

3 Material

3.1 Geräte

Heizblock	Techne DB3	GLW, Würzburg
Mini 10 Hybridisierofen		Fa. MWG, Ebersberg
Minigelkammer		Fa. Roth, Karlsruhe
pH Meter		Fa. WTW, Weilheim
Phosphoimager Zyklone		Fa. Perkin Elmer, Darmstad
Pipetten	10 µl, 100 µl , 1000 µl	Fa. Eppendorf, Hamburg
Spectrophotometer		Fa. Pharmacia, Freiburg
Videodensitometer		Fa. LTF, Wasserburg
Wasserbad 1083		GLW, Würzburg
Zentrifugen	Biofuge 17 RS,	Fa. Heraeus, Hanau
	Megafuge 1.0 R,	Fa. Heraeus, Hanau
	EBA 12,	Fa. Hettich, Tuttlingen
	J2- HS	Fa. Beckman, Krefeld
	L70 Ultrazentrifuge	Fa. Beckman, Krefeld
	Univapo 150 H	Fa. UniEquip, Martinsried
Waagen	Laborwaage LC 420	Fa. Sartorius, Göttingen
	Analysenwaage BA 61	Fa. Sartorius, Göttingen
	Laborwaage LC 4200	Fa. Sartorius, Göttingen
Vortexer	Vortex Genie 2	Fa. Bender & Hobein, Zürich
Thermocycler	Abi Prism 5700	Fa. Perkin Elmer, Darmstadt
	FLX- 35 M	Vilber Lourmat, Marne/Frankreich
	PCR-200	Fa. Biozym, Oldendorf
Reinstwasser-Anlage	Milli-QUF Watersystem Plus-	Fa. Millipore, Eschborn
Sterilbänke		Fa. Clean Air, Hilden
Vortex Geräte	Vortex Genie 2	Fa. Bender & Hobein, Zürich

3.2 Kits

DYNOtest Tg-S,	Fa. Brahms, Henningsdorf/Berlin
DYNO TSH 1	Fa. Brahms, Henningsdorf/Berlin
DYNOtest Tg-pluS	Fa. Brahms, Henningsdorf/Berlin
Human Mutiple Tissue Expression Array 2	Clontech Laboratories, Palo Alto, USA
NukleoSpin RNA II Blood Kit®	Fa. Macherey - Nagel, Düren
Predeveloped TaqMan Assay	Fa. P.E. Applied Biosystems, Darmstadt
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Fa. Qiagen, Hilden
Random Primed Labelling Kit	Fa. Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
RNase-Free DNase Set	Fa. Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit®	Fa. Qiagen Hilden
SV Total - RNA Isolation System	Fa. Promega, Mannheim

3.3 Wichtige Lösungen

10 % SDS	80 g Natriumdodecylsulfat (SDS), ad 800 ml RNase freies H ₂ O
1 %ige Formamid - Agarose (RNA Analyse)	0,5 g Agarose, 36 ml DEPC H ₂ O, 5 ml 10 x MOPS, 9 ml 37%iges Formamid , 0,2 µg/mL EtBr.
10 x MOPS	33,5 g 3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS), 3,28 g NaOAc, 16 ml EDTA (0,5 M), 2,54 g NaOH, ad 800 ml, RNase freies H ₂ O, pH 7
10 x TBE	108 g Tris-Base, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8) ad 1000 ml RNase freies H ₂ O
10x TBE Puffer	900 mM Tris-HCl, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA, ad 1000 ml H ₂ O
20 x SSC	140 g NaCl, 70,6 g Na ₃ Cit x 2H ₂ O, ad 800 ml RNase freies H ₂ O
20 x SSPE	140 g NaCl, 22 g NaH ₂ PO ₄ x 2H ₂ O, 2,92 g EDTA, 6,4 g NaOH, ad 800 ml RNase freies H ₂ O, pH 7,4
50 x Denhardt's	5 g Ficoll 400, 5 g Polyvinylpyrrolidone, 5 g bovines Serumalbumin (BSA), ad 500 ml H ₂ O, Filtration
5x Probenpuffer für RNA/ DNA	25 mg Bromphenolblau, 5 g Glycerol, 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) 10 ml RNase freies H ₂ O, autoklaviert
Deionisiertes Formamid	2, 5 g Mixed Bed Resin, 50 ml Formamid, Filtration (0,4 µm Filter), Aliquots bei -20°C
dNTP Mix	Mix aus Desoxy - Adenin-, Guanin-, Cytosin- und Thymin-triphosphat, Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Ficoll 400	Serva GmbH, Heidelberg
1x First Strand Buffer	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Guanidiniumthiocyanat Lösung	50 g Guanidiniumthiocyanat, 0,5 g Natrium-Laurylsarcosin, 2,5 ml 1 M C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ (pH 7,0), ad 100 ml RNase freies H ₂ O, Filtration (0,4 µm Filter), 7 µl/ ml β-Mercaptoethanol, Aufbewahrung lichtgeschützt
Hybridisierlösung	5 ml 4%iges deionisiertes Formamid, 3 ml 20 x SSPE, 1,4 ml H ₂ O, 0,5 ml 10 %igem SDS, 0,1 ml mit Ultraschall behandelte single stranded Salm Species Sperm DNA (ssDNA)

