

5 Ergebnisse

5.1 Ergebnisse der Etablierung eines Real - Time - PCR Assays

5.1.1 Vergleich der RNA Extraktionsmethoden

Die RNA Isolationsverfahren nach Chomczynski et al. (122), Ficoll Gradient mit RNeasy® Protokoll und QIAamp® RNA Blood Mini Kit werden in Bezug auf das eingesetzte Blutvolumen, den Zeitaufwand, die isolierte RNA Konzentration und die RNA Qualität der isolierten RNA verglichen.

Methode	Zeitaufwand in min	Total - RNA in µg/50 µl/ ml Blut	Qualität
Ficoll Gradient und RNeasy	142	0,62	Kein Unterschied
Chomczynski et al. (122)	250	1,4	
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	60	5,0	

TABELLE 12: GEGENÜBERSTELLUNG DER RNA ISOLATIONSMETHODEN.

Aufgrund dieser Ergebnisse wird im weiteren Verlauf der Arbeit die Gesamt RNA mittels QIAamp® RNA Blood Mini Kit isoliert, da dieser in allen Kriterien überlegen ist. Eine zusätzlich durchgeführte DNase Behandlung erhöht die cDNA Qualität (nicht gezeigt), da genomische DNA Kontaminationen effizient entfernt werden. Die RNA Integrität wird exemplarisch an einzelnen Proben in denaturierenden Formaldehydgelen mittels Elektrophorese überprüft und ergibt eine gute RNA Qualität der Proben.

5.1.2 DNase Restaktivitätskontrolle

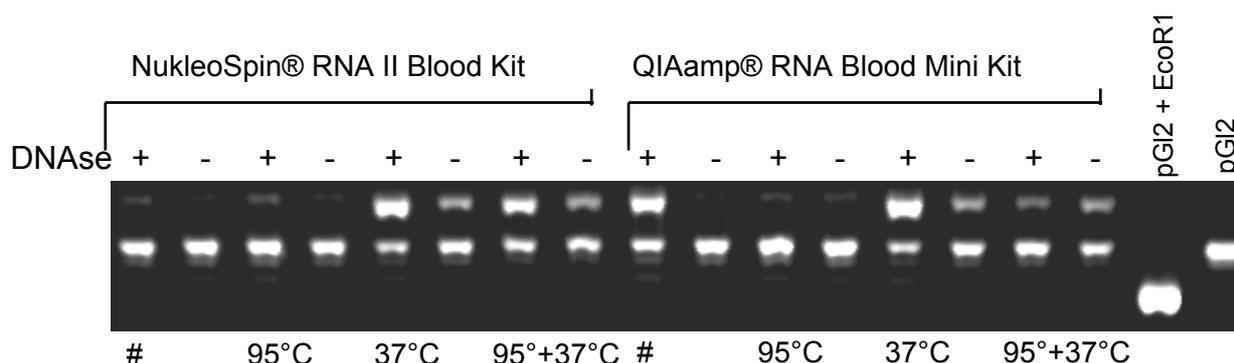


ABBILDUNG 8: RESTAKTIVITÄTSKONTROLLE DER DNASE IM RNA ELUAT.

Dem RNA Eluat (NukleoSpin® RNA II Blood Kit, QIAamp® RNA Blood Mini Kit) wird Plasmid (pGL2 nativ und mit EcoR1 geschnitten) im Sinne einer Integritätskontrolle anstelle von cDNA zugesetzt. Anschließend erfolgt die Analyse in einem mit Ethidiumbromid angefärbten 1,5 %igem Agarosegel. Abkürzungen: DNase +/- = mit/ ohne isolierte RNA, d.h. mit/ ohne DNase, pGL2 = Plasmid, pGL2 + EcoR1 = mit dem Restriktionsenzym EcoR1 geschnittenes Plasmid, # = sofort nach Isolation bei -23°C aufbewahrt, 95° = erhitzt auf 95°C anschließend bei -23°C , 37°C = inkubiert bei 37°C , $95^{\circ}+37^{\circ}$ = erhitzt auf 95°C anschließend inkubiert bei 37°C .

Um dem theoretisch möglichen Abbau der cDNA in der reversen Transkription und in der anschließenden PCR durch eine Restaktivität der im RNA Eluat enthaltenen DNase nachzugehen, ist ein Modellversuch durchgeführt worden. RNA ist mit zwei verschiedenen (NukleoSpin® RNA II Blood Kit, QIAamp® RNA Blood Mini Kit) matrixgestützten Präparationsverfahren mit DNase Protokoll nach Angaben der Hersteller isoliert worden. Anschließend ist dem gewonnenen RNA Eluat 300 ng pGL2 Plasmid Vektor zugesetzt worden. Wird die Integrität des Plasmids nach durchgeführtem DNase Protokoll ohne näher auf die verschiedenen Temperaturen einzugehen verglichen, fällt die Signalstärke niedriger aus als in der unbehandelten Plasmidprobe und es ist eine Doppelbande als Zeichen eines Plasmid- bzw. DNA- Abbaus zu erkennen. Die höchste Plasmid Degradation als Marker eines möglichen cDNA Abbaus ist nach Inkubation bei 37°C zu beobachten, was auch dem Temperaturoptimum der DNase entspricht. Doch selbst nach einer Hitzeinaktivierung bei 95°C mit anschließender Inkubation bei 37°C ist die DNase weiterhin vermutlich durch eine Enzymrenaturierung in der Lage das zugesetzte Plasmid abzubauen. Anhand dieses Modellversuchs mit der Analyse des pGL2 basic Abbau durch die DNase, ist eine geringere DNase Restaktivität im QIAamp® RNA Blood Mini Kit verglichen mit NukleoSpin® RNA II Blood Kit gezeigt worden. Übertragen auf die Fragestellung und das in vivo System, kann auch von einem geringeren Abbau

der Tg bzw. GAPDH cDNA nach RNA Isolation mittels QIAamp® RNA Blood Mini Kit ausgegangen werden, so dass dieser RNA Isolationsmethode ausgewählt wurde.

