

Aus dem Institut für Experimentelle Endokrinologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung eines Real – Time - PCR Assays im peripheren Blut
für Thyreoglobulin mRNA

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Sarah Katharina Kaufmann
aus Simmern

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle
2. Prof. Dr. G. Brabant
3. PD Dr. C. Hoang-Vu

Datum der Promotion: 15.12.2006

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Häufig verwendete Abkürzungen	1
2 Einleitung	2
2.1 Die Anatomie der Schilddrüse	2
2.2 Thyreoglobulin- und Schilddrüsenhormonsynthese	3
2.3 Thyreoglobulinfreisetzung	5
2.4 Hypothalamisch - hypophysäre Steuerung	8
2.5 Stoffwechselwirkung der Schilddrüsenhormone	9
2.6 Schilddrüsenerkrankungen	9
2.6.1 Primäre Hypothyreose	10
2.6.2 Struma	12
2.6.3 Neoplastische Läsionen der Schilddrüse	13
2.7. Serum Thyreoglobulin Bestimmung in der Schilddrüsendiagnostik	19
2.8 Fragestellung	20
3 Material	22
3.1 Geräte	22
3.2 Kits	23
3.3 Wichtige Lösungen	23
3.4 Software	24
4 Methoden	26
4.1 Probengewinnung	26
4.1.1 Isolation von gesamt RNA	26
4.1.2 Humane follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC 133 und 238	26
4.1.3 Klinisches Untersuchungsmaterial – tabellarischer Überblick	26
4.2 Serum - Thyreoglobulin und - Thyreotropin Bestimmung	28
4.3 RNA Isolierung	28
4.3.1 RNA Isolation nach Chomczynski et al. (122)	28
4.3.2 Ficoll Gradient und RNEASY Protokoll	29
4.3.3 RNA Isolation aus peripherem Blut	29
4.3.4 RNA Isolation aus Zelllinien	29
4.4 RNA Quantitäts- und Qualitätskontrolle	29
4.4.1 Bestimmung der RNA Konzentration	29
4.4.2 Qualitätskontrolle	29

4.4.3 DNase Restaktivitätskontrolle	30
4.5 Reverse Transkription	30
4.6 Polymerase – Chain – Reaktion (PCR)	31
4.6.1 Allgemeines	31
4.6.2 Primerübersicht	32
4.6.3 Reaktionsbedingungen	32
4.6.4 Agarosegelelektrophorese der PCR Produkte	33
4.7 TaqMan PCR	33
4.7.1 Allgemeines	33
4.7.2 Primer und Sonde	35
4.7.3 Reaktionsansatz	36
4.7.4 Reaktionsbedingungen	36
4.7.5 Standardkurve	36
4.8 Northern Blot	37
5 Ergebnisse	39
5.1 Ergebnisse der Etablierung eines Real - Time- PCR Assays	39
5.1.1 Vergleich der RNA Extraktionsmethoden	39
5.1.2 DNase Restaktivitätskontrolle	40
5.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) für Thyreoglobulin (Tg) mRNA	41
5.2.1 Primerspezifität	41
5.2.2 Primersensitivität	42
5.3 Tg mRNA Expression im klinischen Probenmaterial	43
5.3.1 Kontrollgruppe	44
5.3.2 Tg mRNA Expression in konnatal athyreoten Patienten	44
5.3.3 Tg mRNA Expression bei rhTSH behandelten Patienten	46
5.3.4 Tg/GAPDH mRNA Expression in DTC Patienten	50
5.4 Northern Blot	53
6 Diskussion	55
6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) in der medizinischen Diagnostik	55
6.1.1 Probengewinnung	56
6.1.2 RNA Isolationsmethoden	57
6.1.3 Reverse Transkription	59
6.1.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)	61

