

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

DISSERTATION

Analyse des Methylierungsstatus des menschlichen
Typ I-5'-Deiodase Promotors in Schilddrüsenkarzinomen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Kerstin Pohlabein

aus Braunschweig

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle
 2. Prof. Dr. Ch. J. Strasburger
 3. Prof. Dr. R. Dammann

Datum der Promotion: 03.09.2010

Abkürzungsverzeichnis

5'D1	-	Typ I-5'-Deiodase
5'D2	-	Typ II-5'-Deiodase
5'D3	-	Typ III-5'-Deiodase
^{5m} C	-	5-Methyl-Cytosin
A	-	Adenin
bp	-	(DNA-) Basenpaare
C	-	Cytosin
cAMP	-	zyklisches Adenosinmonophosphat
COBRA	-	Combined Bisulfite Restriction Analysis (engl.) Kombinierte Bisufit Restriktionsanalyse (deu.)
DAPK	-	death-associated protein kinase
DIT	-	Diiodyrosin
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	-	DNA-Methyltransferase
dNTP	-	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ER	-	estrogen receptor (engl.) Östrogenrezeptor
FTC	-	follicular thyroid carcinoma (engl.) follikuläres Schilddrüsenkarzinom (deu.)
G	-	Guanin
Gy	-	Gray, radioaktive Einheit
gDNA	-	genomische Desoxyribonukleinsäure
HDAC	-	Histondeacetylase
HVL	-	Hypophysenvorderlappen
LOH	-	loss of heterozygosity (engl.) Verlust der Heterozygotie (deu.)
MEN	-	multiple endokrine Neoplasie
MIT	-	Monoiodtyrosin
MTC	-	medullary thyroid carcinoma (engl.) medulläres Schilddrüsenkarzinom (deu.)
NIS	-	Natrium-Iodid-Symporter

nm	-	Nanometer
PCR	-	polymerase chain reaction (engl.) Polymerase-Kettenreaktion (deu.)
PTC	-	papillary thyroid carcinoma (engl.) papilläres Schilddrüsenkarzinom (deu.)
PDTC	-	poorly differentiated thyroid carcinoma (engl.) gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom (deu.)
RAR β 2	-	retinoic acid receptor β 2 (engl.) Retinsäurerezeptor β 2 (deu.)
rpm	-	rounds per minute (engl.) Umdrehungen pro Minute (deu.)
T	-	Thymidin
T ₃	-	Triiodthyronin (fT ₃ = freies T ₃)
T ₄	-	Tetraiodthyronin, Thyroxin (fT ₄ = freies T ₄)
TBG	-	Thyroxin bindendes Globulin
TF	-	Transkriptionsfaktor
Tg	-	Thyreoglobulin
TIMP3	-	tissue inhibitor of metalloproteinase-3
TPO	-	thyroid peroxidase (engl.) Schilddrüsenperoxidase (deu.)
TR	-	thyroid hormone receptor (engl.) Schilddrüsenhormonrezeptor (deu.)
TREs	-	thyroid response elements (engl.) Schilddrüsenhormon responsive Elemente (deu.)
TRH	-	Thyreotropin-Releasing-Hormon
TSH	-	thyreoideastimulierendes Hormon
TSHR	-	TSH-Rezeptor
TTR	-	Transthyretin
Sp1	-	Specificity protein 1
U	-	Unit (Enzymatische Einheit)
U	-	Uracil
UTC	-	undifferentiated thyroid carcinoma (engl.) undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom (deu.)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 DIE SCHILDDRÜSE	1
1.1.1 <i>Regulation der Schilddrüsenfunktion</i>	1
1.1.2 <i>Schilddrüsenhormonbiosynthese und Stoffwechsel</i>	2
1.2 SCHILDDRÜSENKARZINOME	3
1.3 EPIGENETISCHE GENREGULIERUNG UND KARZINOGENESE	7
1.4 DIE ENZYMFAMILIE DER DEIODASEN.....	11
1.4.1 <i>Die Typ I-5'-Deiodase</i>	11
1.4.2 <i>Gen der Typ I-5'-Deiodase</i>	13
1.5 VORVERSUCHE KARZINOMZELLINIEN – RESTIMULIERUNG DER TYP I-5'-DEIODASE MIT DEM DNA-METHYLIERUNGINHIBITOR 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINE	14
1.6 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT	16
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 UNTERSUCHTE DNA-PROBEN.....	17
2.1.1 <i>Schilddrüsenkarzinomgewebe</i>	17
2.1.2 <i>Humanes Schilddrüsenngewebe</i>	17
2.1.3 <i>Zelllinien</i>	17
2.2 MATERIALIEN	18
2.2.1 <i>Testsysteme - Kits</i>	18
2.2.2 <i>Enzyme</i>	18
2.2.3 <i>Chemikalien</i>	18
2.2.4 <i>Lösungen und Puffer</i>	19
2.2.5 <i>Medien</i>	19
2.2.6 <i>Bakterienstämme</i>	20
2.2.7 <i>Vektor</i>	20
2.2.8 <i>Oligonukleotide</i>	20
2.2.9 <i>DNA-Marker</i>	21
2.2.10 <i>Geräte</i>	21
2.3 METHODEN.....	22
2.3.1 <i>DNA-Extraktion aus humanen Schilddrüsen</i>	23

2.3.2	<i>Bisulfit-Reaktion</i>	23
2.3.3	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i>	26
2.3.4	<i>„Nested-PCR“/ „Semi-nested-PCR“</i>	27
2.3.5	<i>Analyse und Reinigung der PCR-Produkte</i>	28
2.3.6	<i>Combined Bisulfit Restriction Analysis – COBRA</i>	29
2.3.7	<i>TOPO-Cloning</i>	31
2.3.8	<i>Kolonie-PCR</i>	32
2.3.9	<i>Exo/Sap-Aufreinigung von PCR-Produkten</i>	32
2.3.10	<i>Sequenzierung</i>	33
2.3.11	<i>Aufreinigung der Sequenzierreaktion mit Sephadex G-50</i>	34
2.3.12	<i>Statistische Auswertung und benutzte Software</i>	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	EXPERIMENTELLE ERMITTLUNG DER PCR-BEDINGUNGEN	36
3.2	BISULFIT BEHANDLUNG.....	38
3.3	COBRA.....	39
3.3.1	<i>Kontrollen</i>	39
3.3.2	<i>Zelllinien und post mortem Schilddrüsengewebe</i>	40
3.3.3	<i>Schilddrüsenkarzinomgewebe</i>	41
3.4	DIREKTE SEQUENZIERUNG DER PCR PRODUKTE.....	42
3.5	SEQUENZANALYSE DER KLONE.....	43
3.5.1	<i>Ergebnis der Analysen der medullären Schilddrüsenkarzinome (MTC) – Sequenzanalyse der Klone</i>	44
3.5.2	<i>Ergebnis der Analysen der follikulären Schilddrüsenkarzinome (FTC) – Sequenzanalyse der Klone</i>	45
3.5.3	<i>Ergebnis der Analysen der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome inklusive einem gering differenzierten Schilddrüsenkarzinom (UTC und PDTC) – Sequenzanalyse der Klone</i>	46
3.5.4	<i>Ergebnis der Analysen der papillären Schilddrüsenkarzinome (PTC) – Sequenzanalyse der Klone</i>	47
3.5.5	<i>Ergebnis der Analysen der Zelllinien – Sequenzanalyse der Klone</i>	48
3.5.6	<i>Ergebnis der Analysen der post mortem Schilddrüsengewebeproben – Sequenzanalyse der Klone</i>	49

3.6	VERGLEICH DES METHYLIERUNGSSTATUS IM DR+12-MOTIV NACH COBRA UND NACH SEQUENZANALYSE DER SUBKLONIERTEN PROBEN.....	50
4	DISKUSSION.....	51
4.1	EINSCHÄTZUNG DER ANGEWANDTEN METHODEN	51
4.1.1	<i>Direkte Sequenzierung</i>	<i>51</i>
4.1.2	<i>Sequenzanalyse nach Subklonierung.....</i>	<i>51</i>
4.1.3	<i>COBRA.....</i>	<i>52</i>
4.2	ERGEBNISUNTERSCHIEDE BEI DER AUSWERTUNG DES DR+12 MOTIV	52
4.3	EPIGENETISCHE VERÄNDERUNGEN BEI KARZINOMEN.....	53
4.4	EPIGENETISCHE EINFLÜSSE BEI SCHILDDRÜSENKARZINOMEN	54
4.4.1	<i>Genetische Veränderungen bei Schilddrüsenkarzinomen</i>	<i>54</i>
4.4.2	<i>Epigenetische Veränderungen bei Schilddrüsenkarzinomen.....</i>	<i>55</i>
4.5	DIE TYP I -5´-DEIODASE IN SCHILDDRÜSENKARZINOMEN	56
4.6	METHYLIERUNGSSTATUS DR+12 UND SP1 IN SCHILDDRÜSENKARZINOMEN	58
4.7	ZUSAMMENFASSENGE BEANTWORTUNG DER FRAGESTELLUNGEN.....	61
4.8	THERAPEUTISCHE AUSBLICKE	62
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	63
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
7	ANHANG	71
7.1	VERÖFFENTLICHUNGEN	71
7.1.1	<i>Originalarbeit</i>	<i>71</i>
7.1.2	<i>Kongress- und Tagungsbeiträge.....</i>	<i>71</i>
7.2	DANKSAGUNG	72
7.3	LEBENS LAUF	73
7.4	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	74

1 Einleitung

1.1 Die Schilddrüse

Die menschliche Schilddrüse, *Glandula thyroidea*, liegt als wichtiges und gut vaskularisiertes endokrines Organ im Halsbereich und beeinflusst essentielle Prozesse im menschlichen Organismus. Charakteristisch für den Feinbau der Schilddrüse sind die Schilddrüsenfollikel. Das Follikel­epithel der Schilddrüse wird von den Thyreozyten gebildet, die die Schilddrüsenhormone produzieren (Jameson et Weetman, 2003). Die Bedeutung der Schilddrüsenhormone für den Organismus liegt in ihrem Einfluss auf Wachstums- und Differenzierungsprozesse, sowie die Steuerung des Energiehaushalts. Die vielfältigen Wirkungen auf den menschlichen Organismus umfassen die Steigerung des Grundumsatzes, einen Anstieg der Blutglukosekonzentration durch Stimulation der Glykogenolyse und Glukoneogenese, eine Stimulation der Lipolyse, die Ausschüttung von Erythropoetin aufgrund des gesteigerten O₂-Verbrauchs, eine Sensibilisierung der Zielorgane für Katecholamine vor allem durch eine Zunahme der β -Rezeptoren, die Stimulierung der Darmmuskulatur, den vorwiegend katabolen Umbau von Knochen und Muskeln, und die Steigerung der neuromuskulären Erregbarkeit (Lang, 1998).