5.1.3 Reverse Transkription

Eine erfolgreiche reverse Transkription beeinflusst die Sensitivität des PCR Assays nicht unerheblich, so dass auch hier eine Protokolloptimierung entsprechend der Fragestellung sinnvoll ist. Im Literaturvergleich favorisieren einige Arbeitsgruppen den Einsatz von oligo-dT Primern, die an den Poly-A Stretch der mRNA binden, so dass eine reverse Transkription vor allem der mRNA erfolgt. Andere Arbeitsgruppen sehen einen Vorteil in den sogenannten random Hexamer Primern, die nicht zwischen ribosomaler und mitochondrialer bzw. t und mRNA unterscheiden, mit der Folge einer höheren Gesamt RNA Konzentration, die jedoch unspezifischer zusammengesetzt ist. Im Verlauf dieser Arbeit weist die reverse Transkription mit random Hexamer Primern eine höhere Transkriptionsrate in der abschließenden Analyse spezifischer amplifizierter DNA (Ergebnisse nicht dargestellt) auf. Aufgrund der geringen Probenvolumina der Patienten muss jedoch auf eine erneute reverse Transkription mit random Hexamer Primern verzichtet werden.

5.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) für Thyreoglobulin (Tg) mRNA

5.2.1 Primerspezifität

Die Nukleotidfolge der in dieser Arbeit verwendeten Primer entspricht den veröffentlichten mRNA Sequenzen von GAPDH und Tg in der Genbank (126). Ferner entsprechen die Amplifikationsprodukte der Tg und GAPDH cDNA in der PCR Analyse in allen durchgeführten in vitro und in vivo Experimenten den erwarteten Produktlängen. Der durchgeführte Abgleich (BLAST Search) der Primersequenzen mit dem publizierten humanen Transkriptom (126) ergibt die geforderte Spezifität für den Nachweis der Tg mRNA. Hinsichtlich alternativen Spleißens innerhalb der amplifizierten Tg mRNA Sequenz weisen Mason et al. (118) zwar alternatives Spleißen in Exon 46 in drei von 35 cDNA Klonen von zwei Verwandten mit Pendred Syndrom nach, jedoch ergeben sich in dieser Studie in 150 Tg cDNA Klonen von sieben Patienten mit anderen Schilddrüsenerkrankungen keine Hinweise auf Spleißvarianten. Hinweise, dass in DTC die Ergebnisse Mason et al. (118) relevant sind ergeben sich in der vorliegenden Arbeit, in der keine Proben von Pendred Syndromen untersucht werden, nicht.

5.2.3 Primersensitivität

In einem Modellversuch für die Detektion von thyreoidalen Tumorzellen im peripheren Blut mittels PCR ist die Primersensitivität verschiedener Primerpaare (Tg₁₀₋₁₃, Tg $\frac{1}{2}$ und Tg Tal) getestet worden. Nach der venösen Punktion ist ein ml Blut mit FTC133 Zellen ($4,33 \times 10^{-3}$) gemischt worden, um das Tumorzellverhalten zu simulieren. Ausgangspunkt ist dabei, dass Tumorzellen sich im Serum ähnlich wie die korpuskulären Blutbestandteile verhalten. Die Isolation der Gesamt RNA der korpuskulären Blutzellen v.a. der Leukozytenfraktion und der Kulturzellen (FTC133) erfolgt nach Lyse der Erythrozytenfraktion mit dem kommerziell erworbenen QIAamp® RNA Blood Mini Kit und die reverse Transkription mit oligo-dT-Primern.

In der Zellkultur FTC- 133 als in vitro Modell (Abbildung 9) besitzt das Primerpaar Tg Tal die höchste Signalstärke, d. h. Sensitivität. Die nachgewiesenen spezifischen PCR Produkte aller Primer entsprechen den erwarteten Produktlängen von Tg₁₀₋₁₃ (642 bp), Tg_{1/2} (280 bp) und TgTal (160 bp). Die Negativkontrollen (RT –) ergeben keinen Hinweis auf eine Kontamination durch genomische und/oder spezifische DNA.

Zur Evaluation der Primersensitivität (Abbildung 10) in vivo dient die revers transkribierte Gesamt RNA der athyreoten Patienten A1 - A4, da hier von einer niedrigen Tg mRNA Expression auszugehen ist. Das Primerpaar mit der höchsten Sensitivität in vitro Tg Tal wird dabei mit einem weiteren Primerpaar der Literatur Tg Tak (123) verglichen. Das Primerpaar TgTak weist die höchste Signalintensität und damit Sensitivität auf. Anhalt einer spezifischen und/oder genomischen DNA Kontamination ergeben sich bei intronspannenden Primerdesign und fehlendem PCR Produkt in RT- nicht. Auf die PCR Ergebnisse der athyreoten Patienten und deren Bedeutung wird im nachfolgenden Kapitel 6.2.2.2 näher eingegangen.

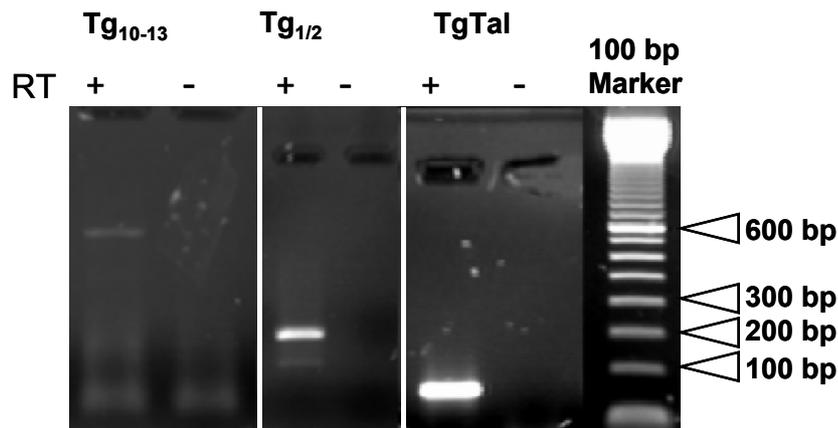


ABBILDUNG 9: VERGLEICH DER Tg mRNA PRIMER SENSITIVITÄT IM MODELL.