Oligo dt 12-18 Primer	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
pGI ₂ basic Vektor	ds-DNA, 5597 bp, Promega GmbH, Mannheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,15 g Na ₂ HPC ₄ x 2H ₂ O, 200 mg KH ₂ PO ₄ , ad 1000 ml RNase freies H ₂ O mit pH 7,4.
Prähybridisierlösung	5 ml 4%igem deionisiertem Formamid, 1 ml 50 x D.H., 3 ml 20 x SSPE, 0,1 ml ss DNA [10 mg/ml], 0,4 ml H ₂ O, 0,5 ml 10%igem SDS
Primer Oligonukleotide	Pharmacia, Freiburg, Biotech
Random Primers	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
SuperScript™ II	Reverse Transkriptase, Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
RNase out	Ribonuklease Inhibitor, Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
SuperScript™ II	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Taq Polymerase	Qiagen, Hilden
Thyrogen	Rekombinantes humanes TSH (Thyrotropin alfa), Genzyme, USA
Trizol	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Universal Master Mix	Applied Biosystems, Langen
x%iges Agarose Gel	x g Agarose, ad 100 mL 0,5x TBE mit 0,2 µg/mL EtBr, für ca. 10 min aufkochen
Zellkulturnährmedium	Dulbecco's modification of Eagle's medium/Hank's F12 (DMEM –F12) mit 5 bzw. 10%igem fetalem Kälberserum (FCS)

3.4 Software

Als Textverarbeitungsprogramm ist Office 2000 verwendet worden. Für Berechnungen und zum Erstellen von Grafiken sind Excel 2000, SigmaPlot, SPSS 9.0 und Adobe Photoshop 8.0 verwendet worden. Die densitometrischen Auswertungen erfolgen mit Hilfe der Software Bioprofil (LTF, Wasserburg). Die Northern Blot Analyse erfolgt am Phosphoimager mit entsprechender Betriebssoftware. Die Real - Time- PCR ist mit GeneAmp 5700 SDS und der entsprechenden Software von Perkin Elmer Applied Biosystems, Darmstadt ausgewertet worden.

4 Methoden

4.1 Probengewinnung

4.1.1 Isolation von gesamt RNA

In Zusammenarbeit mit der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg und mit Einverständnis der Patienten ist eine periphere venöse Blutentnahme erfolgt und anschließend RNA wie in 4.3. beschrieben zur weiteren Diagnostik isoliert worden.

4.1.2 Humane folliculäre Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC 133 und 238

Zellen der folliculären Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC 133 und 238 (120, 121) werden als Kontrollen in der PCR Diagnostik eingesetzt. Beide Zelllinien sind aus einem FTC eines Patienten gewonnen worden, wobei FTC-133 dem Primärtumor und FTC-238 aus Lungenmetastasen entstammt. Die Zelllinien FTC-238 werden mit Dulbecco's modification of Eagle's medium/Hank's F12 Mix im Verhältnis 1:1 (DMEM- F12) mit einem 5% igen Anteil an Kälberserum (FCS) und die FTC-133 mit DMEM-F12 mit 10% igen Anteil FCS unter 4%iger CO₂ Zufuhr bei 37°C kultiviert (120, 121). Der Wechsel des Nährmediums erfolgt zwei- bis dreitägig. Eine Passagierung erfolgt im Wochenzyklus. Die RNA Isolation aus Schilddrüsenkarzinomzelllinien erfolgt wie in 4.3 beschrieben.

4.1.3 Klinisches Untersuchungsmaterial – tabellarischer Überblick

Informed Consent ist von allen Patienten eingeholt worden und die zusätzliche Blutentnahme (2,7 ml Vollblut in EDTA) zur PCR Diagnostik ist im Rahmen elektiver Nachsorgeuntersuchungen durchgeführt worden. Serum Thyreoglobulin (S-Tg), die S-Tg Wiederfindungsrate und TSH im Serum ist bei allen Patienten neben der Tg/GAPDH mRNA bestimmt worden. Bei gestörter S-Tg Wiederfindung schloss sich die Messung der S-Tg Antikörper im Serum an.

4.1.3.1 Patienten mit differenziertem Thyreoidea Karzinom

Patient	TNM ⁶⁾	MACIS ⁷⁾ AMES ⁸⁾	Histologie	Diagnostik 2000 Szintigrafie, Sonografie, Computertomografie
M1 ¹⁾	pT _x N ₀ M ₀	Unbekannt ⁷⁾	FTC	Lokal und peripher ⁴⁾
M2	pT ₃ N ₀ M ₀	low risk ⁸⁾	FOTC	unauffällig inclusive PET ⁵⁾
M3	pT _{4a} N _{1b} M ₀	7,1 ⁷⁾	PTC	unauffällig inclusive PET ⁵⁾
M4	pT ₃ N ₀ M ₁	12,09 ⁷⁾	PTC	Lokal und peripher ⁴⁾
M5	pT _{4a} N ₀ M ₁	High risk ⁸⁾	FOTC	Lokal und peripher ⁴⁾
N1 ²⁾	pT _{2a} N ₀ M ₀	low risk ⁸⁾	FOTC	unauffällig ³⁾
N2	pT _{1b} N ₀ M ₀	4,3 ⁷⁾	PTC	
N3	pT ₄ N ₀ M ₀	high risk ⁸⁾	FTC	
N4	pT ₂ N _{1a} M ₀	4,52 ⁷⁾	PTC	
N5	pT _{4b} N ₁ M ₀	high risk ⁸⁾	FTC	
N6	pT ₄ N ₀ M ₀	6,6 ⁷⁾	PTC	
N7	pT _{4a} N _{1b} M ₁	7,85 ⁷⁾	PTC	