Als zweiten endokrin aktiven Zelltyp findet man in der Schilddrüse aus dem Neuroektoderm eingewanderte C-Zellen, die auch parafollikuläre Zellen genannt werden. Diese C-Zellen befinden sich zwischen den Thyreozyten und Follikeln. Die Funktion der C-Zellen liegt in der Synthese des Hormons Kalzitinin, das den Blutkalziumspiegel senkt (Lang, 1998).

1.1.1 Regulation der Schilddrüsenfunktion

Die Schilddrüsenfunktion unterliegt einem übergeordneten Regelkreis. Sie wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus entlang der Hypothalamus – Hypophysenvorderlappen (HVL) – Schilddrüsen – Achse kontrolliert. Das TRH (Thyreotropin-Releasing-Hormon) wird von hypothalamischen Neuronen produziert und in das portale Gefäßsystem ausgeschüttet. TRH stimuliert die thyreotropen Zellen des HVL zur Synthese und Sekretion von TSH (thyreoideastimulierendes Hormon, Thyreotropin), das wiederum als wichtigstes Stellglied dieses Regelkreises die Synthese und Ausschüttung der Schilddrüsenhormone stimuliert. TSH beeinflusst alle enzymatischen Schritte, die für die Synthese und Sekretion von Tetraiodthyronin (T₄;

Thyroxin) und Triiodthyronin (T_3) in der Schilddrüse nötig sind vermittelt durch den TSH-Rezeptor, der über Gs und Gq/11-Proteine gekoppelt wirkt. Über negative Rückkopplung hemmen die Schilddrüsenhormone wiederum die TRH- und TSH-Produktion (Jameson et Weetman, 2003).

1.1.2 Schilddrüsenhormonbiosynthese und Stoffwechsel

Der Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone verläuft in mehreren Schritten (nach LoPresti et Singer, 1997; Jameson et al., 2003): Für die Schilddrüsenhormonbiosynthese wird eine tägliche Iodidaufnahme von 150 μg für Erwachsene empfohlen. Die Iodidaufnahme wird unter TSH-Kontrolle durch den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) an der basolateralen Membran vermittelt. Die Follikelzellen nehmen das Iodid aktiv gegen einen elektrochemischen Gradienten über den NIS auf, dessen Transportaktivität durch die Aktivität der ebenfalls in der basolateralen Membran lokalisierten Na^+, K^+ -ATPase über deren kompensierenden Na^+ -Transport angetrieben wird (Spitzweg et Morris, 2002). Anschließend wird Iodid durch Pendrin in der apikalen Zellmembran ins Follikellumen transportiert (Xing, 2007), wo es unter Beteiligung der Schilddrüsenperoxidase (TPO), einem Hämprotein, zu elementarem Iod oxidiert wird. Hierzu ist die Bildung von H_2O_2 durch das in der apikalen Membran lokalisierte Enzym Thyrooxidase erforderlich. Das reaktive Iodatom wird in einer TPO-katalysierten Reaktion in Tyrosinreste von Thyreoglobulin (Tg) eingebaut, wodurch Monoiodtyrosin (MIT) und Diodtyrosin (DIT) entstehen. Bei der Kopplung von DIT und MIT oder von zwei Molekülen DIT entstehen schließlich T_3 (Triiodthyronin) beziehungsweise T_4 (Tetraiodthyronin). TSH stimuliert die Aufnahme von Thyreoglobulin in die Follikelzellen und die hydrolytische Spaltung zur Freisetzung von T_4 und T_3 . Nicht miteinander verbundene MIT oder DIT werden durch eine Dehalogenase deiodiert, sodass Iodid in einem Wiederverwertungsprozess den Thyreozyten erneut zur Hormonsynthese zur Verfügung steht (Jameson et al., 2003).

Das inaktive Prohormon T_4 ist das Hauptsekretionsprodukt der Schilddrüse und wird mit ca. 100 $\mu\text{g}/\text{d}$ um das mindestens 20fache stärker sezerniert als T_3 . 80% des T_3 entstehen durch Monodeiodierung des T_4 . Beide Hormone zirkulieren aufgrund ihres hydrophoben Charakters an Plasmaproteine gebunden, zu denen das Thyroxin bindende Globulin (TBG), Transthyretin (TTR) und Albumin gehören. Nur 0.02% des T_4 und 0.3% des T_3 liegen frei im Serum vor. Der Anteil von fT_3 ist größer als der von fT_4 , da T_3 weniger stark gebunden ist als T_4 . Nur das freie Hormon steht dem Gewebe

vermittelt über zellspezifisch exprimierte Plasmamembrantransporter wie z.B. MCT8, MCT10 und OATP1C1 biologisch zur Verfügung (Köhrle, 2007; Heuer et Visser, 2009). Daher zielt der Schilddrüsenregelkreis auf eine Aufrechterhaltung der normalen Konzentration von freien Hormonen (Jameson et al., 2003).

Die thyromimetische Wirkung von T_3 erfolgt über Bindung an mitochondriale und Kernrezeptoren, die als Schilddrüsenhormonrezeptoren (TRs) α und $-\beta$ bezeichnet werden. TR binden in der Promotorregion des Zielgens an spezifische DNA-Sequenzen (TREs, thyroid response elements) und können die Gentranskription stimulieren oder auch hemmen. T_3 wird mit ungefähr 10-bis 15mal höherer Affinität an TR gebunden als T_4 , was die höhere hormonelle Wirksamkeit von T_3 erklärt (Jameson et al., 2003).

1.2 Schilddrüsenkarzinome

Insgesamt sind Schilddrüsenkarzinome eine eher seltene maligne Erkrankung. Sie machen einen Anteil von ca. 1% an allen malignen Neuerkrankungen aus (Sherman, 2003). Bei Frauen kommt das Schilddrüsenkarzinom zweimal häufiger als bei Männern vor (Jameson et al., 2003; Sherman, 2003). In Deutschland erkranken jährlich knapp über 5000 Personen an einem Schilddrüsenkarzinom (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2008). Es stellt allerdings mit einer Inzidenz von $\sim 9/100\ 000$ pro Jahr das häufigste Malignom des endokrinen Systems dar (Jameson et al., 2003). Die Inzidenz ist jedoch alters- und geschlechtsspezifisch. Im Jahr 2004 sind in Deutschland insgesamt 676 Menschen an einem Schilddrüsenkarzinom verstorben (Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2008). Die Einteilung der malignen Schilddrüsentumoren erfolgt nach histopathologischen Wachstumsmuster und dem zellulären Ursprung des Tumors (Oertel, 2006). Neuere Ansätze in der Einteilung umfassen die molekulare Klassifikation, Gen-Expressions-Signaturen und MikroRNA (miRNA)-Signaturen (Eszlinger et al., 2008). In der überarbeiteten WHO-Klassifikation der Schilddrüsentumoren von 2004 wurde der Versuch unternommen molekularpathologische Erkenntnisse und eine breite Palette an Varianten mit aufzunehmen (Schmid, 2007). Eine systematische Gliederung der 2. Auflage der WHO-Klassifikation von 2004 erfolgt in der Klassifikation nach Schmid.

Entsprechend der Klassifikation nach K.W. Schmid werden Schilddrüsenkarzinome wie folgt eingeteilt (Schmid, 2007):

I. Karzinome mit Follikelzelldifferenzierung

A. Differenzierte Karzinome (80 – 90%)

1. Papilläres Schilddrüsenkarzinom - PTC
 - a. Konventionelle Form
 - b. Varianten: papilläres Mikrokarzinom, follikuläre Variante, makrofollikuläre Variante, diffus sklerosierendes (multizentrisches) Karzinom, tall cell (großzellige) Variante, onkozytäre Variante, klarzellige Variante, solide Variante, kribiformes Karzinom, Variante mit Fasciitis-ähnlichem Stroma
 - c. Mischformen eines PTC: mit fokaler insulärer Komponente, mit Plattenepithel- oder Mukoepidermoid-Karzinom, mit Spindel- und Riesenzell-Karzinom, kombiniertes papilläres und medulläres Karzinom
2. Follikuläres Schilddrüsenkarzinom - FTC
 - a. Minimal invasives Karzinom: onkozytäre und klarzellige Variante
 - b. Grob-invasives Karzinom: onkozytäre und klarzellige Variante
3. Karzinom NOS (not otherwise specified – nicht anders spezifiziert)

B. Gering differenziertes Karzinom (poorly differentiated carcinoma – PDTC)

C. Anaplastisches (undifferenziertes) Karzinom (UTC) (1 – 3%)

- Variante mit osteoklastären Riesenzellen, Karzinosarkom-Variante, paucizelluläre Variante, lymphoepitheliales Karzinom-ähnliche Variante

II. Karzinome mit C-Zelldifferenzierung

1. medulläres Karzinom (MTC) (5 – 10%)
 - a. Familiär
 - b. Sporadisch
2. Gemischte C-Zell-Follikelzell-Differenzierung

III. Andere primäre Schilddrüsenkarzinome

1. Plattenepithelkarzinom
2. Mukoepidermoidkarzinom

3. Sklerosierendes mukoepidermoides Karzinom mit Eosinophilie
4. Muzinöses Karzinom
5. Spindelzellkarzinom mit Thymus-ähnlicher Differenzierung
6. Karzinom mit Thymus-ähnlicher Differenzierung

Jeder Schilddrüsenknoten sollte bis zum Beweis des Gegenteils als mögliches Malignom betrachtet werden. Insbesondere neu aufgetretene sowie schnell wachsende Schilddrüsenknoten sind malignitätsverdächtig. Eine externe Bestrahlung der Kopf- und Halsregion während der Kindheit erhöht das relative Risiko (3-9/ pro Gy) ein Schilddrüsenkarzinom zu entwickeln (Sherman, 2003). Strahlung aus radioaktivem Fallout prädisponiert ebenfalls für die Entstehung eines Schilddrüsenkarzinoms. Nach dem Reaktorunfall in Chernobyl 1986 zum Beispiel, konnte eine deutliche Zunahme der Inzidenz der PTC bei exponierten Kindern und Jugendlichen beobachtet werden (Cardis et al., 2006). Strahlung, die aus einer Behandlung mit ^{131}I stammt, erhöht das Risiko für ein Schilddrüsenkarzinom allenfalls geringfügig (Jameson et al., 2003). In Jodmangelgebieten tritt das follikuläre Schilddrüsenkarzinom häufiger als das papilläre auf (Sherman, 2003). Das medulläre Schilddrüsenkarzinom kann sporadisch (ca. 80% der MTC) oder familiär auftreten. Zu den familiär vererbten Formen gehören die multiple endokrine Neoplasie Typ 2A (Sipple's Syndrom), Typ 2B und das familiäre MTC (Sherman, 2003; Kloos et al., 2009).