Die Amplifikationsprodukte der Primerpaare Tg₁₀₋₁₃, Tg_{1/2}, und TgTal entsprechen den erwarteten Produktlängen von Tg₁₀₋₁₃ (642 bp), Tg_{1/2} (280 bp) und TgTal (160 bp). Das Primerpaar Tg Tal besitzt die stärkste Signalintensität bei gleicher eingesetzter cDNA Menge. Weitere Erläuterungen siehe Text. Abkürzungen: RT + = reverse Transkription erfolgt, RT - = Negativkontrolle, bp = Basenpaare, 100 bp Marker = Molekulargewichtsmarker

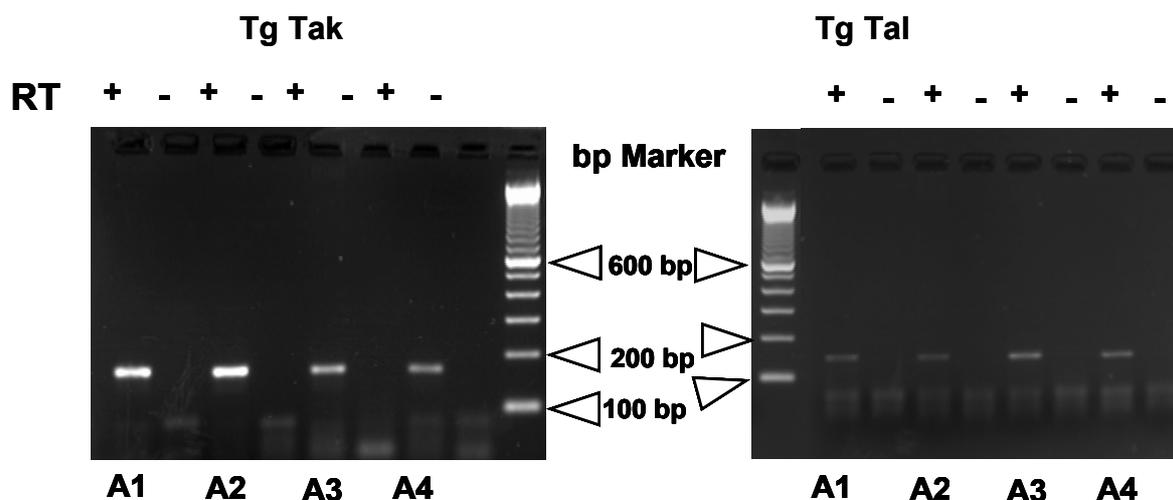


ABBILDUNG 10: VERGLEICH DER THYROGLOBULIN PRIMERSENSITIVITÄT IM IN VIVO SYSTEM.

Die Banden von TgTal (linkes Bild) und TgTak (rechtes Bild) entsprechen den erwarteten Produktlängen von 160 bp und 167 bp. Das Primerpaar (123) ist im Vergleich zu TgTal (124) bei gleicher cDNA Menge sensitiver. In den Negativkontrollen (RT-) erfolgt keine reverse Transkription. Abkürzungen: bp = Basenpaare, RT + = reverse Transkription erfolgt, RT - = Negativkontrolle, bp Marker = 100 bp Molekulargewichtsmarker.

5.3 Tg mRNA Expression im klinischen Probenmaterial

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der konventionellen und relativ quantitativen Real – Time - PCR für Tg mRNA im Einzelnen vorgestellt. Um einen Vergleich einerseits innerhalb der Patientengruppe und andererseits zwischen den verschiedenen

Patientengruppen (athyreote Patienten, mit bzw. ohne rhTSH behandelte DTC Patienten) zu ermöglichen, wird die Tg mRNA auf die mRNA des Housekeepinggens GAPDH normiert. In jedem Tg Assay Lauf wird eine identische Standardkurve durch vorherige Aliquotierung (s. 4.7.5) verwendet.

5.3.1 Kontrollgruppe

Zur Kontrolle eines erfolgreichen Einzelexperiments des etablierten Real - Time - PCR Assays für Tg mRNA im peripheren Blut dient ein Mix von Total - RNA von zehn gesunden Probanden i. S. einer Positivprobe. Mit Hilfe der Real - Time- PCR wird die Tg mRNA relativ zu dem Housekeepinggen GAPDH quantifiziert und ein Konzentrationsverhältnis von $14,9 \times 10^{-6}$ Tg/GAPDH mRNA ermittelt.

5.3.2 Tg mRNA Expression in konnatal athyreoten Patienten

In der Etablierungsphase des PCR Assays für Tg mRNA im peripheren Blut taucht immer wieder das Problem einer geeigneten Negativkontrolle auf: Weder gesunde Probanden noch thyreoidektomierte Patienten halten einer strengen Prüfung als „echte“ Negativkontrolle stand. In Gesunden ist von einer diskontinuierlichen Loslösung einzelner Thyreozyten im Rahmen des normalen Zellturnovers auszugehen, wie der Nachweis von Tg mRNA in verschiedenen gesunden Probanden in der Vorphase der Etablierung des PCR Assays nahe legt. In thyreodektomierten DTC Patienten als Negativkontrolle bleibt immer die Möglichkeit von postoperativen Schilddrüsenrestgewebe. Dem gegenüber ist in konnatal athyreoten Patienten ein funktionsfähiges Schilddrüsenrestgewebe bei fehlendem S-Tg, unauffälliger Sonografie, und negativer Schilddrüsenzintigrafie nahezu ausgeschlossen (Tabelle 5). Berücksichtigt man bei diesen vier athyreoten Patienten die Tatsache, dass eine Schilddrüsenhormonsubstitution bereits über 19 – 49 Jahre erfolgt, ist von einer Inaktivitätsinvolution des theoretischen postpartalen Schilddrüsenrestgewebes auszugehen (persönlich Prof. Dr. med. C. Reiners, Würzburg). Somit kommen die konnatal athyreoten Patienten einer idealen Negativkontrolle für die Bestimmung von S-Tg und Tg mRNA im peripheren Blut am nächsten.

Zum Zeitpunkt der Blutentnahme liegt in allen Patienten (A1 - A4) eine euthyreote Stoffwechsellage unter T4 Substitution mit TSH Konzentrationen im Normbereich (0,3-4 mU/l) vor. S-Tg (DYNOtest[®] Tg) ist in A1 bis A4 bei ungestörter Wiederfindung (89 - 97% von 1ng/ml) nicht nachweisbar.

Zur Überprüfung einer erfolgreich gelungenen RNA Isolierung und cDNA Synthese wird das Probenmaterial auf die Expression von GAPDH mRNA untersucht. Dabei wird 1/10 des PCR Ansatzes in einem Ethidiumbromidgel analysiert. In allen Proben A1 - A4 ist das spezifische 600 bp GAPDH Produkt nachweisbar (Abbildung 12). Die Analyse der konventionellen PCR für Tg mRNA weist überraschenderweise in allen vier S-Tg negativen Patienten das spezifische intronspannende 167 bp lange Tg Amplifikat nach. Hinweise auf eine Probenkontamination durch genomische und/oder spezifische DNA liegen nicht vor (s. Abbildung 11).

