinste Trennwert ist der kleinste beobachtete Testwert (Quotient $Q = \text{mRNA}_{\text{CC3}}/\text{mRNA}_{\text{TC3}}$) minus 1, und der größte Trennwert ist der größte beobachtete Testwert plus 1. Alle anderen Trennwerte sind Mittelwerte von zwei aufeinanderfolgenden, geordneten beobachteten Testwerten.

[0021] Die Erfindung wird im Folgenden anhand eines Ausführungsbeispiels näher erläutert:

1) Isolierung von RNA aus dem Urin von Tumorpatienten/Verdachtspersonen

[0022] Zunächst erfolgt die Mischung der Urinprobe oder des Urinsedimentpellets mit einer Guanidinium-Salzlösung zu einer Endkonzentration von 3 mol/l Guanidinium. Diese Lösung wird auf eine kommerziell erhältliche Säule mit aktivierter Silica-Matrix (hier Qiagen Midi Kit) gegeben wobei die Nukleinsäuren an die Matrix gebunden werden. Anschließend erfolgt das Waschen der Silica-gebundenen Nucleinsäuren mit Hochsalzpuffer zur Abtrennung von Proteinen und löslichen Stoffen mit einem Puffer des Herstellers. Zur Vermeidung von DNA Kontaminationen wird im folgenden Schritt ein enzymatischer Abbau eventuell vorhandener DNA auf der Silica-Matrix durchgeführt. In diesem Beispiel fand das Enzym DNase I, gelöst in $140 \mu\text{l}$ DNase I Puffer, Verwendung. Im Anschluss erfolgt das Waschen der Silica-gebundenen RNA mit Hochsalzpuffer des Herstellers zur Abtrennung von DNA-Fragmenten, Proteinen und löslichen Stoffen. Die Elution der RNA von der Silica-Matrix wird mittels eines möglichst geringen Volumens RNase-freien Wassers erreicht. Hier wurden $2 \times 160 \mu\text{l}$ H_2O verwendet. Zu Erhöhung der RNA-Konzentration in der Probe sollte die Einengung des Pro-

benvolumens mittels Vakuumzentrifugation auf 20 µl erfolgen. Alternativ ist hier auch eine Ethanolpräzipitation möglich.

2) Enzymatische Synthese der Gegenstrang-DNA aus isolierter RNA

[0023] Zur Synthese der Gegengang-DNA (cDNA) werden 10 µl des RNA-haltigen Isolates in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mittels eines kommerziell erhältlichen reverse Transkriptase-Systems (hier Superscript III/Invitrogen) umgeschrieben. Der Beginn der reversen Transkriptionsreaktion auf der RNA wird durch kommerziell erhältliche random primer von 6 Nukleotiden. Länge (Invitrogen) in einer Konzentration von 15 ng pro µl Reaktionsvolumen erreicht. Nach Ende der vorgegebenen Reaktionszeit (hier 50°C für 60 min) wird das Enzym durch einen Hochtemperaturschritt für 15 Minuten bei 70°C inaktiviert.

3) Amplifikation und Quantifizierung der Gegenstrang-DNA durch quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

[0024] Die Bestimmung der Mengen von CC3-cDNA und TC3-cDNA in der Probe wird mittels einer quantitativen Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Dazu wird eine Verdünnung der cDNA Lösung mit geeigneten Puffer und einer temperaturstabilen DNA-Polymerase amplifiziert. Hierzu wurde beispielhaft das kommerziell erhältliche „core-kit“ der Firma Eurogentec verwendet, um in einem Reaktionsvolumen von 10 µl Bedingungen von 1 × PCR-Puffer, 0,25 E TaqPolymerase, 200 µmol/l dNTPs und 3 mmol/l MgCl₂ einzustellen. Die Spezifität wird durch ein Oligonukleotid-Paar festgelegt, welches durch spezifische Basenpaarung an die zu amplifizierende Sequenz bindet. Die sequenzspezifische, zyklische Amplifikation der Gegenstrang-DNA wird durch Zugabe von Oligonukleotiden mit den unter der SEQ ID NO: 1 und SEQ ID NO: 2 angegebenen Nukleinsäuresequenzen (siehe Sequenzprotokoll) für CC3 sowie in einem zweiten Ansatz der Oligonukleotide mit den unter der SEQ ID NO: 3 und SEQ ID NO: 4 angegebenen Nukleinsäuresequenzen (siehe Sequenzprotokoll) für TC3 bis zu einer Endkonzentration von 200 nmol/l erreicht. Die Quantifizierung erfolgt durch ein weiteres Oligonukleotid, welches ebenfalls spezifisch an die zu detektierende Sequenz bindet und proportional zur Amplifikation ein Fluoreszenz-Signal emittiert. Die Quantifizierung erfolgt hier beispielhaft durch eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde des TaqMan Systems mit der unter der SEQ ID NO: 5 angegebenen Nukleinsäuresequenz für CC3 und der unter der SEQ ID NO: 6 angegebenen Nukleinsäuresequenz für TC3 (siehe Sequenzprotokoll) jeweils in einer Endkonzentration von 125 nmol/l. Die sequenzspezifische Amplifikation erfolgt im Anschluß an einen einmaligen Denaturierungsschritt für 10 min bei 92°C, in 50 Temperatur-Zyklen von 15 s bei 95°C gefolgt von 1 min bei 60°C. Die absolute Quantifizierung kann durch parallele Ansätze von Verdünnungsreihen der Sequenzen von TC3 und CC3 in bekannten Konzentrationen unter identischen Bedingungen erreicht werden.