Die Diagnostik maligner Schilddrüsentumore umfasst die ausführliche Anamnese und klinische Untersuchung, eine Halssonographie, Schilddrüsenzintigraphie, Bestimmung der Schilddrüsenfunktionsparameter, ein Röntgen Thorax, Feinnadelpunktion und ggf. die Abklärung einer MEN.

Das PTC als häufigstes Malignom der Schilddrüse breitet sich multifokal aus, wächst lokal fortschreitend und durchbricht die Schilddrüsenkapsel, um benachbarte Halsstrukturen zu infiltrieren. Es metastasiert bevorzugt lymphogen, kann aber auch in Lunge und Knochen metastasieren (Jameson et al., 2003). Das PTC ist mit einer sehr guten Prognose assoziiert, da es zum einen meist in frühen Stadien diagnostiziert wird und zum anderen einer kurativen Behandlung zugänglich ist. Das FTC hingegen neigt eher zu einer hämatogenen Metastasierung mit Filiae in Knochen, Lunge und Gehirn (Jameson et al., 2003). Die Letalität ist höher als beim PTC, u.a. aufgrund des größeren Anteils von Patienten in fortgeschrittenen Stadien (Jameson et al., 2003).

Die primäre Therapie der differenzierten Schilddrüsenkarzinome beruht auf den drei Säulen der operativen Therapie, der Radioiodtherapie, und der TSH-Suppressionstherapie. Bei einem PTC mit einem Durchmesser von mehr als 1cm sowie Multifokalität und einem FTC ist die totale Thyreoidektomie mit zentraler Lymphknotendissektion indiziert (Sherman, 2003). Bei palpablen oder sonographisch suspekten lateralen Halslymphknoten erfolgt die systematische ipsilaterale, ggf. auch kontralaterale Dissektion der lateralen Halslymphknoten (Krebsgesellschaft, 1999). Eine retrospektive Studie unterstützt die zentrale und ipsilaterale Lymphknotendissektion, da lokoregionäre Rezidive weniger häufig auftraten. 51% der Patientin mit totaler Thyreoidektomie zeigten ein lokoregionäres Rezidiv, hingegen nur 18% mit zusätzlicher zentraler und ipsilateraler Lymphknotendissektion (Sherman, 2003). Nach der initialen Operation folgt die adjuvante Radioiodtherapie. Nach Aufnahme und Einbau in der Follikelzelle (oder Tumorzelle follikulären Ursprungs) unterliegt ^{131}I einem β -Zerfall, der zu einer hohen lokalisierten Zytotoxizität führt, sowie zur Emission von γ -Strahlung (Sherman, 2003). Drei Ziele werden bei der Behandlung mit ^{131}I nach Thyreoidektomie verfolgt: die Zerstörung aller verbliebenen mikroskopischen Tumorresiduen; eine Erhöhung der Spezifität für nachfolgende Szintigraphien zur Detektion von Rezidiven und Metastasen durch Eliminierung einer Iodidaufnahme durch verbliebenes gesundes Schilddrüsengewebe; höhere Bedeutsamkeit für Thyreoglobulin als Tumormarker für maligne Schilddrüsenzellen (Sherman, 2003). Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Radioiodtherapie die krankheitsspezifische Mortalität bei Patienten mit Primärtumoren von mindestens 1cm Größe, Multizentrität oder Gewebeinvasion senken konnte (Sherman, 2003). Nach den beschriebenen therapeutischen Schritten benötigen die Patienten eine Schilddrüsenhormonersatztherapie nicht nur um die Symptome einer Hypothyreose zu vermeiden, sondern auch um den Stimulations- und Wachstumsreiz durch TSH so gering wie möglich zu halten. Mit einer TSH-suppressiven Therapie mit L-Thyroxin kann das krankheitsfreie Überleben 2-3fach verbessert werden, besonders bei Hochrisikopatienten (Sherman, 2003). Für Patienten mit einem niedrigen Rezidivrisiko wird eine TSH-suppressive Therapie mit einem TSH zwischen 0.1 und 0.5 mU/l empfohlen, bei hohem Risiko sollte der TSH-Wert unter 0.1mU/l liegen (Sherman, 2003). Eine perkutane Bestrahlung ist der palliativen Situation vorbehalten. Eine zytostatische Therapie kann bei progressiven differenzierten Karzinomen versucht werden, die nicht mehr auf eine Radioiodtherapie ansprechen.

Bei Patientin mit einem MTC steht die operative Therapie an erster Stelle. Dies umfasst die totale Thyreoidektomie mit zentraler Halslymphknotendissektion und ggf. die laterale Lymphknotendissektion. Bei der lokal fortgeschrittenen oder metastasierten Erkrankung kommt in der palliativen Situation zusätzlich zur Operation eine Bestrahlung in Frage (Kloos et al., 2009). Patienten unter 40 Jahren weisen eine krankheitsspezifische Überlebensrate von 75% nach 10 Jahren auf (Kloos et al., 2009). Patienten, die älter als 40 Jahre alt sind, zeigen hingegen nur eine Überlebensrate von 50% auf. Die L-Thyroxin-Substitution zielt auf TSH-Werte im Normbereich (Sherman, 2003). Als Tumormarker wird das von den C-Zellen synthetisierte Kalzitinin herangezogen. Insbesondere die aggressiven undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome sind mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert. Die mittlere Überlebenszeit ab Diagnosestellung beträgt nur drei bis sieben Monate. Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen die meisten Patienten eine lokal fortgeschrittene Invasion, sowie Fernmetastasen in Lunge, Pleura, Knochen und Gehirn auf. Therapieansätze sind meist palliativ. Bei lokal operablem Befund erfolgt die totale Thyreoidektomie gefolgt von einer perkutanen Radiatio. Bei nicht komplett resezierbaren Tumoren kann durch die Operation und die nachfolgende Bestrahlung das Überleben nicht verlängert werden. Eine weitere palliative Option stellt die kombinierte Radiochemotherapie mit Doxorubicin dar (Sherman, 2003). Es gibt nur wenige Studien mit neuen zielgerichteten Medikamenten (targeted therapy), die neue Therapieansätze aufweisen könnten (Smallridge et al., 2009).

1.3 Epigenetische Genregulierung und Karzinogenese

Im komplizierten Prozess der Karzinogenese spielen nicht nur DNA-Mutationen in Genen, die die Differenzierung, Zellzyklus und Zellteilung, Apoptose, DNA-Reparaturmechanismen oder Tumorsuppression regulieren, eine Rolle. In letzter Zeit wurde ein großes Augenmerk auf epigenetische Veränderungen in Karzinomgeweben gelegt. Epigenetische Veränderungen zur Regulation der Genexpression beinhalten DNA-Methylierung und Histonmodifikationen ohne die genomische DNA-Sequenz zu verändern. Epigenetische Geninaktivierung ist mindestens ein so häufiges Ereignis, wenn nicht sogar häufiger, als DNA-Mutationen, Deletionen oder Duplikation in der Entwicklung von Karzinomen (Baylin, 2005).

Wenn in genregulierenden Bereichen, den Promotorregionen eines Gens, eine Methylgruppe an das Cytosin gebunden vorliegt, können Transkriptionsfaktoren nicht

binden und das Gen ist „abgeschaltet“. In der Literatur wird dieser Vorgang auch als „Gene Silencing“ bezeichnet, also Stilllegen von Genen. Veränderungen im Methylierungsmuster und der Histonacetylierung üben einen entscheidenden Einfluss auf die Chromatinstruktur aus, und beeinflussen somit den Zugang für die Transkriptionsmaschinerie (Baylin, 2005).

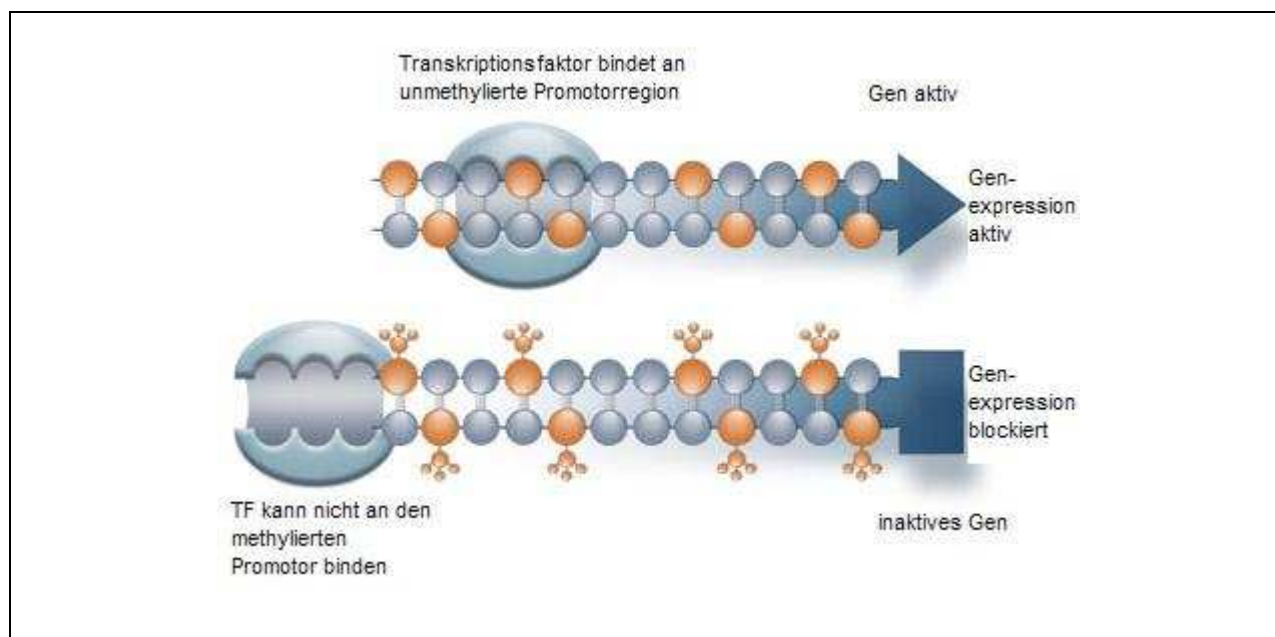


Abbildung 1: DNA-Promotor-Methylierung inhibiert die Genexpression. Gemeinsam mit Chromatinmodifikationen wird der Zugang für Transkriptionsfaktoren (TF) blockiert. Das entsprechende Gen wird stillgelegt. Quelle Bild: www.epigenomics.com

5-Methyl-Cytosin in DNA wurde erstmals 1948 von Hotchkiss beschrieben (Beck et Olek, 2003). In der DNA von Säugern liegen 2-5% aller Cytosine als 5-Methyl-Cytosin vor (Baylin, 2005). Eine Methylierung findet nur an Cytosinen statt, die am 5'-Ende von Guanin in CpG-Dinukleotiden liegen (Jones et Baylin, 2002). Insgesamt sind CpG-Dinukleotide im menschlichen Genom signifikant weniger häufig vorzufinden, als von der allgemeinen Basenkombination der DNA her anzunehmen wäre. In kurzen DNA-Abschnitten von 0.4 - 4kb Länge in Promotorregionen, den CpG-Inseln, ist dieses Dinukleotid reichlich vorhanden (Jones et al., 2002).