Aufgrund des Tg mRNA Nachweises in A1 – A4 in der konventionellen PCR wird anschließend eine erneute S-Tg Bestimmung mit dem sensitiveren DYNOfest® Tg-pluS Assay durchgeführt. Dieser Immunoassay ermittelt messbare S-Tg Konzentrationen zwischen 0,05 - 0,33 ng/ml für die konnatal athyreoten Patienten. Die relative Quantifizierung der Tg mRNA bezogen auf GAPDH mRNA ergibt Werte zwischen $3,66 - 27,8 \times 10^{-6}$ Tg/GAPDH mRNA. In drei athyreoten Patienten (A1 - A3) liegen die Tg mRNA Konzentrationen unter denen der Kontrollgruppe ($14,9 \times 10^{-6}$), hingegen A4 eine höhere Expressionsrate mit $27,8 \times 10^{-6}$ Tg/GAPDH mRNA im Vergleich aufweist. In den vier Patienten ist weder eine proportionale noch antiproportionale Korrelation zwischen S-Tg und Tg mRNA herzustellen. Grafisch und tabellarisch sind die Ergebnisse des Immunoassays und der PCR in Abbildung 11 und 12 sowie in der Tabelle 13 zusammengestellt.

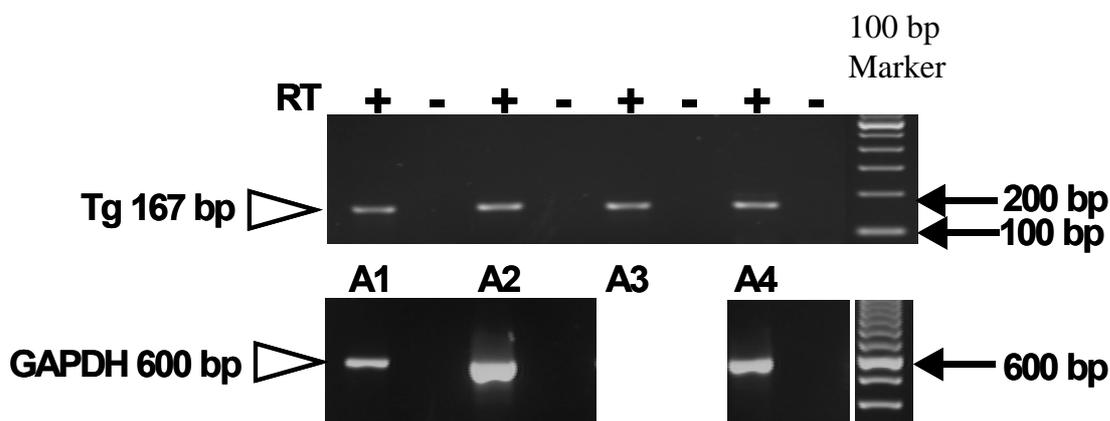


ABBILDUNG 11: KONVENTIONELLE PCR FÜR Tg UND GAPDH mRNA VON A1 - A4.

Die Gelelektrophorese zeigt das erwartete spezifische 167 bp Tg und 600 bp umfassende GAPDH PCR Produkt von A1 bis A4. Hinweise einer Kontamination durch spezifische bzw. genomische DNA ergeben sich bei unauffälligen Negativkontrollen (RT-) nicht. Abkürzungen: A1 - A4 = athyreote Patienten 1 - 4, RT + = reverse Transkription erfolgt, RT- = reverse Transkription nicht erfolgt, d.h. Negativkontrolle, bp = Basenpaare, 100 bp Marker = 100 bp Molekulargewichtsmarker.

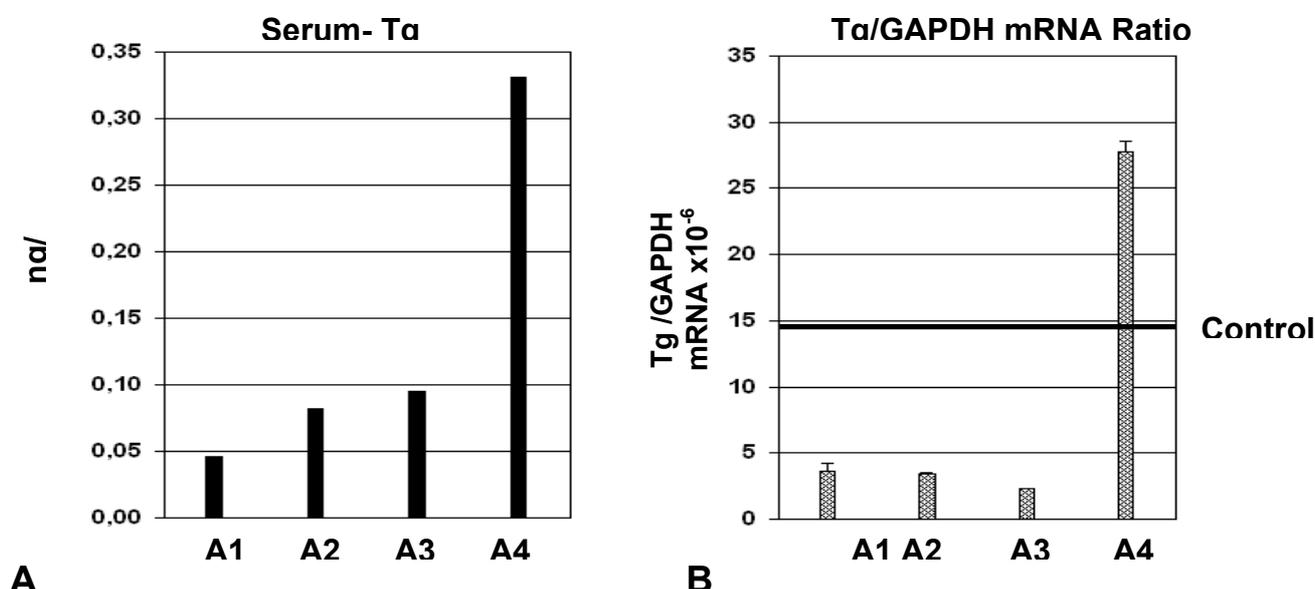


ABBILDUNG 12: S-Tg UND Tg/GAPDH mRNA KONNATAL ATHYREOTER PATIENTEN.

A Serum Tg Bestimmung mit DYNOfest Tg-pluS Assay. **B** Tg mRNA relativ quantifiziert zu GAPDH mRNA [$\times 10^{-6}$]. Die TSH Werte liegen in A1 - A4 zum Zeitpunkt der Blutentnahme im Normbereich (0,3 - 4 mU/l). Bei A1 - A3 liegen die Tg/GAPDH mRNA unter dem Wert der Kontrolle, A 4 weist einen höheren Wert verglichen mit \bar{c} auf. Abkürzungen: \bar{c} = Referenzlinie der 10 gepoolten Blutproben Gesunder, A1 - A4 = athyreote Patienten, *Standardfehler $\times 10^{-6}$.