TABELLE 3: ÜBERSICHT DER DTC PATIENTEN.

¹⁾M1 – M5: Metastasierung und / oder Lokalrezidiv

²⁾N1 – N7: kein Metastasierungsprozess

³⁾unauffällig, d.h. S-Tg < 0,3 ng/ml (DYNObest® Tg-S),

⁴⁾lokales bzw. peripheres Rezidiv i.S. einer Metastasierung

⁵⁾unauffällige Szintigrafie, Computertomografie, Sonografie, Positronenemissionstomografie

⁶⁾TNM nach WHO - Klassifikation (3)

⁷⁾MACIS Klassifikation für PTC (2)

⁸⁾AMES Klassifikation für FTC (1)

4.1.3.2 Mit rhTSH behandelte Patienten

Die S- Tg und Tg mRNA Werte von vier DTC Patienten werden in der postoperativen Phase nach totaler Thyreoidektomie und Radiojodablation verglichen. Alle vier Patienten haben 0,9 mg/ Tag rhTSH i.m. an zwei aufeinander folgenden Tagen nach Haugen et al. (101) für ein diagnostisches Ganzkörperszintigramm erhalten. R1 und R4 weisen zum Zeitpunkt der Untersuchung Metastasierungen auf, hingegen sich bei R2 und R3 in der angewendeten Diagnostik (Sonografie, MRT, CT, S-Tg) kein Anhalt für Metastasen ergibt. Histologisch gesichert sind bei R2, R3 und R4 ein PTC und bei R1 ein FTC. Die Blutentnahme ist bei R1, R2 und R4 nach der ersten und nach der zweiten rhTSH Injektion erfolgt. Bei Patient R3 ist die Blutentnahme vor der ersten und nach der zweiten rhTSH Applikation durchgeführt worden. Die TNM Klassifikation und Histologie sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Patient	TNM ¹⁾	Histologie	Szintigrafie mit Tc99m
R 1	pT ₃ N ₀ M ₀	FTC	Metastasen (lokal, ossär, thorakal)
R 2	pT ₂ N ₀ M ₀	PTC	unauffällig
R 3	pT ₂ N ₀ M ₀	PTC	unauffällig
R 4	pT ₃ N ₀ M ₁	PTC	Metastasen (pulmonal, ossär)

TABELLE 4: TABELLARISCHER ÜBERBLICK DER MIT RHTSH BEHANDELTEN DTC PATIENTEN

¹⁾WHO Klassifikation (3).

4.1.3.3 Patienten mit konnataler Athyreose

Bei diesen Patienten ist in der szintigrafischen und sonografischen Diagnostik mit entsprechender Laborkonstellation bei Primärdiagnose kein Schilddrüsengewebe nachgewiesen worden.

Patient	Alter 2000 [Jahre]	Szintigrafie		Wiederfindung (Normbereich 70-130 %)	
		Tracer	im Alter von [Jahren]	50 ng/ml [%]	1 ng/ml[%]
A1	19	J-123	16	98	97
A2	33	Tc-99m	17	102	89
A3	34	Tc-99m	10	98	92
A4	49	J-131	18	104	94

Tabelle 5: ÜBERSICHT DER ATHYREOTEN PATIENTEN

mit Angabe des verwendeten Tracers und des Alters bei Szintigrafiedurchführung.

4.2 Serum - Thyreoglobulin und - Thyreotropin Bestimmung

Die S-Tg Konzentrationen sind mit DYNOfest[®] Tg-S und dem Tg-pluS[®] Assay mittels IRMA nach Protokoll des Herstellers in der Klinik für Nuklearmedizin der Universität Würzburg bestimmt worden. Die Nachweisbarkeitsgrenze beträgt von DYNOfest[®] Tg-S 0,3 ng/ml und DYNOfest[®] Tg-pluS Assay 0,15 ng/ml.

Die TSH Bestimmung erfolgt mit DYNO[®] TSH 1 nach Angaben des Herstellers mit einer Nachweisgrenze von 0,03 mU/l.

4.3 RNA Isolierung

4.3.1 RNA Isolation nach Chomczynski et al. (122)

Nachdem 5 ml EDTA Blut auf Raumtemperatur abgekühlt sind, wird die RNA nach Chomczynski et al. (122) isoliert. Um eine höhere RNA Qualität zu erhalten wird im Anschluß an die RNA Präzipitation eine zusätzliche säulengestützte RNA Isolation mittels RNeasy[®] Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gesamte RNA wird in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei -80°C aufbewahrt.