1975 postulierten Riggs, Holliday und Pugh, dass 5-Methyl-Cytosin eine wichtige Rolle in der Genregulation spielen könnte (Riggs, 1975), (Holliday et Pugh, 1975), erst später wurde jedoch klar, dass Methylierung mit Inaktivierung von Genen in Verbindung steht (Beck et al., 2003).

DNA-Methylierung ist ein streng kontrollierter Prozess, der wichtig für die normale Regulation von Genen ist und der Stabilität des Genoms dient. DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysieren die Addition von Methylgruppen am 5'-Kohlenstoff des Cytosins in DNA; es resultiert 5-Methyl-Cytosin (^{5m}C). Bis heute sind vier DNMTs identifiziert worden: DNMT1, TRDMT1, DNMT3A und DNMT3B (Miremedi et al., 2007). DNMT1 ist für die Aufrechterhaltung der bestehenden Methylierungsmuster verantwortlich, während DNMT3A und DNMT3B für die De-Novo Methylierungsmuster verantwortlich sind (Jones et al., 2002).

Jeder Zelltyp verfügt über seinen eigenen spezifischen Methylierungsstatus. DNA-Methylierung spielt nicht nur bei der normalen Determinierung und Differenzierung von Zellen eine entscheidende Rolle, sondern dieser spezifische Methylierungsstatus wird auch beim Altern und bei Krankheiten modifiziert (Beck et al., 2003).

Veränderte DNA-Methylierungsmuster wurden in vielen menschlichen Karzinomen beschrieben. 1979 wurde von Holliday et al. (Beck et al., 2003) zum ersten Mal vermutet, dass DNA-Methylierungen einen wichtigen Faktor für den Prozess der Karzinogenese darstellen. Karzinome zeigen in der Gesamt-Methylierung einen niedrigeren Methylierungsgrad als gesunde Zellen. Zusätzlich zur allgemeinen Hypomethylierung zeigen Karzinomzellen lokale Hypermethylierungen, wobei diese vor allem in CpG's in Promotorregionen lokalisiert sind. Im Hinblick auf DNA-Methylierung gibt es zwei Arten von Genpromotoren. Die eine bezieht sich auf ca. 50% der Gene im Genom von Säugern und enthält unmethylierte CpG-Inseln. Die entsprechenden Gene sind somit „aktiv“. Die zweite Art von Promotoren enthält in ihrer Zusammensetzung wenig CpG's, ähnlich dem restlichen Genom. Unter den Genen mit CpG-armen Promotoren ist bisher nicht geklärt, für wie viele dieser Gene CpG-Methylierungen einen modulatorischen Effekt auf die Transkription ausüben. Es gibt jedoch Beispiele, in denen die Methylierung einzelner CpG's in derartigen Promotoren den Transkriptionsstatus eines Gens beeinflussen. Dies geschieht durch Blockierung des Zugangs für bestimmte Transkriptionsfaktoren, die sensibel auf Methylierung der CpG's innerhalb ihrer Bindungsstellen reagieren (Jones et al., 2002). Alternativ könnte die Methylierung dieser CpG-Stellen auch Gene durch Rekrutierung von Chromatin-Protein-Komplexen, welche die Transkription unterdrücken, stilllegen (Jones et al., 2002).

Verschiedene Studien konnten eine direkte Rolle von veränderter Promotormethylierung und „Gene Silencing“ in Karzinomen nachweisen (Beck et al.,

2003). Es wurde eine große Anzahl an Genen identifiziert, die in verschiedenen Karzinomen methyliert sind (Baylin, 2005). Dies stützt die These, dass epigenetische Veränderungen eine Rolle bei der Initiation und Progression von Karzinomen spielen. Promotormethylierung und Inaktivierung von Genexpression scheinen in der Karzinogenese ein frühes Ereignis zu sein. Bei Kolonkarzinomen konnte z.B. eine Korrelation zwischen Methylierung und Krankheitsprogression gezeigt werden. Promotormethylierung ist ferner bei malignen hämatologischen Erkrankungen wie myelodysplastischen Syndromen beschrieben (Baylin, 2005).

Ein weiterer Mechanismus in der Karzinogenese sind die bereits vorher erwähnten genetischen Veränderungen. Einige dieser genetischen Veränderungen sind relativ spezifisch für Schilddrüsentumore und umfassen Mutationen, Deletionen, Neuaneordnungen, Verlust der Heterozygotie (LOH), sowie Translokationen. Eine Vielzahl von chromosomalen Neuaneordnungen, an denen das RET-Gen beteiligt ist, führen zu einer Überexpression dieses Tyrosinkinasezeptors. RET-Neuaneordnungen kommen bei 20-40% der PTC vor und könnten ein frühes Ereignis bei der Entstehung von PTCs sein (Sherman, 2003; Fagin et Mitsiades, 2008). Weitere bei PTC überexprimierte intrazelluläre Kinasen sind TRK und MAP Kinase (Jameson et al., 2003; Sherman, 2003). Die jedoch am häufigsten beschriebene genetische Alteration bei PTC mit ca. 45% ist die BRAF Mutation (Hu et al., 2006; Xing, 2007; Fagin et al., 2008). Diese Mutation verursacht einen V600E Aminosäureaustausch der BRAF Kinase und resultiert in der Aktivierung der Kinase. Studien konnten eine Assoziation dieser Mutation zeigen, die mit Progression und aggressiven Tumoreigenschaften der PTC einhergingen (Hu et al., 2006). Extrathyreoidale Invasion, fortgeschrittenes Tumorstadium, Lymphknoten- und Fernmetastasen werden bei PTC mit BRAF Mutation häufig gefunden (Fagin et al., 2008).

Bei 20-30% von Schilddrüsentumoren werden RAS-Mutationen gefunden (Jameson et al., 2003). Dies schließt Adenome sowie PTC und FTC ein. LOH und Deletionen von Tumorsuppressorgenen wurden insbesondere bei FTC häufig beobachtet. Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 scheinen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von UTC zu spielen. Hier werden sie in 67-88% der Fälle beschrieben (Fagin et al., 2008). Da p53 wichtig für die Überwachung des Zellzyklus, der DNA-Reparatur und der Apoptose ist, könnte sein Verlust zum schnellen Erwerb einer genetischen Instabilität und zu einem geringeren Ansprechen auf die Behandlung beitragen (Jameson et al., 2003).

Der Verlust der E-Cadherin-Catenin Funktion wurde in verschiedenen Tumoren beschrieben und geht ebenfalls mit erhöhter Invasivität und einer schlechteren Prognose einher. Ein Verlust der E-Cadherin Expression und β -Catenin Mutationen werden bei PDTC und UTC gefunden, jedoch nicht in normalen gesunden Schilddrüsengeweben (Pötter et al., 1999; Fagin et al., 2008).

Das MTC im Rahmen einer MEN Typ 2 ist mit autosomal dominant vererbten Mutationen des RET-Protoonkogens assoziiert. Hierbei handelt es sich um Punktmutationen, die die Tyrosinkinase aktivieren (Jameson et al., 2003), (Kloos et al., 2009).

1.4 Die Enzymfamilie der Deiodasen

Die Aufgabe der Deiodasen ist die Aktivierung und Inaktivierung von Schilddrüsenhormonen und deren Metaboliten. Sie nehmen somit eine zentrale Rolle im menschlichen Schilddrüsenhormonstoffwechsel ein. Beim Menschen sind drei verschiedene Deiodasen beschrieben: die Typ I-5'-Deiodase (5'D1), die Typ II-5'-Deiodase (5'D2) und die 5-Deiodase (5-D, Typ III). Diese drei Deiodasen, Selenoproteine, sind in verschiedenen Geweben lokalisiert und erfüllen unterschiedliche Aufgaben (Köhrle, 1999).

1.4.1 Die Typ I-5'-Deiodase

Als Schlüsselenzym im Schilddrüsenhormonstoffwechsel vermittelt die 5'D1 die Aktivierung des Prohormons T_4 in das biologisch aktive T_3 , das an die Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) bindet. 5'D1 sorgt für die Bereitstellung von peripherem T_3 . In dieser Reaktion entfernt 5'D1 Iodid von der 5'- oder 3'- Position von T_4 . Weitere Substrate sind T_3 , rT_3 , $3,3'$ - T_2 , $3',5'$ - T_2 und $3'$ - T_1 (Köhrle, 1999). Zusätzlich ist die 5'D1 in der Lage sulfatisierte Iodthyronine durch 5-Deiodierung zu inaktivieren (Köhrle, 1999). Es inaktiviert somit auch Schilddrüsenhormone und ihre Metabolite. Unter bestimmten in vitro Bedingungen, wie alkalischer pH, ist die 5'D1 auch in der Lage an der 5- oder 3-Position des Tyrosylringes die Deiodierung zu katalysieren (Köhrle, 1997; Köhrle, 1999). In vivo ist die 5'D1 jedoch spezifisch für die Deiodierung am äußeren Phenolring (Köhrle, 1997). Die 5'D1 ist demnach nicht komplett spezifisch hinsichtlich Substratpräferenz und Position der Deiodierung.