Patient	S-Tg [ng/ml]	Tg/GAPDH mRNA $\times 10^{-6}$	Standardfehler $\times 10^{-6}$
A 1	0,05	3,7	0,52
A 2	0,08	3,4	0,12
A 3	0,1	2,3	0,08
A 4	0,3	27,8	0,8

TABELLE 13: ÜBERSICHT DER S-Tg UND Tg/GAPDH mRNA WERTE DER VIER PATIENTEN MIT KONNATALER ATHYREOSE (A1- A4).

5.3.3 Tg mRNA Expression bei rhTSH behandelten Patienten

Ein Real – Time - PCR Assay muss in der Lage sein, Tg mRNA Konzentrationsänderungen z. B. im Rahmen eines Tumorprogresses anzuzeigen, d. h. über eine ausreichende Dynamik verfügen. Um diese Fähigkeit des etablierten Real – Time - PCR Assays, Tg mRNA Konzentrationsänderungen anzuzeigen, zu beurteilen, werden die Tg Konzentrationen vor und nach rhTSH Stimulation in vier Patienten mit DTC (R1 - 4) im Rahmen der Tumornachsorge untersucht. So werden für jeden Patienten Tg/GAPDH

mRNA und S-Tg Konzentrationen bei niedriger und hoher TSH Konzentration im Serum ermittelt, die in Abbildung 13 und Tabelle 14 dargestellt sind.

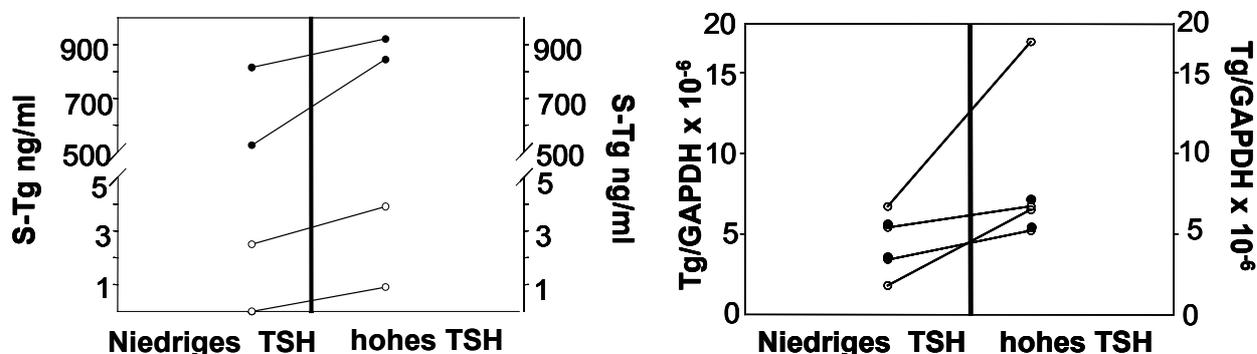


ABBILDUNG 13: S-Tg UND Tg/GAPDH mRNA WERTE VOR UND NACH RHTSH GABE IN DTC
A S-Tg Werte (ng/ml) **B** Tg mRNA relativ quantifiziert zu GAPDH mRNA [$\times 10^{-6}$] bei hohen und niedrigen Serum TSH Werten in vier DTC Patienten.

Patient	S-Tg [ng/ml]		S-TSH [mU/l]		Tg/GAPDH mRNA $\times 10^{-6}$				TNM ¹⁾	Histologie	Szintigrafie
	vor	nach	vor	nach	vor	*	nach	*			
									rhTSH Gabe		
R 1	815	921	125	136	5,4	0,3	6,7	0,1	pT ₃ N ₀ M ₀	FTC	Metastasen
R 4	525	845	0,03	138	3,4	0,2	5,2	0,7	pT ₃ N ₀ M ₁	PTC	Metastasen
R 2	2,5	3,9	17,4	113,7	1,8	0,1	6,5	0,1	pT ₂ N ₀ M ₀	PTC	unauffällig
R 3	0	0,9	87,3	93,5	6,7	0,1	16,9	0,3	pT ₂ N ₀ M ₀	PTC	unauffällig

TABELLE 14: S-Tg, TSH UND Tg/GAPDH mRNA WERTE VOR UND NACH RHTSH STIMULATION.

In R1, R2 und R3 sind die S-Tg und Tg/GAPDH mRNA Werte vor und nach der zweiten und in R4 nach der ersten rhTSH von zwei rhTSH Gaben (0,9 mg/Tag) ermittelt worden. Die S-Tg bzw. TSH Konzentrationen sind mit dem DYNObest® Tg-pluS Assay bzw. mit DYNObest TSH 1 bestimmt worden. Die Nachweisbarkeitsgrenzen liegen bei 0,2 ng/ml für S-Tg und für 0,3 mU/l für TSH. Legende: ¹⁾TNM nach WHO Klassifikation (3); * Standardfehler $\times 10^{-6}$.

Die Patienten R1 und R4 mit aktueller Metastasierung weisen höhere S-Tg Konzentrationen als die Patienten R2 und R3 ohne Hinweise auf Metastasen vor rhTSH Stimulation auf. S-Tg ist in R1, R2 und R4 vor und auch nach, hingegen in R3 nur nach rhTSH Stimulation messbar. Im Gegensatz dazu kann Tg/GAPDH mRNA in allen vier Patienten bei niedrigen TSH Konzentrationen nachgewiesen werden. Nach rhTSH Stimulation sind die gemessenen Tg Werte in allen vier Patienten erhöht (Abbildung 13, Tabelle 14). Die Tg/GAPDH mRNA Werte liegen zwischen $5,8 \times 10^{-6}$ und $16,9 \times 10^{-6}$ und somit

unter dem Wert der Kontrollgruppe. Es liegt keine Korrelation zwischen Tg/GAPDH mRNA und der Metastasierung vor; die Patienten R2 und R3 ohne bekannte Metastasierung zeigen die höchste bzw. niedrigste, die Patienten R1 und R4 dagegen eine mittlere Tg/GAPDH mRNA Konzentration nach rhTSH Stimulation. Die beobachtete S-Tg Erhöhung nach Stimulation auf das 1,1 fache bei R1, 1,6 fache bei R4, 1,5 fache bei R2 und 0,9 fache bei R3 des S-Tg Ausgangswertes, spiegelt sich nicht auf mRNA Ebene mit dem 1,22 fachen für R1, 1,5 fachen für R4, 3,5 für R2 und dem 2,5 fachen für R3 des Tg/GAPDH mRNA Anstiegs wieder. Eine retrospektive Untersuchung der Patienten im Rahmen der Tumornachsorge von 2000 bis 2003 ergibt im weiteren Krankheitsverlauf keine Korrelation zwischen Tg/GAPDH mRNA Werten und klinischem Verlauf. Festzuhalten bleibt, dass eine rhTSH Stimulation in allen Patienten zu einer S-Tg und einer Tg mRNA Konzentrationserhöhung führt.