4.3.2 Ficoll Gradient und RNEASY Protokoll

5 ml auf Raumtemperatur abgekühltes EDTA Blut wird im Verhältnis 1:2 mit 1 %igem FCS/NaCl Lösung gemischt und anschließend im Verhältnis 1:2 mit Ficoll - Lösung überschichtet. Die Phasentrennung erfolgt in einem Zentrifugationsschritt mit 18000 rpm für 25 min mit Ausschalten der Zentrifugenbremsfunktion. Der erythrozytäre Überstand wird abgesaugt, die leukozytäre Interphase überführt und auf 10 ml mit 1%igem FCS/NaCl aufgefüllt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (18000 rpm, 10 min) wird der Überstand abgesaugt und der Niederschlag in 10 ml 1%igem FCS/NaCl gewaschen. Der Niederschlag wird nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt (18000 rpm, 10 min) in 1 ml 1%igem FCS/NaCl Lösung resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wird nach dem RNeasy® Protokoll präpariert, in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei –80°C aufbewahrt.

4.3.3 RNA Isolation aus peripherem Blut

Aus zweimal 1 ml auf Raumtemperatur abgekühltem EDTA Blut wird Total - RNA nach Angaben der Hersteller mit folgenden RNA Isolationssystemen gewonnen: QIAamp® RNA Blood Mini Kit mit RNase – free DNase Set®, SV Total - RNA Isolation System® und NukleoSpin RNA II Blood Kit®. Die isolierte Gesamt RNA wird in zweimal 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen und bei – 80°C aufbewahrt.

4.3.4 RNA Isolation aus Zelllinien

Aus den FTC 133 und FTC 238 Zelllinien wird mit RNeasy® mini Kit mit RNase free DNase Set® nach Angaben des Herstellers totale RNA präpariert und in 50 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Das RNA Eluat wird aliquotiert und bei – 80°C aufbewahrt.

4.4 RNA Quantitäts- und Qualitätskontrolle

4.4.1 Bestimmung der RNA Konzentration

Die RNA Konzentration wird mit photometrischer Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

4.4.2 Qualitätskontrolle

Die Qualität der RNA wird in einem 1%igem Agarose/Formaldehydgel aus 0,5 g Agarose, 36 ml RNase freiem Wasser, 5 ml 10 × MOPS (s. 3.3), 9 ml 37 %igem Formaldehyd

und 4 µl Ethidiumbromid analysiert. 15 µl RNA Eluat werden in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und in 4,1 µl RNase freiem Wasser resuspendiert. Der Reaktionsansatz mit einem Endvolumen von 20 µl setzt sich aus 0,8 µl 10 × MOPS, 2,6 µl 37%igem Formaldehyd und 7,5 µl deionisiertem Formamid zusammen. Nach Linearisierung der RNA durch Inkubation bei 65°C für 15 min, Abschrecken auf Eis und Zugabe des 5x Probenuffers, erfolgt die Elektrophorese bei 80 V. Ethidiumbromid interkaliert in die RNA, so dass diese unter UV-Licht detektiert werden kann.

4.4.3 DNase Restaktivitätskontrolle

Um eine in der quantitativen PCR störende DNase Restaktivität zu kontrollieren, wird folgender Versuch mit

- QIAamp® RNA Blood Mini Kit® mit/ ohne RNase-free DNase Set®
 - NukleoSpin® RNA II Blood Kit® mit/ ohne DNase®
- durchgeführt.

Gesamtvolumen 20 µl	mit RNA Eluat	ohne RNA Eluat
• First strand Puffer	4 µl	4 µl
• 0,1 M DTT	2 µl	2 µl
• RNA Eluat mit DNase	10 µl	---
• H ₂ O	3 µl	13 µl
• pGl ₂ basic Vektor (300 ng/µl)	1 µl	1 µl

TABELLE 6: REAKTIONSANSATZ DNASE RESTAKTIVITÄTSKONTROLLE

Die Inkubation wird wie folgt variiert:

- keine Inkubation und sofortige Lagerung bei – 20°C
- 95°C für 10 min, anschließend bei – 20°C gelagert
- 37°C > 24 Stunden
- 95°C für 10 min, anschließend 37°C > 24 Stunden

Die Analyse des Plasmids nach 24 stündiger Inkubation bzw. Lagerung erfolgt in einem mit Ethidiumbromid angefärbten, 1,5%igen Agarosegel unter UV Licht mit Hilfe des Videodensitometers.

4.5 Reverse Transkription

Die Gesamt RNA (2,5 µg) gelöst in 25 µl RNase freiem Wasser wird in einem 1,5 µl Eppendorfgefäß in einer Vakuumzentrifuge eingedampft, in 10 µl RNase freiem Wasser resuspendiert und mit 500 ng Oligo-dT_(12-18mere) versetzt. Der Mix wird 10 min bei 70°C

inkubiert und anschließend auf Eis rasch abgekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wird der Reaktionsansatz (Endvolumen 20 µl) bestehend aus 1× First Strand Puffer (Gibco Life-technologies, Eggenstein) 10 mM DTT, 40 IE Rnase Inhibitor (RNaseOUT™) und 1,25 mM dNTP (dCTP, dATP, dGTP, dTTP) hergestellt. Die reverse Transkription wird nach einer initialen Inkubation für 2 min bei 42°C und nach Zugabe von 2 µl der reversen Transkriptase (SuperScript™II) gestartet. Darauf folgt eine Inkubation für 50 min bei 42°C. Die Reaktion wird durch eine abschließende Temperaturerhöhung auf 70°C für 15 min beendet.