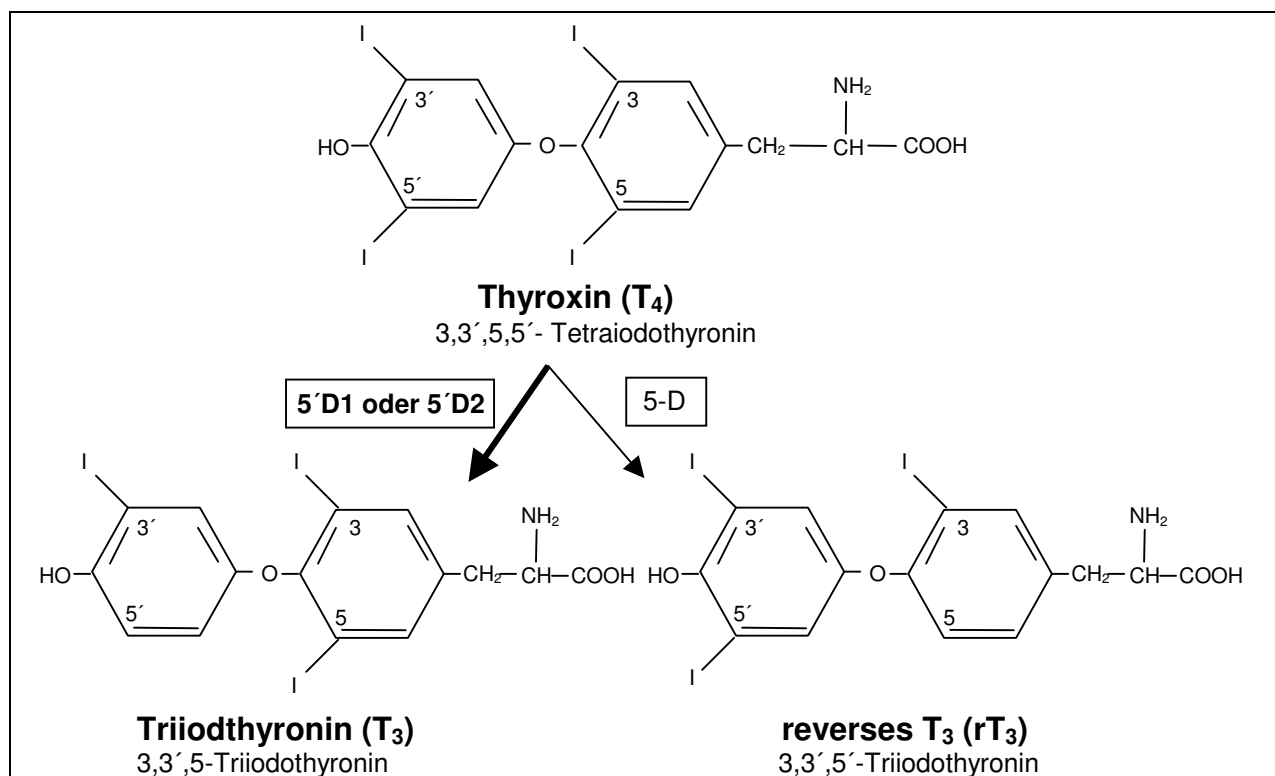


Abbildung 2: Aktivierung des Prohormons T₄ in den aktiven Metaboliten T₃ durch 5'-Deiodierung am äußeren Phenolring durch die Enzyme 5'D1 und 5'D2, sowie Inaktivierung von T₄ in rT₃ durch 5-Deiodierung am inneren Tyrosylring durch 5-D.

Die 5'D1 wird vor allem in der Leber, Niere, Schilddrüse und der euthyreoten Adenohypophyse exprimiert. In der Schilddrüse befindet sich die 5'D1 in den Thyreozyten (Köhrle, 2007). Durch ihre Aktivität in den stoffwechselaktiven Organen Leber und Niere erzeugt die 5'D1 unter physiologischen Bedingungen einen großen Anteil des im Organismus zirkulierenden T₃ (bis zu 70%, vor allem durch die 5'D1 Aktivität in der Leber (Köhrle, 1999). Diese Vorstellung wurde jedoch durch spezifische 5'D1 Knockout Mausmodelle in Frage gestellt. In den Arbeiten von Streckfuss (Streckfuss et al., 2005) und Schneider (Schneider et al., 2006) wurde gezeigt, dass die 5'D1 für die periphere T₄-Aktivierung entbehrlich zu sein scheint, da die Serum T₃-Konzentration in Abwesenheit von 5'D1 aufrecht erhalten werden konnte. Die thyreoidale T₃-Produktion scheint hier einen kompensatorischen Anstieg auf bis zu 80% aufzuweisen (Köhrle, 2007).

Die 5'D1 ist in Schilddrüsenkarzinomgewebe und Karzinomzelllinien signifikant herunterreguliert (Schreck et al., 1994; Köhrle, 1997). Während 5'D1 eine hohe Aktivität in gesunden Schilddrüsen zeigt, sowie eine Überexpression in

Schilddrüsenadenomen und bei Morbus Basedow, ist ihre Aktivität hingegen in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen reduziert und bei undifferenzierten Karzinomen sogar sehr niedrig bis unterhalb der Nachweisgrenze (Köhrle, 1997). Diese Ergebnisse ließen sich auch in humanen undifferenzierten (HTH 74) und follikulären (FTC-133) Schilddrüsenkarzinomzelllinien nachweisen (Köhrle, 1997). Es ist bekannt, dass das 5'D1 -Gen durch T_3 , TSH über den cAMP-Signalweg und Retinsäure positiv reguliert wird (Köhrle, 1999), sowie durch verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren (Köhrle, 1999; Koenig, 2005; Köhrle, 2007).

1.4.2 Gen der Typ I-5'-Deiodase

Das Gen der humanen 5'D1 ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 1 im Bereich p32-p33 lokalisiert. Das gesamte 5'D1- Gen hat eine Länge von 17.5kb und besteht aus vier Exons, die von drei Introns der Größen 10.1kb, 1.3kb und 3.9kb getrennt werden. Der kodierende Bereich hat eine Länge von insgesamt 2.2kb (Jakobs et al., 1997a).

Im Promotor des humanen 5'D1-Gens, das eine regulatorische Region von 1500bp umfasst, wurden mehrere responsive Elemente identifiziert. Dies schließt ein T_3 - und Retinsäure-responsives Element (TRE1) ein (Zhang et al., 1998), das in dieser Arbeit als DR+12- Motiv weiterhin bezeichnet wird. Dieses DR+12- Motiv liegt bei -129bp bis -106bp (in Bezug auf das Start- Codon ATG). Zwischen den Bindungsstellen der zwei TR Sites liegen 12bp (DR+12 – direct repeat + 12). Ein weiteres wichtiges regulatorisches Element im 5'D1-Promotor ist eine Sp1-Bindungsstelle, lokalisiert bei - 68bp bis - 63bp (Jakobs et al., 1997b). Sp1 (Specificity protein 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der an GC-reiche Sequenzen bindet. Diese GC-Boxen sind wichtige und weit verbreitete Elemente in Promotorregionen, insbesondere von Genen, die unter einer bestimmten Art von Kontrolle wie Zellzyklusregulation, Hormonaktivierung, oder Entwicklung stehen (Suske, 1999). Sp1 ist bei einer großen Anzahl von Genen an der Aktivierung miteinbezogen, und seine Funktion scheint für differenzierte Zellen essentiell zu sein (Suske, 1999).

Bisher wurden keine TATA- oder CAAT-Boxen innerhalb des Promotors identifiziert (Jakobs et al., 1997b). Im 5'D1- Promotor finden sich keine typischen CpG-Inseln, jedoch befinden sich CpG- Dinukleotide in diesen beiden entscheidenden regulatorischen Bereichen.

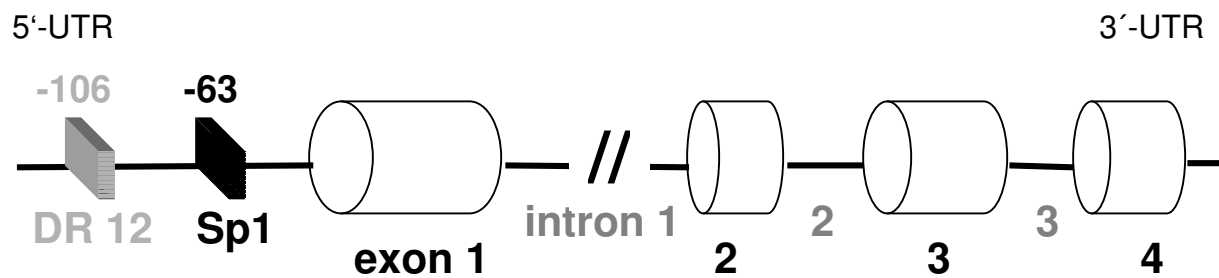


Abbildung 3: Schematische Übersicht Aufbau Typ-I-Deiodase-Gen

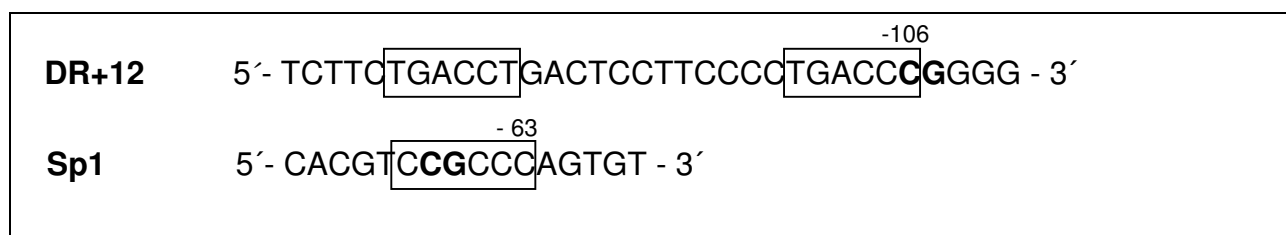


Abbildung 4: DR+12 und Sp-1 Bindungsstellen innerhalb des 5'D1 Promotorfragmentes.

1.5 Vorversuche Karzinomzelllinien – Restimulierung der Typ I-5'-Deiodase mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine

Bei Experimenten an unserem Institut von Frau Dr. rer. nat. B. Mentrup konnten wichtige Vorkenntnisse für diese Arbeit gewonnen werden (Mentrup et al., 2003).

Mit Hilfe der COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) wurden CpG-Sites im Promotor der 5'D1 hinsichtlich ihres Methylierungsstatus in der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2, der folliculären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 und der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinie HTh 74 untersucht. Es konnte eine unterschiedliche Methylierung des DR+12 Motivs der Zelllinien nachgewiesen werden, die sich hinsichtlich der 5'D1 Aktivität jeweils unterscheiden. Eine unterschiedliche Methylierung konnte weiterhin an Position -4 (in Bezug auf das Start- Codon ATG) gefunden werden, hier mit partieller Methylierung der Schilddrüsenkarzinomzelllinien. Alle weiteren CpG-Dinukleotide zeigten keine Unterschiede hinsichtlich der Methylierung. Die Enzymaktivität in den Schilddrüsenkarzinomzellen war ca. 100-2000fach niedriger als in HepG2. Das DR+12- Motiv zeigte eine vollständige

Methylierung in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC-133 und HTh 74, nicht jedoch in der hepatozellulären Karzinomzelllinie HepG2.