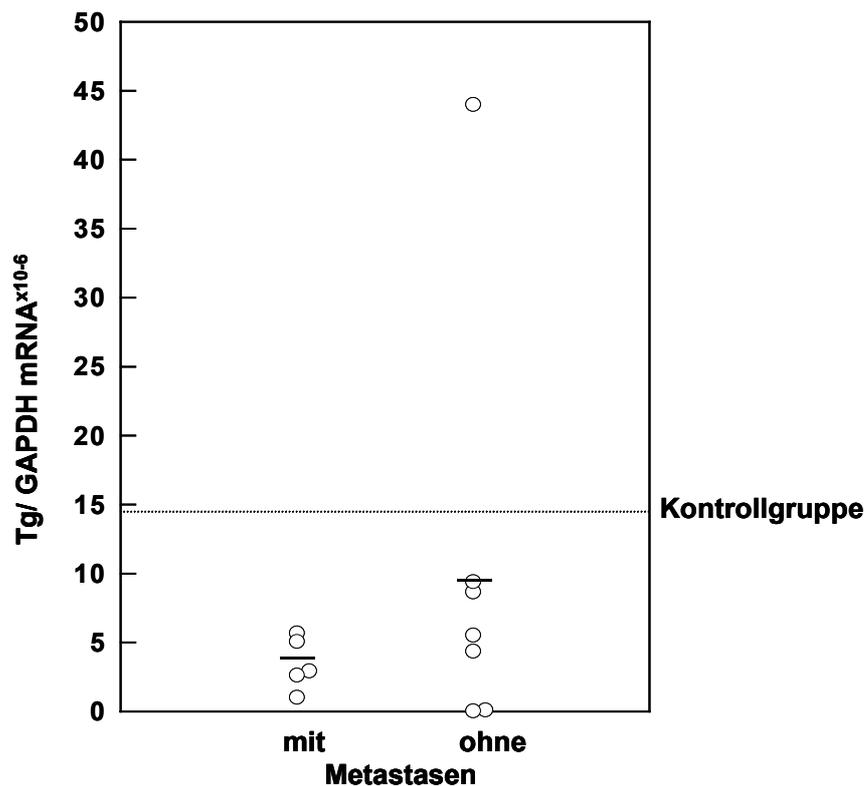


ABBILDUNG 14: REAL - TIME- PCR DER DTC PATIENTEN NACH KLINISCHEN STADIEN.

Die DTC Patienten (n = 12) sind unterteilt in Patienten mit und ohne Metastasen in der Bildgebung und S-Tg Bestimmung zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Mittelwerte der beiden Subgruppen sind durch Balken bzw. der Kontrollgruppe durch eine Linie gekennzeichnet.

TABELLE 15: REAL – TIME - PCR ERGEBNISSE UND BEFUNDE DER DTC - NACHSORGE.

Die DTC Patienten (n = 12) sind unterteilt in Patienten mit (M1-M5) bzw. ohne Metastasierung (N1-N7) zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Neben der Paraklinik (TSH, S-Tg, Bildgebung) sind die Tg/GAPDH mRNA Werte, die Histologie, das klinische Stadium (TNM-, MACIS-, AMES - Klassifikation) und der Krankheitsverlauf aufgeführt und nach ansteigenden Tg/GAPDH mRNA Werten mit Standardfehler (*) in $\times 10^{-6}$ sortiert.

- ¹⁾M1 – M5 Metastasen und / oder Lokalrezidiv nachgewiesen
- ²⁾N1 – N7 keine Metastasen nachgewiesen
- ³⁾S-Tg unter der Nachweisgrenze <0,3 ng/ml
- ⁴⁾ lokal = Lokalrezidiv bzw. peripher = periphere Metastasierung
- ⁵⁾ Positionentomografie
- ⁶⁾TNM nach WHO Klassifikation (3)
- ⁷⁾MACIS Klassifikation für PTC (2)
- ⁸⁾AMES Klassifikation für FTC (1)

5.3.4 Tg/GAPDH mRNA Expression in DTC Patienten

Patient	TSH [mU/l]	DYNOfest S-Tg [ng/ml]	Tg/GAPDH mRNA bzw. * x 10 ⁻⁶		TNM ⁶⁾	MACIS ⁷⁾ AMES ⁸⁾	Histologie	Nachsorge 2000	Nachsorge 2003
								Szintigrafie, Sonografie, und S-Tg	Computertomografie
M1 ¹⁾	0,04	352	1,0	0,2	pT _x N ₀ M ₀	Unbekannt ⁷⁾	FTC	Lokal und peripher ⁴⁾	Tod
M2	> 80	39	2,6	0,5	pT ₃ N ₀ M ₀	low risk ⁸⁾	FOTC	unauffällig inklusive PET ⁵⁾	Unauffällig ⁴⁾
M3	> 80	108	2,9	0,2	pT _{4a} N _{1b} M ₀	7,1 ⁷⁾	PTC	unauffällig inklusive PET ⁵⁾	Unauffällig ⁴⁾
M4	0,4	32	5,1	0,1	pT ₃ N ₀ M ₁	12,09 ⁷⁾	PTC	Lokal und peripher ⁴⁾	Verlauf unbekannt
M5	< 0,03	63358	5,6	1,1	pT _{4a} N ₀ M ₁	high risk ⁸⁾	FOTC	Lokal und peripher ⁴⁾	Tod
N1 ²⁾	< 0,03	unauffällig ³⁾	0,04	0	pT _{2a} N ₀ M ₀	low risk ⁸⁾	FOTC	unauffällig	unauffällig
N2	< 0,03		0,1	0	pT _{1b} N ₀ M ₀	4,3 ⁷⁾	PTC		unauffällig
N3	< 0,03		4,4	1,2	pT ₄ N ₀ M ₀	high risk ⁸⁾	FTC		unauffällig
N4	< 0,03		5,5	0,7	pT ₂ N _{1a} M ₀	4,52 ⁷⁾	PTC		unauffällig
N5	0,2		8,7	0	pT _{4b} N ₁ M ₀	high risk ⁸⁾	FTC		Verlauf unbekannt
N6	< 0,03		9,4	0,2	pT ₄ N ₀ M ₀	6,6 ⁷⁾	PTC		Verlauf unbekannt
N7	< 0,03		44,0	1,3	pT _{4a} N _{1b} M ₁	7,85 ⁷⁾	PTC		Ossäre & pulmonale Metastasierung