Um Kontaminationen während der reversen Transkription ausschließen zu können, wird von jedem Patientenmaterial zusätzlich ein Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase angesetzt und in der nachfolgenden PCR mitgeführt.

4.6 Polymerase – Chain – Reaktion (PCR)

4.6.1 Allgemeines

Die PCR, veröffentlicht von Mullis et al. (114), ist ein Verfahren zur in vitro Amplifikation von spezifischen DNA Fragmenten. Ein Reaktionszyklus gliedert sich in die Denaturierungsphase des DNA Doppelstranges in Einzelstränge bei 95°C, die Annealingphase mit der Bindung der Oligonukleotid Primer bei spezifischen Temperaturen (55 - 62°C) in Abhängigkeit der Primersequenz und die Extensionsphase (72°C), in der die einsträngige DNA unter dNTP Verbrauch und Primerverlängerung durch die Taq-Polymerase zu Doppelsträngen komplementiert wird.

Durch Wiederholung des Reaktionszyklus entsteht eine nahezu exponentielle Amplifikation des DNA Fragmentes, das sogenannte Amplifikationsprodukt. Die Reaktion wird limitiert durch den dNTP, Oligonukleotid und Taq-Polymerase Verbrauch.

4.6.2 Primerübersicht

Primer	Sequenz	Produktlänge	Exon
GAPDH	sense 5'-CCACCCATggCAAATTCATggCA-3'	600 bp	3
	antisense 5'-TCTAgACggCAggTCAggTCCACC-3'		7
TgTal	sense 5'-CTgCTggCTCCACCTTgTTT-3'	160 bp	9
	antisense 5'-CAgggCgTggggCATTTCTT-3'		10
TgTak	sense 5'-gAgAAgAgCCTgTCgCTgAA-3'	167 bp	46
	antisense 5'-CAgCTCACTgAACTCCTTgT-3'		47
Tg _{1/2}	sense 5'-TgTgAgCTgCgAgggAAAC-3'	280 bp	2
	antisense 5'-CgTAgTCCCCTgAATCCTgA-3'		4
Tg _{10/13}	sense 5'-gCTgTTggCAACCTCATCgTggTC-3'	642 bp	6
	antisense 5'-CTgTTTTgCTACTggTCCggCCTT-3'		7

TABELLE 7: PRIMERÜBERSICHT DER KONVENTIONELLEN PCR.

Abkürzungen: GAPDH = Glycerol-aldehyd-6-phosphat-dehydrogenase, TgTak = Thyreoglobulinprimerpaar nach Takano et al. (123), Tg Tal Thyreoglobulinprimerpaar nach Tallini et al.(124).

4.6.3 Reaktionsbedingungen

Nachweis	Primer	Primer Konzentration	Annealing Temperatur	Taq Polymerase	
GAPDH	GAPDH _{1/2}	sense	25 µM	60°C	Qiagen, Hilden
		antisense			
Tg	TgTal	sense	25 µM	55°C	
		antisense			
Tg	TgTak	sense	15 µM	60°C	
		antisense			
Tg	Tg _{1/2}	sense	25 µM	62°C	
		antisense			
Tg	Tg _{10/13}	sense	25 µM	60°C	
		antisense			

TABELLE 8: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER PRIMERPAARE DER KONVENTIONELLEN PCR

Die PCR in einem 50 µl Reaktionsansatz wird nach Protokoll des Herstellers und mit den spezifischen Annealingtemperaturen in dem Thermozykler durchgeführt. Die Zyklenzahl beträgt für GAPDH 24 Zyklen und für Thyreoglobulin (Tg) 40 Zyklen. Die Denaturierungs-, Annealing- und Extensionsphasen sehen im Einzelnen wie folgt aus:

	GAPDH	TgTak	Tg Tal
initiale Denaturierung	95°C, 2 min		
Zyklus	Denaturierung	92°C, 15 s	
	Annealing	60°C, 15 s	Touchdown: 63°C - 55°C, 15 s - 1°C/Zyklus
	Extension	72°C, 30 s	
Abschlussextension	72°C, 10 min		

TABELLE 9: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER KONVENTIONELLEN PCR FÜR GAPDH UND Tg

4.6.4 Agarosegelelektrophorese der PCR Produkte

Zur Analyse der DNA Fragmente werden jeweils 5 bzw. 10 µl des PCR Reaktionsvolumens mit 1,25 bzw. 2,5 µl RNA/DNA Probenpuffer versetzt und auf ein 2%igem Agarosegel aufgetragen. Das Molekulargewicht wird mit Hilfe eines 100 bp DNA Längenmarkers bestimmt. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V und 1x TBE Lösung als Laufpuffer. Durch den interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid werden die DNA Fragmente detektiert.