Die Zelllinien wurden anschließend mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-aza-2'-Deoxycytidine stimuliert. Ein konsekutiver Anstieg der 5'D1- mRNA- Expression konnte bei den Schilddrüsenkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Bei der Zelllinie HepG2 zeigte sich dieser Effekt nicht. Der stimulierende Effekt des Methyltransferaseinhibitors bewirkte ebenso eine Änderung der 5'D1-Enzymaktivität. Bei den Schilddrüsenkarzinomzelllinien konnte ein dosisabhängiger Anstieg der Enzymaktivität gezeigt werden. Bei HepG2 konnte keine Veränderung der Enzymgrundaktivität durch die Behandlung mit 5-aza-2'-Deoxycytidine hervorgerufen werden.

Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass die Methylierung dieses regulatorischen Bereiches, einem T₃- und Retinsäure-responsivem Element (DR+12), im 5'D1- Promotor zum „Abschalten“ des Gens mit funktionellen Auswirkungen in malignen Schilddrüsenerkrankungen führt.

1.6 Aufgabenstellung und Ziele der Arbeit

Bisher ist nicht geklärt, warum die 5'D1 in Schilddrüsenkarzinomen herunterreguliert wird und welche Faktoren für diese negative Regulation, wie sie in verschiedenen Tumoren und Schilddrüsenkarzinomzelllinien beobachtet wird, verantwortlich sind.

Epigenetische Effekte wie Methylierung regulatorischer Bereiche im Promotor des 5' D1- Gens scheinen einen modulierenden Effekt auf Genexpression und Enzymaktivität in humanen Schilddrüsenkarzinomzelllinien auszuüben. Bisher gibt es noch keine Erkenntnisse darüber, ob diese Effekte auch in menschlichen Tumorgeweben vorzufinden sind.

Ziel dieser Arbeit war es, den Methylierungsstatus der humanen Typ 1- Deiodase an wichtigen regulatorischen Bereichen des Promotors in Zusammenhang mit der Genexpression und Enzymaktivität in Schilddrüsenkarzinomgeweben zu untersuchen.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Sind diese regulatorischen Bereiche im Promotor der humanen 5'D1 in Schilddrüsenkarzinomgeweben methyliert ?
2. Entspricht dieser spezifische Methylierungsstatus der Genexpression und Aktivität der 5'D1 in Schilddrüsenkarzinomen?
3. Gibt es eine Korrelation zwischen Zunahme des Methylierungsstatus und der Malignität?

2 Material und Methoden

2.1 *Untersuchte DNA-Proben*

2.1.1 Schilddrüsenkarzinomgewebe

Ausgangsmaterial dieser Arbeit waren 38 mit Bisulfit behandelte genomische DNA-Proben aus Schilddrüsenkarzinomen unterschiedlichen histopathologischen Ursprungs, die freundlicherweise von Dr. C. Hoang-Vu (Experimentelle Chirurgie und Onkologie) und Dr. R. Dammann (AG Tumorgenetik) von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Verfügung gestellt wurden. Die DNA wurde aus Karzinomgeweben isoliert, die anhand ihrer histologischen Beurteilung in folgende Gruppen aufgeteilt wurden: sechs medulläre Schilddrüsenkarzinome (MTC), acht follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC), 14 papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC), neun undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome (UTC) und ein gering differenziertes Schilddrüsenkarzinom (PDTC). Weitere Informationen zu den Geweben und Patienten lagen nicht vor.

2.1.2 Humanes Schilddrüsengewebe

Als Kontrollproben wurden aus Obduktionsgut sechs als makroskopisch nicht pathologisch befundene humane Schilddrüsengewebe verwendet und die genomische DNA isoliert. Die Organe, die nach der Entnahme sofort schockgefroren und auf Trockeneis verschickt wurden, stellte Prof. V. Herzog, Institut für Zellbiologie, Universität Bonn, freundlicherweise zur Verfügung. Weitere Informationen zu den Organen und Patienten lagen nicht vor. Sowohl für die DNA Proben als auch für die Bonner Gewebe lagen Ethikvoten der zuständigen Kommissionen für die molekularbiologischen und biochemischen Analysen vor.

2.1.3 Zelllinien

Des weiteren wurden die Zelllinien FTC-133 (Goretzki et al., 1990), HTh 74 (Heldin et al., 1988) und Hep G2 (ATCC HB 8065) verwendet. FTC-133 wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eines 42-jährigen Mannes gewonnen. HTh 74 wurde aus einem anaplastischen Schilddrüsenkarzinom isoliert. Die Hep G2 Zelllinie wurde aus einer Leberbiopsie eines 15-jährigen Jungen mit einem gut differenziertem Hepatozellulärem Karzinom isoliert.

2.2 Materialien

2.2.1 Testsysteme - Kits

- Big Dye® Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit:
ABI Deutschland GmbH (Darmstadt, Deutschland)
- TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing:
Invitrogen™ life technologies (Paisley, UK)
- QIAquick PCR Purification Kit, QIAquick Gel Extraction Kit, DNeasy Tissue Kit, QIAGEN, QIAprep Spin Miniprep:
QIAGEN (Hilden, Deutschland)

2.2.2 Enzyme

- Exonuclease I (E.coli) (20.000 U/ml), *Hinf* I (10.000 U/ml):
New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)
- Taq DNA Polymerase: QIAGEN (Hilden, Deutschland)
- Shrimp Alkaline Phosphatase (1.000 U/ml):
USB Corporation (Cleveland, Ohio, USA)
- RNase A: Boehringer Mannheim

2.2.3 Chemikalien

Es wurden folgende Chemikalien verwendet:

- Sephadex G-50 Superfine – Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland)
- Bacto Agar – Difco (Le Pont de Claix, Frankreich)
- LB-Agar (Lennox L Agar) – Invitrogen (Paisley, UK)
- Natriumhydroxid – Merck (Darmstadt, Deutschland)
- Ampicillin, Ethidium Bromid (Aqueous Solution, 500 µg/ml), Glycogen, Hydroquinone (1,4-Benzenediol), Luria Broth, Sodium Bisulfit – Sigma (Deisenhofen, Deutschland)
- Agarose – Serva (Heidelberg, Deutschland)

2.2.4 Lösungen und Puffer

- 100 bp-DNA-Leiter Gebrauchslösung: 10 µl 100 bp-DNA-Leiter
60 µl 6 × Loading buffer
30 µl Aqua dest.
- 6× DNA-Auftragspuffer: 0.25% Bromphenolblau, 30% Glycerol in aqua bidest
- 10× PCR-Puffer: enthält Tris-HCl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂
- 7.5 M Ammoniumacetat (CH₃COONH₄)
- Ampicillin Stammlösung (50 mg/ml)
- dNTP-Mix (10 mM): 10 µl dATP 100 mM
10 µl dTTP 100 mM
10 µl dCTP 100 mM
10 µl dGTP 100 mM
ad 100 µl a. bidest
- 0.1 M Hydroquinon-Lösung (C₆H₆O₂)
- 3 M NaOH (bei jeder Bisulfit-Reaktion neu ansetzen)
- 3.6 M Natrium-Bisulfit-Lösung (NaHSO₃)
- TAE-Puffer (50 × Stammlösung): 40 mM Tris
1 mM EDTA
- TE-Puffer (10 × Stammlösung, pH 8.0): 100 mM Tris-Cl (pH 8.0)
10 mM EDTA (pH 8.0)

2.2.5 Medien

- Luria Broth (Miller's Formula, Sigma) enthält:
NaCl 10 g / l (172.41 mM)
Trypton 10 g / l
Hefe Extrakt 5 g / l

Für LB Agarplatten wird hinzugefügt: Bacto-Agar 15 g / l

- LB-Agar (Lennox L Agar, Invitrogen) enthält:
NaCl 5 g / l (86.21 mM)
Trypton 10 g / l
Hefe Extrakt 5 g / l
Agar 12 g / l

- S.O.C. Medium (Invitrogen) enthält:

Trypton	2 %
Hefe Extrakt	0.5 %
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM
Glukose	20 mM

Das LB-Medium und LB-Agar werden bei 121 °C für 20 min autoklaviert und vor der Zugabe von Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ml) auf ca. 50 °C heruntergekühlt, da Ampicillin bei höheren Temperaturen zerfällt. Zur Herstellung der LB- Amp+ Agarplatten wird ein steriler Magnetrührfisch in das Gefäß dazugegeben und das Gemisch unter Rühren abgekühlt, um vorzeitiges Aushärten zu verhindern.

2.2.6 Bakterienstämme

Für die Klonierungen wurden chemisch kompetente *Escherichia coli* Zellen des Stammes TOP10 eingesetzt. Diese wurden mit dem TOPO TA Cloning® Kit for Sequencing geliefert.

Genotyp:

F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ80/*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1* *ara*Δ139 Δ(*ara-leu*)7697 *galJ galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

2.2.7 Vektor

Es wurde der Plasmidvektor pCR[®]4-TOPO[®] aus dem TOPO TA Cloning[®] Kit for Sequencing verwendet.

2.2.8 Oligonukleotide

- Ultrapure dNTP Set: Amersham Biosciences Europe (Freiburg, Deutschland)
- Oligonukleotid-Primer: MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)

Primer-Sequenzen

-286s	5´- aaa aat taa tta gag gga gaa - 3´
-40as	5´- aaa aac tac aac caa aca aca - 3´
+71 as	5´- acc aca tac aca acc acc tcc aaa a - 3´
M13 Forward	5´- gta aaa cga cgg cca g - 3´
M13 Reverse	5´- cag gaa aca gct atg ac - 3´

2.2.9 DNA-Marker

- 100 bp DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder:
New England Biolabs (Ipswich, Massachusetts, USA)

2.2.10 Geräte

- Thermocycler: MWG-Biotech, Primus Thermocycler
- Sequencer: ABI Prism 3730, Applied Biosystems; Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Functional Genetics and Genomics Group, Berlin Buch
- Ultra-Turrax: IKA[®] Werke GmbH&Co.KG (Staufen, Deutschland)

Alle übrigen verwendeten Geräte wie Pipetten, Glaswaren, Zentrifugen, Inkubatoren, Heizblöcke und Elektrophoresezubehör entsprechen den üblichen Laborstandards.

2.3 Methoden

Um den Methylierungsstatus des DR+12 und Sp1 Motivs des 5'D1 Promotors sorgfältig zu untersuchen, waren mehrere Teilschritte erforderlich: zunächst wurde genomische DNA (gDNA) aus den Schilddrüsengeweben gewonnen (DNeasy Tissue Kit). Anschließend wurde die DNA mit Bisulfit modifiziert und desaminiert, um sie für weiterführende Methylierungsanalysen vorzubereiten. Mit Hilfe der "nested PCR" wurde zunächst aus der mit Bisulfit behandelten gDNA ein bestimmter Promotorbereich amplifiziert, um eine ausreichende Anzahl an Kopien zu erhalten. Anschließend wurden folgende Verfahren zur Analyse der CpG Sites angewendet:

- direkte Sequenzierung der PCR-Produkte
- Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)
- Subklonierung der Proben mit anschließender Sequenzierung individueller Klone.