Mit der Analyse von Tg/GAPDH mRNA in einer heterogenen Gruppe von zwölf thyreoidektomierten radiojodablatierten DTC Patienten in der Tumornachsorge wird das Ziel verfolgt, erste Erfahrungen über den Nutzen der Real - Time- PCR im klinischen Algorithmus „Tumornachsorge“ zu gewinnen. Dabei ist auf die niedrige Patientenzahl ($n = 12$), die heterogenen und zufällig zusammengesetzten Patientengruppen zu verweisen, die statistische Aussagen nur bedingt erlauben. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 15 und graphisch in Abbildung 14 aufgeführt. Die zwölf DTC Patienten werden unterteilt in fünf Patienten (M1 – M5) mit Metastasen (positiver bildgebender Befund und/oder positives S-Tg) sowie in sieben Patienten (N1 – N7) ohne Anhalt für Metastasen (unauffällige Bildgebung und S-Tg Bestimmung) (Tabelle 3). Zu N7 ist anzumerken, dass sich trotz des hohen Stagings bei Primärdiagnose ($pT_{4a}N_{1b}M_1$), im Jahr 2000 zum Zeitpunkt der Blutentnahme kein Anhalt auf Metastasen in der Bildgebung und S-Tg Bestimmung ergibt. Auf diesem Hintergrund wird N7 in die Gruppe der Patienten ohne Metastasen eingeteilt. Bei zwei Patienten (M2, M3) liegt eine hypothyreote Stoffwechsellage zum Zeitpunkt der S-Tg und Tg/GAPDH mRNA Bestimmung vor, so dass bei diesen Patienten von einer höheren Sensitivität des Immunoassays und Real - Time- PCR Assays auszugehen ist. Alle übrigen untersuchten Patienten weisen eine TSH Suppression ($< 0,3$ mU/l) zum Zeitpunkt der Untersuchung auf. Ins Auge fällt, dass S-Tg bei M1 - M4 mit bekannter Metastasierung, im Gegensatz zu N1 - N7 ohne Metastasen, messbar ist. Eine klinische Einteilung erfolgt neben der TNM Klassifikation auch mittels MACIS und AMES Klassifikation, die unter anderem das Alter und Geschlecht mit berücksichtigen. Alle Klassifikationen beziehen sich auf das klinische Stadium bei Erstdiagnose.

Um Erkenntnisse über die prädiktive Aussagekraft des Tg/GAPDH mRNA Assays treffen zu können, fließen die bildgebenden Befunde (Sonografie, Szintigrafie, Computertomografie, ggf. Positronenemissionstomografie) der Tumornachsorge 2003 in die abschließende Bewertung im Sinne einer Verlaufsbeurteilung mit ein.

Die Ergebnisse stellen sich wie folgt dar: Der Mittelwert der Tg/GAPDH mRNA Verhältnisses beträgt in M1 – M5 mit nachgewiesenen Metastasen $2,9 \times 10^{-6}$ und in N1 – N7 ohne nachweisbare Metastasen $5,5 \times 10^{-6}$. Unabhängig der Histologie und der Stoffwechsellage korrelieren die gemessenen S-Tg Werte nicht mit den ermittelten Tg/GAPDH mRNA Konzentrationen der DTC in M1 – M5. Auch bei gleicher Histologie (FOTC bzw. PTC) findet sich keine Korrelation der Tg Konzentrationen auf mRNA und Proteinebene zwischen einer TSH Suppression (M4;M5) verglichen mit einer Stimulation (M2;M3). Auffallend ist auch die Diskrepanz des bildgebenden Befundes mit den S-Tg Werten.

So liegen die S-Tg Werte von M2 und M3 mit 39 bzw. 103 ng/ml deutlich über der Nachweisgrenze, in der durchgeführten Bildgebung inklusive Positronenemissionstomographie gelingt jedoch keine Lokalisation des Rezidivs. Dagegen kann in M1, M3 und M4 mit positiven S-Tg Werten das Rezidiv bildgebend lokal oder peripher diagnostiziert werden.

Im Gegensatz zu M1 – M5 mit bekannten Metastasen liegen in N1- N7 keine vor. N1- N7 sind in Hypothyreose, die einen S-Tg und Tg/GAPDH mRNA Vergleich erleichtern. In den sieben Patienten mit ansteigenden Tg/GAPDH mRNA Konzentrationen von N1 bis N7 sind die bildgebende Diagnostik ebenso wie die S-Tg Messung im Jahr 2000 unauffällig. Anders die Verlaufskontrollen im Rahmen der Tumornachsorge 2003: der Krankheitsverlauf von N1 mit dem niedrigsten Tg/GAPDH mRNA Ratio ist unauffällig, ebenso die der Patienten N2 bis einschließlich N4 mit einem Tg/GAPDH mRNA Wert von $5,5^{x10^{-6}}$. Der Verlauf von N5 und N6 kann leider bei fehlender Tumornachsorge nicht aufgezeichnet werden. Bereits im Jahr 2000 fällt bei N7 die Diskrepanz zwischen dem hohen klinischen Stadium ($pT_{4a}N_{1b}M_1$), der unauffälligen Bildgebung sowie der normwertigen S-Tg Konzentration auf. Dem entgegengesetzt wird bereits im Jahr 2000 die höchste Tg/GAPDH mRNA Ratio aller untersuchten Patienten ($n=12$) von $44^{x10^{-6}}$ ermittelt. 2003 wird szinti- und computertomografisch eine pulmonale und ossäre Metastasierung bei weiterhin unauffälligem S-Tg nachgewiesen. Wird die MACIS Klassifikation (2) in die Bewertung der Tg/GAPDH mRNA Konzentrationsverhältnisse der PTC Patienten (M3, M4, N2, N4, N6, N7) bzw. die AMES Klassifikation (1) der FTC Patienten (M1, M2, M5, N1, N3, N5, N6) berücksichtigt, ist ebenfalls keine Korrelation der Real - Time- PCR Daten mit dem klinischen Stadium zu beobachten. Aufgrund des kleinen Kollektivs ist eine statistische Aussage nur bedingt möglich, so dass eine solche Korrelation nicht sicher ausgeschlossen werden kann.