4.7 TaqMan PCR

4.7.1 Allgemeines

Die konventionelle PCR Analyse von Zielsequenzen besitzt folgende Nachteile:

- Die Post – PCR Analyse mittels Agarosegelelektrophorese geht mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko einher.
- Zeit- und arbeitsaufwendige Agarosegelelektrophorese.
- Es besteht nur ein geringer Automatisierungsgrad.
- Der Probendurchsatz ist limitiert.

Aus diesen Gründen gibt es schon lange Bemühungen einen Assay zu entwickeln, in dem die Amplifikation und der Nachweis des Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß ablaufen; die sogenannte Real - Time- PCR. Ein derartiges PCR Format stellt z. B. die TaqManTM PCR (Perkin Elmer Applied Biosystems, Darmstadt) dar: Dabei wird durch die 5'-3'- Exonukleaseaktivität der Taq – Polymerase, nach zusätzlicher Hybridisierung einer fluorogenen Sonde neben dem Primerpaar, in der Amplifikation ein Fluoreszenzsignal freigesetzt. Die von Lee et al. (125) bei Perkin Elmer Applied Biosystems entwickelten Sonden sind im Folgenden schematisch (Abbildung 5) dargestellt.

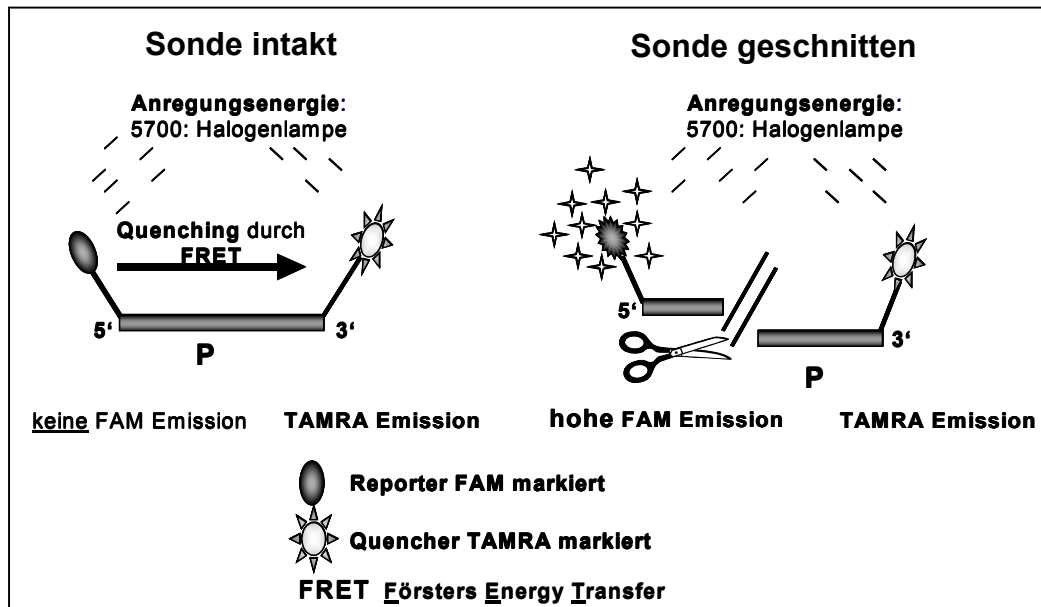


ABBILDUNG 5: PRINZIP DER TAQMAN SONDE.

Bei Anregung der intakten Sonde (P) (linker Bildausschnitt) durch die Halogenlampe unterdrückt der Quencher die Fluoreszenzfreisetzung (FAM) des Reporters durch FRET. Bei geschnittener Sonde (rechter Bildausschnitt) unterbleibt die Unterdrückung des Reportersignals. Abkürzungen: TAMRA = 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, FRET = Försters (Resonanz) Energie Transfer, FAM = 6 - Carboxy-Fluoreszein

Die Hybridisierungssonde ist am 5'-Ende mit einem Reporterfarbstoff, einem Fluoreszein-Derivat wie z.B. 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) markiert, während das 3'-Ende einen Quencherfarbstoff, ein Rhodaminderivat, meist 6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin (TAMRA) trägt. Zusätzlich ist die Sonde durch einen Phosphatrest blockiert. Erfährt die intakte Sonde eine Anregung bei 488 nm durch die Halogenlampe, unterdrückt der Quencher aufgrund der räumlichen Nähe über einen Förster Resonanz Energy Transfer (FRET) die Reporterfluoreszenzfreisetzung.

Die Sonde hybridisiert während der PCR an dem Matrizenstrang der Zielsequenz zwischen der 5'- und 3'-Primerposition. In der Extensionsphase der PCR trifft die Taq Polymerase auf die fluorogene Sonde und beginnt diese zu verdrängen mit der Folge einer veränderten Sekundärstruktur. Die entstehende y-förmige Sekundärstruktur aktiviert die 5'-Exonuklease der Taq Polymerase mit nachfolgender Sondenhydrolyse. Die daraus resultierende räumliche Trennung von Reporter und Quencher unterbricht den FRET, so dass der Reporter ein Fluoreszenzsignal freisetzt, das gemessen werden kann. Die folgende Abbildung 6 zeigt das Sondenverhalten in der Übersicht während der PCR.