6.1.5 Quantitative PCR	62
6.1.6 Zusammenfassung	64
6.2 Thyreoglobulin (Tg) mRNA als Tumormarker	64
6.2.1 Sensitivität und Spezifität des PCR Assays für Tg mRNA	64
6.2.2 Kontrollgruppen	65
6.3 Dynamik des PCR Assays für Tg mRNA in vivo	69
6.4 Tg/GAPDH mRNA in Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom (DTC)	71
6.4.1 Literaturüberblick der PCR Assays für Tg mRNA aus peripherem Blut	75
6.4.2 Falldarstellung	81
7 Polymerase Chain Reaction für Tg mRNA in der DTC Nachsorge – die Chance?	87
8 Abbildungsverzeichnis	91
9 Tabellenverzeichnis	92
10 Literaturverzeichnis	93
11 Erklärung	105
12 Danksagung	106
13 Curriculum vitae	107
14 Veröffentlichungen	108

1 Häufig verwendete Abkürzungen

AMES	Klassifizierung für FTC (1)
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
CT	Computertomografie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Desoxy – Adenin-(Guanin-, Cytosin- oder Thymin)-triphosphat
DTC	Differenziertes Thyreoideakarzinom
EDTA	Ethylendiamin Tetracetat
FNAB	Feinnadelaspirationsbiopsie
FOTC	Follikulär onkozytäres Thyreoideakarzinom
FTC	Follikuläres Thyreoideakarzinom
FTC-133	Zelllinie eines FTC Primärtumors
FTC-238	Zelllinie einer pulmonalen Metastase eines FTC
(f)T3	(freies) Trijodthyronin
(f)T4	(freies) Tetrajodthyronin = Thyroxin
GAPDH	Glycerol-aldehyd-6-phosphat-dehydrogenase
GBq	Gigabecquerel
Gy	Gray
I-123	Jod 123
I-131	Jod 131
MACIS	Klassifizierung für PTC (2)
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomografie
NIS	Natrium – Jodid Symporter
PAX8	Paired Box Gene 8
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronenemissionstomografie
PTC	Papilläres Thyreoideakarzinom
rhTSH	Rekombinantes humanes Thyreoidea stimulierendes Hormon
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
S-Tg	Serumthyreoglobulin
Tc 99m	Technetium 99m
Tg	Thyreoglobulin
Tg Ak	Thyreoglobulin Antikörper
TNM	Tumor Klassifikation nach WHO Klassifikation (3)
TPO	Thyreoidale Peroxidase
TSH	Thyreoida stimulierendes Hormon
TSHr	TSH Rezeptor
TTF1, TTF2	Thyreoidaler Transkriptionsfaktor 1 bzw. 2

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Thyreoglobulin- und Schilddrüsenhormonbiosynthese	3
Abbildung 2: Steuerung der Schilddrüsenhormonsekretion.....	8
Abbildung 3: Organogenese der Schilddrüse (58).....	11
Abbildung 4: Modell der Karzinogenese Nicht - medullärer Schilddrüsenkarzinome nach Segev et al. (97).	16
Abbildung 5: Prinzip der TaqMan Sonde.	34
Abbildung 6: TaqMan Sonde während der PCR Phasen.....	35
Abbildung 7: Standardkurve von GAPDH - (▲) und Tg - (●) mRNA	37
Abbildung 8: Restaktivitätskontrolle der DNase im RNA Eluat.....	40
Abbildung 9: Vergleich der Tg mRNA Primer Sensitivität im Modell.....	43
Abbildung 10: Vergleich der Thyreoglobulin Primersensitivität im in vivo System.	43
Abbildung 11: Konventionelle PCR für Tg und GAPDH mRNA von A1 - A4.	45
Abbildung 12: S-Tg und Tg/GAPDH mRNA konnatal athyreoter Patienten.....	46
Abbildung 13: S-Tg und Tg/GAPDH mRNA Werte vor und nach rhTSH Gabe in DTC .	47
Abbildung 14: Real - Time- PCR der DTC Patienten nach klinischen Stadien.	49
Abbildung 15: Northern Blot des Multiple tissue expression Array.	54