Zusammenfassend sind folgende Aussagen anhand der Ergebnisse abzuleiten: Eine Korrelation zwischen Staging (TNM, MACIS, AMES), Histologie, S-Tg Werten und Tg mRNA ist nicht erkennbar. Die retrospektive Untersuchung im Rahmen der Tumornachsorge ist unauffällig oder nicht beurteilbar aufgrund unklarer Todesursache bzw. Non Compliance in der Tumornachsorge. Eine Ausnahme hinsichtlich einer prädiktiven Aussagekraft des Real - Time - PCR Assays für Tg mRNA stellt N7 mit unauffälliger Tumornachsorge und dem höchsten Tg/GAPDH mRNA Verhältnis im Jahr 2000 und nachgewiesenen Metastasen bei weiterhin unauffälligem S-Tg 2003 dar.

5.4 Northern Blot

Dem überraschenden Nachweis von Tg mRNA im Blut konnatal athyreoter Patienten wird mit dem Ziel, einen Anhaltspunkt potentieller extrathyreoidaler Tg mRNA Quellen zu finden, nachgegangen. Hierfür wird ein Northern Blot als Multiple Tissue Array Analyse durchgeführt, um die Expression von Tg mRNA im menschlichen Organismus zu untersuchen. Die Hybridisierungssignale werden mit Hilfe eines Phosphoimagers (Abbildung 15) analysiert. Wie erwartet, zeigt die Schilddrüse das stärkste ^{32}P -Signal (800 DLU/mm²). Außerdem sind Hybridisierungssignale um 20 DLU/mm² in der Speicheldrüse und der Trachea sowie zwischen 7 und 10 DLU/mm² in der Niere, dem Pankreas, der Nebenniere, der Leber und dem Herzen festzustellen. Leukozyten des peripheren Blutes und die blutbildenden Zellen des Knochenmarks weisen eine Signalstärke von 3,5 bzw. von 4,5 DLU/mm² auf.

Eine mögliche Erklärung für den ektopen Nachweis von Tg mRNA stellt die sogenannte illegitime bzw. ektope Transkription dar. Diese Begriffe sind von Chelly et al. (127) und Sakar et al. (128) eingeführt worden. Definiert wird die ektope bzw. illegitime Transkription als die Fähigkeit einer jeden Zelle, jede mRNA des gesamten Transkriptom eines Organismus konstitutiv in einer Größenordnung von einem spezifischen Transkript in 500 – 1000 Zellen exprimieren zu können. Anhand des vorliegenden Northern Blots und des dokumentierten ektopen Nachweises der Tg mRNA, wird diese Hypothese gestützt. Die ektope Expression von Tg mRNA stellt damit eine Erklärung für die nachgewiesene Tg mRNA in den athyreoten Patienten dar.

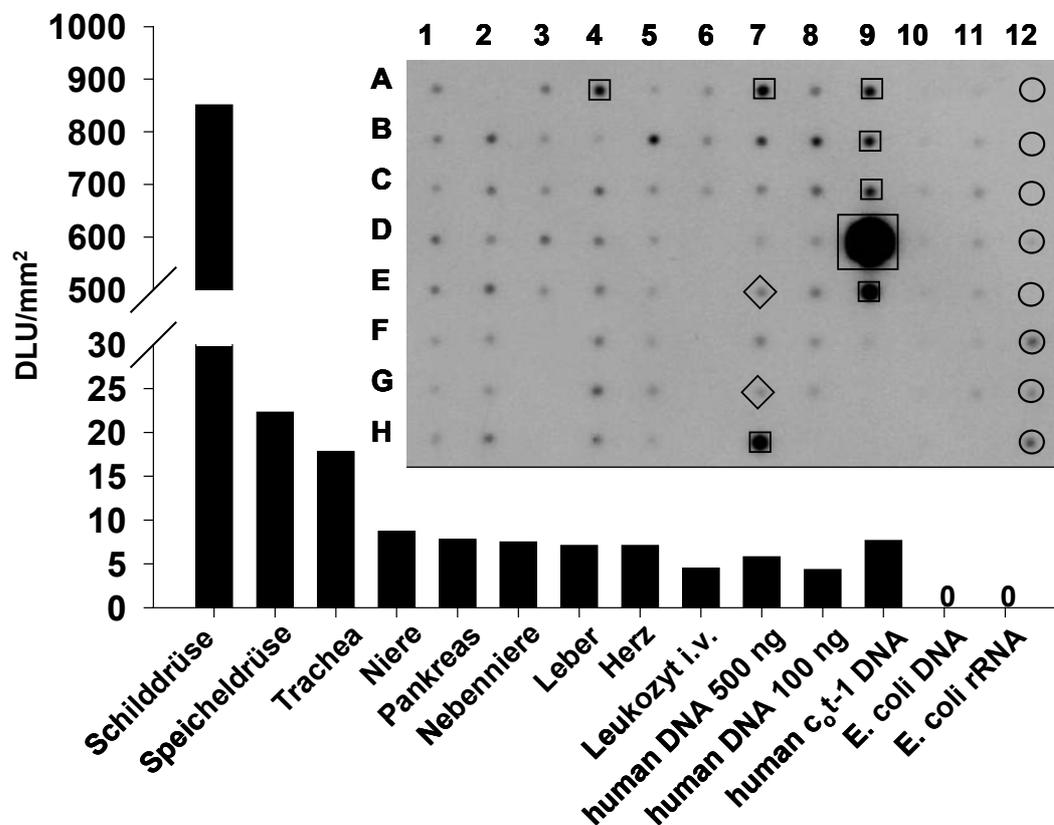


ABBILDUNG15: NORTHERN BLOT DES MULTIPLE TISSUE EXPRESSION ARRAY.

Die Balken geben die Intensität der Hybridisierungssignale wieder. Dargestellt sind alle Signale > 7 DLU/mm². DLU: digital light units. Inlay: Multiple Tissue Expression array hybridisiert mit einer Tg cDNA probe (167 bp). Die Signale von >7 DLU/mm² sind markiert mit □: A4 = Herz, A7 = Niere, A9 = Leber, B9 = Pankreas, C9 = Nebenniere, D9 = Schilddrüse, E9 = Speicheldrüse, H7 = Trachea. Leukozyt i.v. (E7) und Knochenmark (G7) sind mit ◇ hervorgehoben. Die Kontrollen (O) sind im Einzelnen: A - H 12: yeast Total - RNA, yeast tRNA, E.coli rRNA, E.coli DNA, Poly r(A), human C0 t-DNA, human DNA 100 ng, human DNA 500 ng.