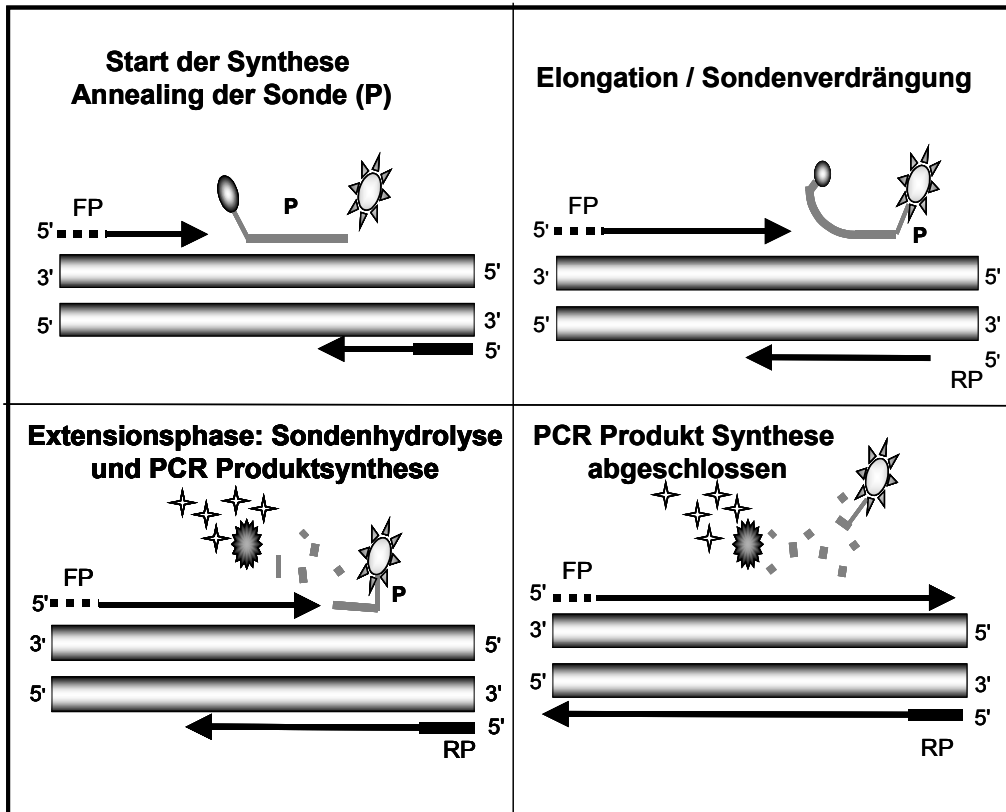


ABBILDUNG 6: TAQMAN SONDE WÄHREND DER PCR PHASEN.

Die erste Phase in der Real-time PCR besteht in dem Binden der Sonde und der Primer (forward Primer, reverse Primer) an der Zielsequenz zwischen 5' und 3' Primerposition. In der nachfolgenden Extensionsphase hydrolysiert die 5' Exonuklease der Taq Polymerase die Sonde, so dass der Quencher das Reportersignal nicht länger unterdrücken kann. Abkürzungen: FP = Forward Primer, RP = Reverse Primer, P = Sonde.

4.7.2 Primer und Sonde

Als Real - Time- PCR Kontrolle wird in diesem Assay für Tg mRNA das Housekeeping-Gen GAPDH verwendet. Das Primerpaar und die Sonde entstammen dem Predeveloped TaqMan[®] Assays (P.E: Applied Biosystems, Darmstadt). Die Thyreoglobulin Primer und die FAM markierte Sonde sind der Literatur (123) entnommen und in der folgenden Tabelle näher charakterisiert.

Primer	Sequenz	Exon
TgTak _{sense}	5'-gAgAAgAgCCTgTCgCTgAA-3'	46
TgTak _{antisense}	5'-CagCTCACTgAACTCCTTgT-3'	47
Tg P	5'-FAM-TgAgTTCTCACggAAgTACCCA- 3' TAMRA	

TABELLE 10: THYREOGLOBULIN (TG) PRIMER UND SONDE (P) DER REAL – TIME PCR.

Das Tg Primerpaar und die FAM markierte Sonde sind mit Primersequenz und cDNA Position angegeben (123).

4.7.3 Reaktionsansatz

Die optimale Primerkonzentration wird mittels des standardisierten Protokolls P.E: Applied Biosystems, Darmstadt ermittelt.

4.7.4 Reaktionsbedingungen

Die folgenden Reaktionsbedingungen der Zwei-Schritt-PCR entsprechen dem Standardprotokoll von PE Biosystems.

Temperaturen und Zeiten

Initiale Denaturierung		95°C, 10 min
Zyklus	Denaturierung	95°C, 15 s
	Annealing/ Extension	60°C, 1 min
Zyklenzahl	40	

TABELLE 11: REAKTIONSBEDINGUNGEN DER REAL - TIME – PCR.