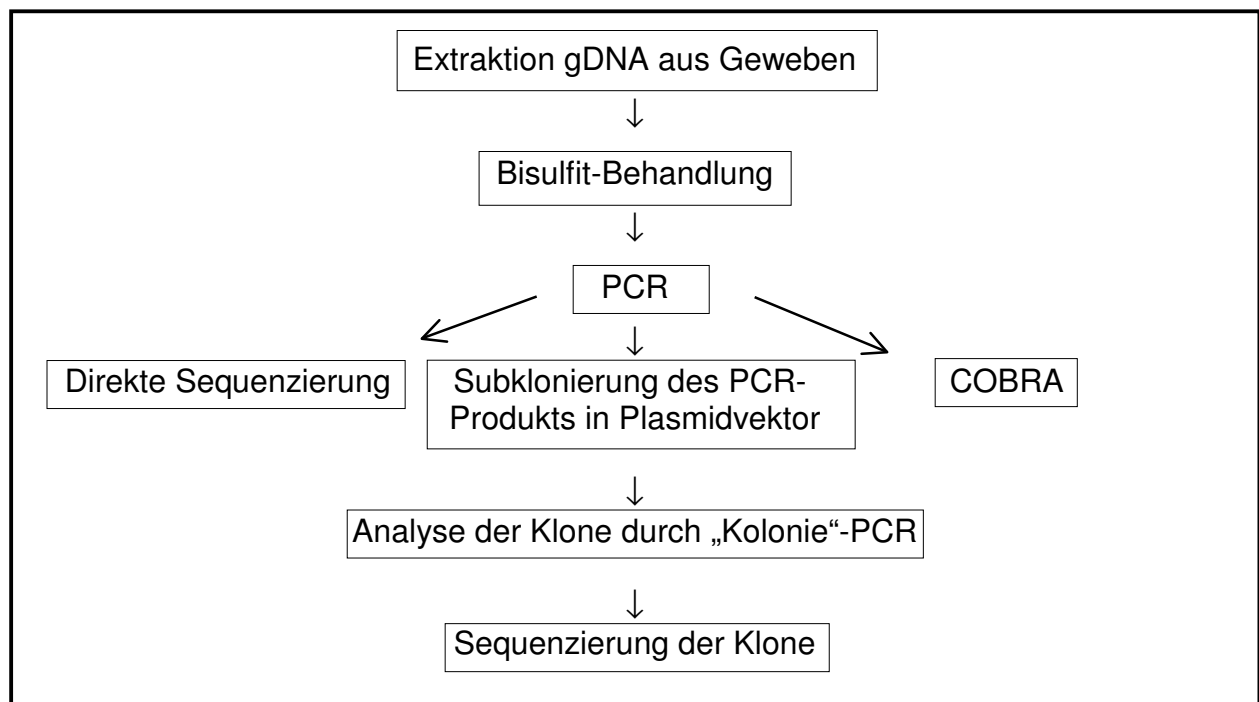


Abbildung 5: Allgemeine Vorgehensweise bei der Verarbeitung der Proben

2.3.1 DNA-Extraktion aus humanen Schilddrüsen

Die Extraktion der DNA der humanen Schilddrüsen wurde mit dem DNeasy Tissue Kit durchgeführt. Das Prinzip dieses Testsystems basiert auf einem optimierten Puffersystem, das eine direkte Zellyse mit anschließender selektiver Bindung von DNA an eine Silikat-Gel-Membran erlaubt.

Protokoll (nach Herstellerangaben): Die Gewebe wurden zunächst mit einem Ultra-Turrax (IKA® Werke GmbH & Co.KG) mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden 180 µl Puffer ATL und danach 20 µl Proteinase K hinzugegeben, gemischt und für 1-3 Stunden bei 55 °C inkubiert bis das Gewebe vollständig lysiert war. Eine optionale RNase Behandlung erfolgte durch den Zusatz 4 µl RNase A (100 mg/ml). Der Ansatz wurde gemischt und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz erneut für 15 Sekunden vermischt, 200 µl Puffer AL hinzugefügt und für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Nach Hinzufügen von 200 µl Ethanol (96-100%) gab man den gesamten Ansatz auf die dem Kit beigegefügt Säulen und zentrifugierte 1 Minute bei 8000 rpm in die bereitgestellten 2 ml-Sammelgefäße. Das Filtrat wurde verworfen. Die Säule wurde zweimal mit je 500 µl Waschpuffer befüllt (AW1 bzw. AW2) und bei 8000 rpm für 1 Minuten, bzw. bei 13000 rpm für 3 Minuten beim zweiten Mal zentrifugiert. Die Elution erfolgte mittels 100 µl Puffer AE und durch Zentrifugation für 1 Minute bei 8000 rpm nach einer Einwirkzeit von 1 Minute. Um eine höhere DNA-Ausbeute zu erreichen, wurde die Elution mit 100µl Puffer AE wiederholt. Man erhielt 200 µl Eluat.

2.3.2 Bisulfit-Reaktion

Frommer und Mitarbeiter (Frommer et al., 1992) haben die Bisulfit-Methode als eine Technik eingeführt, um das Vorkommen von 5-Methyl-Cytosin (^{5m}C) in gDNA zu bestimmen. Dabei wird die unmethylierte Nukleinsäure Cytosin (C) durch die katalytische Wirkung von Bisulfit (HSO₃⁻) hydrolytisch zu Uracil (U) desaminiert. Dabei wird das C6-Atom eines zugänglichen C bei einer hohen NaHSO₃-Konzentration (3.0M) und leicht sauren Bedingungen (pH 5.0) sulfoniert. Die Aminogruppe am C4 wird dann spontan hydrolysiert, das Bisulfit-Molekül wird bei basischem pH regeneriert, woraus Uracil resultiert (Lottspeich et Zorbas, 1998).

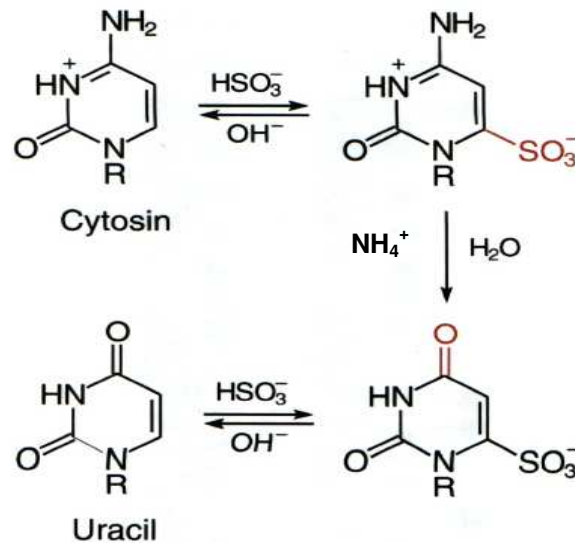


Abbildung 6: Bisulfit Reaktion; Natriumbisulfit katalysiert die Desaminierung von Cytosin zu Uracil
(nach Lottspeich F. und Zorbas H., 1998)

In einer anschließenden PCR wird Uracil durch Thymidin (T) ersetzt. 5-Methyl-Cytosin (^5mC) ist vor der Sulfonierungs- und Desaminierungsreaktion geschützt und wird in der PCR weiter als Cytosin amplifiziert. Das Vorliegen der methylierten ^5mC und unmethylierten C bzw. amplifizierten T kann anschließend durch verschiedene Methoden nachgewiesen werden.

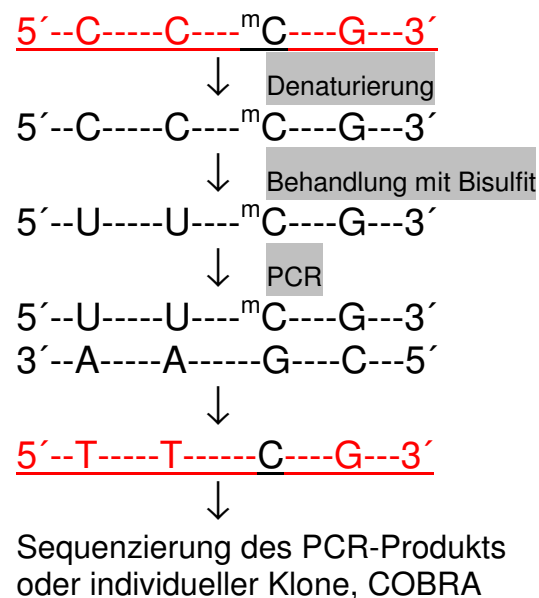


Abbildung 7: Prinzip der Methylierungsanalyse eines CpG-Dinukleotids durch die Bisulfit-Methode

Protokoll: Zu 2 µg DNA (x µl) wurden (18-x) µl TE-Puffer und 2 µl 3 M NaOH (Endkonzentration 0.3 M) zugegeben (gesamtes Volumen 20 µl). Anschließend wurde der Ansatz für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Pro Probe wurden 208 µl 3.6 M Natrium-Bisulfit-Lösung (NaHSO₃) und 12 µl 0.1 M Hydroquinon-Lösung (C₆H₆O₂) zugefügt und die Proben bei 55 °C für 16 Stunden inkubiert. Dabei erfolgte der Einbau der Sulfonsäuregruppe in nichtmethylierte Cytosinmoleküle.

- **DNA-Reinigung vom Bisulfit mit QIAquick PCR Purification Kit**

Mit dem „QIAquick PCR-Purification Kit“ steht ein weiteres auf der Bindung an eine Silikat-Gel-Membran basierendes Verfahren zur Aufreinigung von PCR-Produkten zur Verfügung. Diese Membran bindet oder entlässt DNA je nach Salzkonzentration und pH-Wert der Lösung.

Protokoll (nach Herstellerangaben): Fünf Volumenteile des Puffers PB wurden mit einem Volumenteil der DNA auf die QIAquick-Säulen in einem 2 ml-Sammelgefäß gegeben und 30-60 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl Waschpuffer PE beladen und zweimal für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Für die Elution wurden 30-50 µl Tris-HCl (pH 8.5) oder Wasser direkt auf die Membran gegeben. Durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm wurden nach 1 Minute Einwirkzeit die PCR-Produkte in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß eluiert.

Zu der aufgereinigten, mit 50 µl H₂O eluierten DNA wurden 5µl 3M NaOH zugegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Bei diesem Schritt wurden die durch die Bisulfit-Methode hinzugefügten Schwefelgruppen wieder abgespalten.