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: MACIS Klassifikation für PTC nach Hay et al. (2)	17
Tabelle 2: Ames Klassifikation für FTC nach Cady et al. (1).....	18
Tabelle 3: Übersicht der DTC Patienten.	27
Tabelle 4: Tabellarischer Überblick der mit rhTSH behandelten DTC Patienten	28
Tabelle 5: Übersicht der athyreoten Patienten.....	28
Tabelle 6: Reaktionsansatz DNase Restaktivitätskontrolle	30
Tabelle 7: Primerübersicht der konventionellen PCR.	32
Tabelle 8: Reaktionsbedingungen der Primerpaare der konventionellen PCR.....	32
Tabelle 9: Reaktionsbedingungen der Konventionellen PCR für GAPDH und Tg	32
Tabelle 10: Thyreoglobulin (Tg) Primer und Sonde (P) der Real – Time PCR.	35
Tabelle 11: Reaktionsbedingungen der Real - Time – PCR.	36
Tabelle 12: Gegenüberstellung der RNA Isolationsmethoden.....	39
Tabelle 13: Übersicht der S-Tg und Tg/GAPDH mRNA Werte der vier Patienten mit konnataler Athyreose (A1- A4).	46
Tabelle 14: S-Tg, TSH und Tg/GAPDH mRNA Werte vor und nach rhTSH Stimulation.	47
Tabelle 15: Real – Time - PCR Ergebnisse und Befunde der DTC - Nachsorge.....	49
Tabelle 16: Literaturüberblick der PCR Assays für Tg mRNA in DTC.	75

11 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Dissertation selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst habe, die vorliegende Arbeit keine Kopie - auch nicht in Teilen - einer anderen Arbeit darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt worden sind.

Freiburg, den 25.11.2005

(Sarah Kaufmann)

12 Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinen Betreuern, Frau PD Dr. Cornelia Schmutzler und Herrn Prof. Dr. Joseph Köhrle, für die Fragestellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die fachliche Unterstützung und konstruktiven Diskussionen im Verlauf meiner Doktorarbeit. Erst durch diese enge Zusammenarbeit auch innerhalb der Arbeitsgruppe und insbesondere mit der Klinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg und Prof. Dr. Christoph Reiners war es mir möglich, dieses interessante Thema zu bearbeiten. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den freundschaftlichen zwischenmenschlichen Umgang innerhalb der Arbeitsgruppe sowohl in Würzburg als auch in Berlin bedanke ich mich herzlich, denn dies ist nicht zuletzt auch ihr Verdienst.

Ein herzlicher Dank sei an dieser Stelle für die geduldige Betreuung, für fachliche Hilfe und für das kritische Korrekturlesen Frau PD Dr. Cornelia Schmutzler ausgesprochen.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der beiden Arbeitsgruppen, mit denen ich eine arbeitsreiche, lernende aber nicht zuletzt auch schöne Zeit verbracht habe.

Im speziellen bedanke ich mich bei Dr. med. Marcus Luster, Dr. rer. nat. Lutz Schomburg und Dr. rer. nat. Birgit Mentrupp für fachliche und technische Hilfestellungen.

Ein Dank auch an die zahlreichen Datenrettungen und Lösungen von Softwareproblemen von Dipl. biol. Peter Hofmann.

Meinen Eltern danke ich, dass Sie mir das Studium ermöglicht haben und mich stets unterstützen.

Ein großes Dankeschön richte ich auch an alle Freunde und Kollegen, die mir mit Rat und Tat und viel Geduld im Verlaufe dieser Arbeit zur Seite standen.

13 Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

14 Veröffentlichungen

- Publikation

Kaufmann S, Schmutzler C, Schomburg L, et al.: Real time RT-PCR analysis of thyroglobulin mRNA in peripheral blood in patients with congenital athyreosis and with differentiated thyroid carcinoma after stimulation with recombinant human thyrotropin. *Endocr Regul.* 2004 Jun; 38(2): 41-9

- Vorträge

- Arbeitstagung der Experimentellen Schilddrüsenforschung, München, 2000
- Annual Meeting of the German Society of Endocrinology, Magdeburg, 2001