4) Bestimmung des Verhältnisses von CC3 RNA zu TC3 RNA in der Urinprobe

[0025] Die Bestimmung des Quotienten Q aus dem Gehalt der CC3 RNA und dem Gehalt der TC3 RNA in der Urinprobe erfolgt rechnerisch durch Dividieren der absoluten Menge an CC3 eDNA in der PCR-Probe durch die absolute Menge an TC3 cDNA in der PCR-Probe.

Tabelle 1

Positiv, wenn größer oder gleich(a)	Sensitivität	1-Spezifität
,0300	1,000	1,000
3,2451	1,000	,957
5,7783	1,000	,913
6,6946	1,000	,870
8,3189	1,000	,826
10,4966	1,000	,783
12,2374	1,000	,739
12,8398	1,000	,696
13,2988	1,000	,652
14,1548	1,000	,609
15,3909	1,000	,565
16,9673	1,000	,522
18,3447	1,000	,478
20,3359	1,000	,435
21,9733	1,000	,391
22,8970	,917	,391
23,8112	,917	,348
24,3518	,917	,304
25,9237	,917	,261
27,8996	,917	,217
29,0729	,917	,174
29,8282	,833	,174
33,0354	,750	,174
37,8349	,750	,130
42,2673	,667	,130
46,8128	,583	,130
49,2439	,500	,130
53,7881	,417	,130
58,4487	,333	,130
63,4505	,250	,130
70,0225	,250	,087
75,3577	,167	,087
81,7666	,167	,043
88,8509	,167	,000
96,7593	,083	,000
101,8064	,000	,000

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
<120> Verfahren zur Bestimmung von Blasenkarzinomen des Differenzierungsgrades G2
<130> P5483-pva5087
<160> 6
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> forward_primer_CC3
<222> (1)..(20)
<223>
<400> 1
gtctgcagag ctggcaaaag 20

<210> 2
<211> 23
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<221> reverse_primer_CC3
<222> (1)..(23)
<223>
<400> 2
tcaaccttgg cttctacttc tcc 23

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> forward_primer_TC3

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 3

ggaagctcac cttcgacgag

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> reverse_primer_TC3

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 4

agcattgcaa caggcacaaa

20

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<221> TaqMan_Probe_CC3

<222> (1)..(26)

<223>

<220>

<221> 5'-modification:Yakima_Yellow

<222> (1)..(1)
 <223> fluorescent_dye
 <220>
 <221> 3'-modification:Black_Hole_Quencher_1
 <222> (26)..(26)
 <223> quencher
 <400> 5
 tggagggtgc aaacatttca acttgc 26

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz
 <220>
 <221> TaqMan_Probe_TC3
 <222> (1)..(20)
 <223>
 <220>
 <221> 5'-modification:6-FAM
 <222> \ (1)..(1)
 <223> fluorescent_dye
 <220>
 <221> 3'-modification:Black_Hole_Quencher_1
 <222> (20)..(20)
 <223> quencher
 <400> 6
 cagagggaaa gctggggcgg 20

Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Blasenkarzinomen des Differenzierungsgrades G2, gekennzeichnet durch die Schritte
 Bestimmen der mRNA-Menge $mRNA_{CC3}$ des Proteins CC3 aus dem Urin oder dem Urinsediment eines Menschen,
 Bestimmen der mRNA-Menge $mRNA_{TC3}$ des Proteins TC3 aus demselben Probenmaterial, und
 Berechnen des Quotienten $Q = mRNA_{CC3}/mRNA_{TC3}$, wobei ein Quotient $Q \geq 29$ das Vorliegen eines Blasenkarzinoms des Differenzierungsgrades G2 anzeigt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung der mRNA-Mengen mittels einer quantitativen Polymerasekettenreaktion erfolgt, und die hierbei eingesetzten Oligonukleotide ausgewählt sind aus der Gruppe von Nukleinsäuremolekülen der unter SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ

ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 und SEQ ID NO: 6 dargestellten Sequenzen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

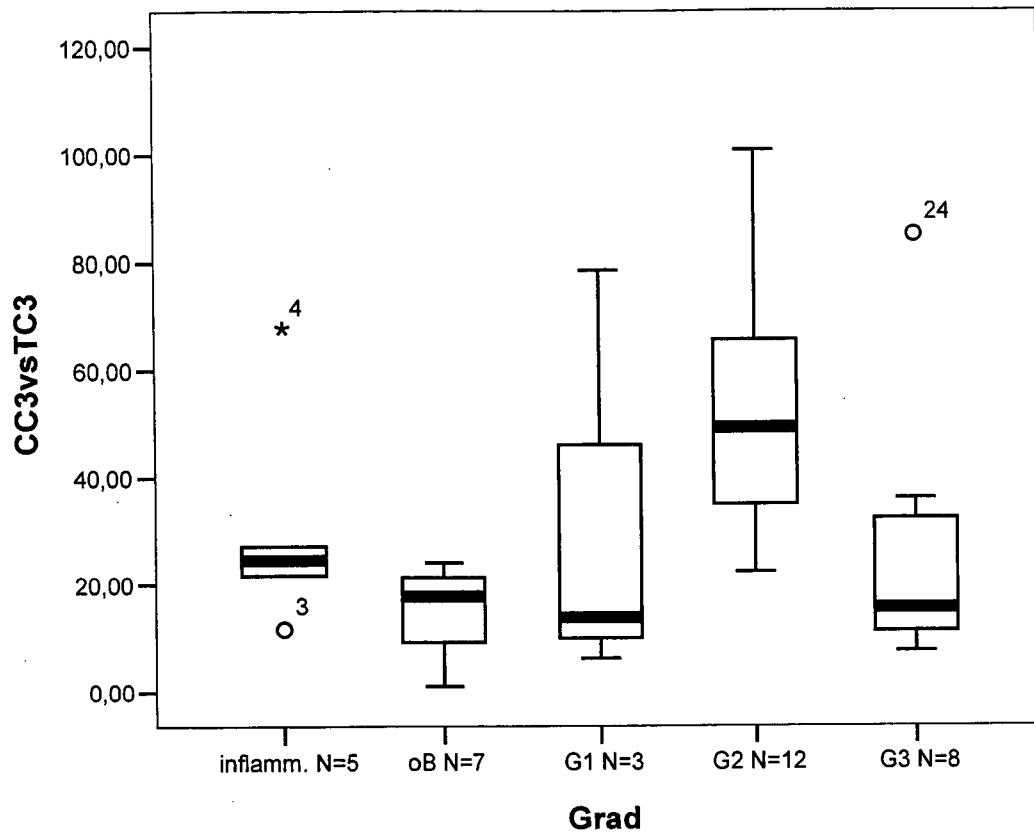


FIG. 1

ROC-Kurve CC3vsTC3 G2

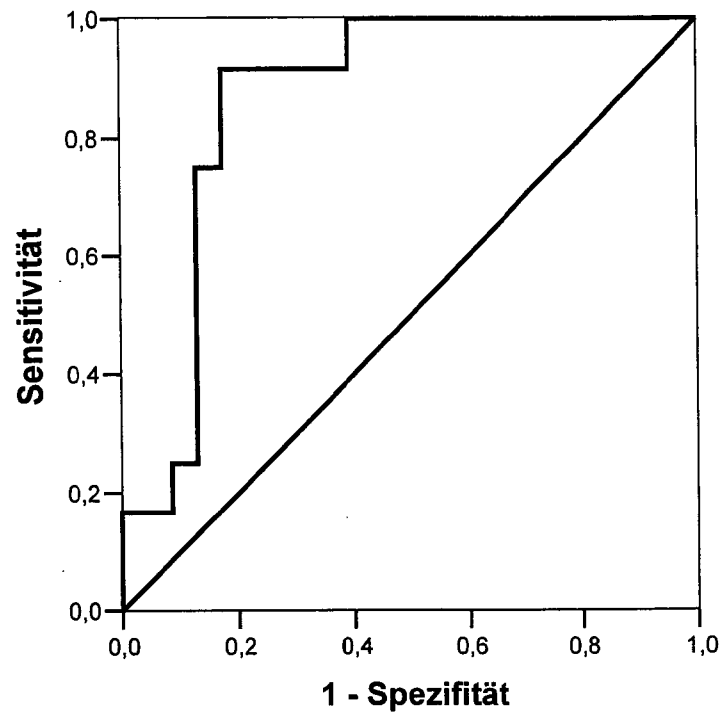


FIG. 2