4.7.5 Standardkurve

Zur relativen Quantifizierung der Tg - zur GAPDH - mRNA wird eine Verdünnungsreihe aus der Total - RNA dreier Struma Feinnadelaspirationsbiopsien (FNAB) generiert mit dem Ziel, die Patientenproben mit unbekannter RNA Menge und zwischen den Einzelexperimenten vergleichen zu können. Hierfür werden jeweils 10 µg Total - RNA nach photometrischer Bestimmung gemischt und revers transkribiert. Anschließend wird schrittweise über fünf Stufen, d.h. von 1 pg bis 10000 pg, die synthetisierte cDNA pro Mikroliter verdünnt. Die einzelnen Verdünnungsstufen werden aliquotiert und bei – 20°C gelagert, so dass in jedem Einzelexperiment die gleiche Standardkurve als Vergleich dient. Exemplarisch ist die Standardkurve eines Einzelperiments des Real - Time - PCR Assays für Tg - und GAPDH - mRNA in Abbildung 7 dargestellt.

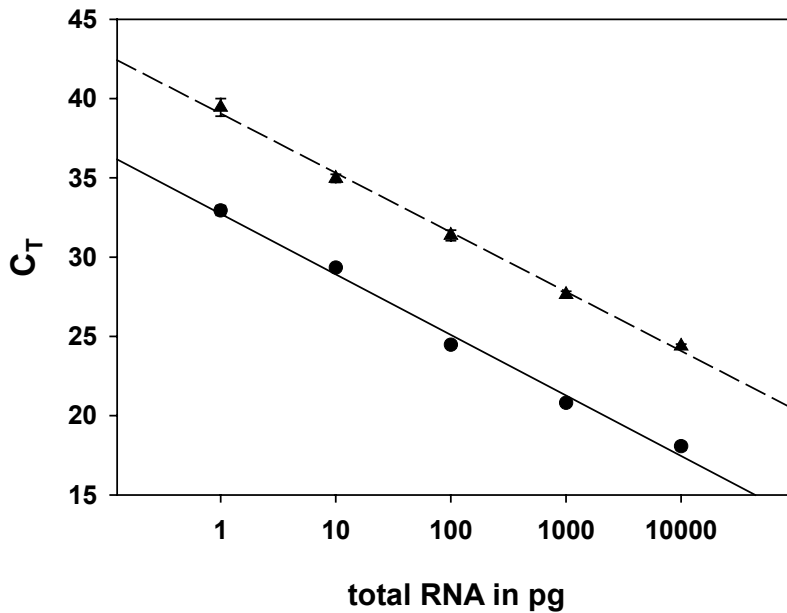


ABBILDUNG 7: STANDARDKURVE VON GAPDH - (▲) UND Tg - (●) mRNA

Dargestellt ist der C_T Wert (siehe Material und Methoden) versus der eingesetzten Gesamt-RNA (pg) des Strumamixes. Die Steigung beträgt in der abgebildeten Standardkurve $-3,5$ für Tg - und GAPDH - mRNA entsprechend einer Korrelation von $-0,99$. In allen Einzelexperimenten liegt die Steigung zwischen $-3,5$ bis $-3,8$.

4.8 Northern Blot

Die Expressionsanalyse von Tg mRNA wird mit Hilfe des Human Multiple Tissue Expression Array 2[®], einem Dot Blotting Assay, nach Protokoll des Anbieters durchgeführt. Als Sonde dient das PCR Amplifikat TgTak mit 167 bp, das zuvor mit dem Random Primed DNA Labeling Kit[®] nach Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) radioaktiv mit dem beta- emittierenden Radioisotop [³²P] markiert wird. Die Membran wird zunächst kurz in 2× SSC (s. 3.3) geschwenkt, anschließend in die Prähybridisierungslösung (s. 3.3) überführt und nachfolgend bei 42°C für mindestens drei Stunden im Hybridisierungsofen inkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten cDNA-Sonde [³²P] erfolgt die Hybridisierung bei 42°C über Nacht. Der Hybridisierung schliessen sich folgende Waschschriffe an:

- 42°C für 30 min. mit 6× SSPE/ 0,3% SDS,
- 42°C für 30 min. mit 2× SSPE/ 0,3% SDS
- 42°C für 30 min. mit 1× SSPE/ 0,3% SDS
- 55°C für 30 min. mit 0,3 × SSPE/ 0,3% SDS

- 65°C für 30 min. mit 0,3 × SSPE/ 0,3% SDS

Danach wird der Blot kurz in 2× SSPE/ 0,3% SDS geschwenkt und in eine Folie eingeschweißt. Nach zweitägigem Exponieren einer strahlenempfindlichen Membran mit der radioaktiv markierten cDNA Sonde [³²P] wird der Blot mit Hilfe des Phosphoimagers analysiert. Der Blot wird zusätzlich in Kunststoffolie eingeschweisst und bei –80°C in einer Autoradiographiekassette mit Verstärkerfolie auf einen Kodak X-OMAT- Film exponiert.