- **DNA-Fällung**

Zu den 55 µl der DNA Probe wurden 55 µl (1 Volumen) 7.5 M Ammoniumacetat (CH₃COONH₄), 1 µl Glycogen und 275 µl (2,5 Volumen) Ethanol (100%) hinzugefügt. Der Ansatz wurde geschüttelt und die DNA bei -20 °C für 5-10 Minuten gefällt. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 13000 rpm und Raumtemperatur zur Sedimentation der DNA zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA mit 100 µl 75%igem Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation wurde für 2 Minuten wiederholt. Der Überstand wurde gründlich abgenommen, das Pellet getrocknet und schließlich in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction; PCR) ist ein von Kary B. Mullis entwickeltes in vitro Verfahren zur Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten definierter Länge und definierter Sequenz (Saiki et al., 1985). Sind die im Randbereich gelegenen Sequenzen des zu untersuchenden Genabschnittes bekannt, ist es möglich innerhalb kurzer Zeit eine exponentielle, selektive, etwa $10^6 - 10^7$ -fache Anreicherung des gewünschten Genabschnittes zu erzielen. Die eingesetzten Oligonukleotide dienen in dieser Reaktion als Startermoleküle, genannt Primer. Sie bestehen aus ca. 20 Basen und flankieren die zu amplifizierende Sequenz beidseitig. Unter geeigneten Bedingungen bilden sich Hybridmoleküle zwischen jeweils einem Strang der zu amplifizierenden DNA und dem zu diesem Strang komplementären Primer aus. Man erhält einzelsträngige Moleküle, die nur im Bereich des gebundenen Primers doppelsträngig sind. Dieser kurze doppelsträngige Bereich ist der Startpunkt für die temperaturstabile Taq-Polymerase, mit deren Hilfe der komplementäre Einzelstrang synthetisiert wird. Werden die einzelnen Schritte mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle. Ferner werden die vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) als Bausteine sowie $MgCl_2$ und PCR-Puffer benötigt.

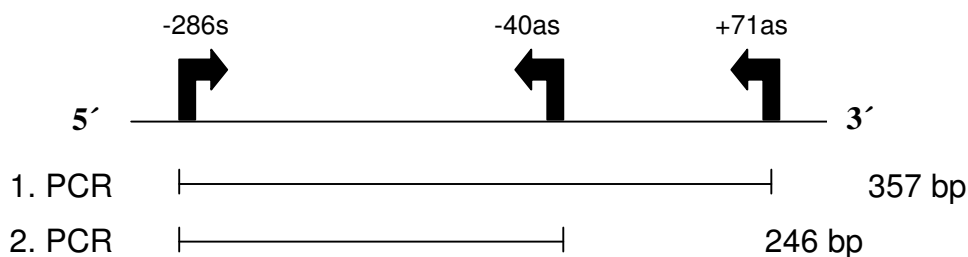
Ein typischer PCR-Verlauf besteht in der Regel aus 30-40 Reaktionszyklen mit drei unterschiedlichen Temperaturstufen:

1. Denaturierung der DNA in ihre Einzelstränge (95 °C)
2. Anlagerung der Primer („Annealing“) (45-65 °C)
3. Extension der Primer; DNA-Synthese (72 °C)

Wichtige Variablen bei der PCR sind die Annealing-Temperatur (T_m), die von der Gestaltung der Primer beeinflusst wird. Die einfachste Formel legt für jedes A oder T eine T_m von 2 °C und für jedes C oder G eine T_m von 4 °C zugrunde. Die am besten geeignete Primeranlagerungs-Temperatur muss jedoch für jede Probe experimentell genauer bestimmt werden. Die Extensions-Zeit hängt von der Länge des zu amplifizierenden Genabschnittes ab. Durch Variation von $MgCl_2$ -Konzentration, Q-Solution und/ oder DMSO-Zugabe (Dimethylsulfoxid) kann die Amplifikation optimiert werden.

2.3.4 „Nested-PCR“/ „Semi-nested-PCR“

Bei der so genannten „nested-PCR“ handelt es sich um eine verschachtelte PCR, wobei zwei Primer-Paare (ein äußeres und ein inneres) zur Amplifikation verwendet werden. Der Vorteil dieser Methode ist eine erhöhte Spezifität und Sensitivität der Gesamtreaktion, da zunächst mit einem äußeren Primer-Paar ein etwas größeres PCR-Produkt synthetisiert wird und dann in einer zweiten Reaktion mit dem inneren Primer-Paar dieses erste PCR-Produkt weiter amplifiziert wird, wodurch Nebenprodukte entfallen. Da bei der Bisulfit-Behandlung ~ 90% des Templates, also der ursprünglichen DNA-Matrize, verloren gehen, ist die „nested PCR“ ein geeignetes Verfahren (Grunau et al., 2001). Bei dieser Arbeit wurde eine „semi-nested-PCR“ durchgeführt, indem bei der zweiten PCR ein neuer Primer am 3'-OH-Ende eingesetzt wurde. Am 5'-OH-Ende wurde der gleiche Primer wie in der ersten Reaktion verwendet.



Zur Amplifizierung der mit Bisulfit modifizierten 5'DI-Promotor-Sequenz wurden folgende Primer für die „semi-nested-PCR“ gestaltet, die an der erfolgreich mit Bisulfit modifizierten DNA hybridisieren:

-286s	5' - aaa aat taa t t a gag gga gaa - 3'
-40as	5' - aaa a a c t a c a a c caa a a c aca - 3'
+71 as	5' - acc aca t a c aca a a cc acc tcc aaa a - 3'

t (sense) und **a** (antisense) repräsentieren durch Bisulfit modifizierte Cytosine

Die PCR wurde mit „Taq-DNA-Polymerase“ und den entsprechenden Reaktionspuffern der Firma QIAGEN durchgeführt.

-286s/+71as bilden das äußere Primer-Paar und -286s/-40as bilden das innere. Das erste Produkt hat eine Länge von 357 bp, das zweite umfasst 246 bp.

PCR-Reaktionsansatz:

1×	PCR Puffer	5.0 µl	10× PCR-Puffer +15 mM MgCl ₂
5 nmol	dNTP	0.5 µl	10 mM dNTP-Mix
20 pmol	Primer 1	0.5 µl	10 µM Primer 1
20 pmol	Primer 2	0.5 µl	10 µM Primer 2
50 nmol	MgCl	2.0 µl	25 mM MgCl ₂
1 U	Taq-Polymerase	0.2 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
1.0 µl	Template		(Bisulfit behandelte gDNA oder Produkt aus 1.PCR)
1×	Q-Solution	10 µl	5× Q-Solution – optional
10 %	DMSO	5.0 µl	100% DMSO – optional
			H ₂ O dest. ad 50 µl

Die Programmierung des Thermocyclers für die PCR lautet:

95 °C	3 Min.	
72 °C	1 Min.	
35-40×		(35 Zyklen 1.PCR, 40 Zyklen 2.PCR)
95 °C	30 Sek.	
48-58 °C	40 Sek.	(Für 2. PCR 5 °C niedrigere T _m als 1. PCR)
72 °C	40 Sek.	
48-58 °C	1 Min.	
72 °C	4 Min.	(10 min für TOPO Cloning Reaktion)
8 °C	5 Min.	

2.3.5 Analyse und Reinigung der PCR-Produkte

- **Agarosegel-Elektrophorese**

Die Elektrophorese ist eine Methode zur Analyse von Nukleinsäuren. Diese sind bei allen pH-Werten aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen. Sie lassen sich daher bei der Elektrophorese mit Gleichstrom durch Wanderung von der Kathode zur Anode auftrennen. Dies geschieht umso langsamer, je größer die Fragmente sind.

Die Elektrophoresen wurden in Horizontalgelkammern mit einem Gelvolumen von ca. 40 ml durchgeführt. Dazu wurden je nach zu erwartender PCR-Produktgröße 1.5 – 2.5% Agarose mit 1× TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht, nach Abkühlen auf 60 °C

mit Ethidiumbromid (5 µl der 500 µg/ml Lösung) versetzt und das Gel gegossen. Das Ethidiumbromid interkaliert in die doppelsträngige DNA, welche nach Anregung mit UV-Licht als fluoreszierende Bande sichtbar wird. Nach 30 minütigem Aushärten wurden die Geltaschen zu analytischen Zwecken mit 5 µl PCR-Produkt und 1.5 µl Auftragspuffer beladen. Zu präparativen Zwecken wurden 150 µl PCR-Produkt mit 15 µl Auftragspuffer in große Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente in 1× TAE-Puffer erfolgte bei 100 V für 30 Minuten. Durch UV-Licht-Anregung im Bereich von 312 nm wurden die entstandenen Banden sichtbar gemacht und fotografisch dokumentiert.

- **Reinigung von DNA aus einer Bande im Agarosegel**

Die DNA-Fragmente aus den präparativen Agarosegelen wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt.

Protokoll (nach Herstellerangaben):

Die DNA-Banden wurden mit einem Skalpell unter UV-Sicht aus dem Agarosegel geschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend gewogen. Pro 100 mg Gel (1 Volumen) wurden 300 µl Puffer QG (3 Volumen) dazugegeben. Der Ansatz wurde 10 min bei 50 °C inkubiert und dabei alle 2-3 Minuten durchmischt. Anschließend wurden dem Ansatz pro 100 mg Gel 100 µl Isopropanol hinzugefügt und gemischt. Der Ansatz wurde auf die QIAquick Säule in einem 2 ml Sammelgefäß gegeben und für 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und dieser Schritt wurde mit 500 µl Puffer QG wiederholt. Für den Waschschrift wurden 750 µl Puffer PE auf die Säule gegeben und zweimal 1 Minute bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Filtrat wurde zwischen den Waschschriften verworfen. Für die Elution wurden 30-50 µl Tris-HCl (pH 8.5) oder H₂O direkt auf die Membran gegeben. Durch Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 rpm wurde die DNA nach 1 Minute Einwirkzeit in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß eluiert.

2.3.6 Combined Bisulfit Restriction Analysis – COBRA

COBRA (Xiong et Laird, 1997) ist eine quantitative Methode, um DNA-Methylierung an bestimmten Gen Loci nachzuweisen. Bei dieser Methode werden Restriktionsendonukleasen nach Bisulfit-Behandlung benutzt, um methylierungsabhängige Sequenzunterschiede zu zeigen. In dieser Arbeit wurde die Restriktionsendonuklease *Hinf* I mit der Schnittstelle 5´GANTC 3´ verwendet. *Hinf* I

kann das PCR-Produkt in kleinere Fragmente schneiden, wenn innerhalb des DR+12 Motivs eine methylierte CpG Site zu finden ist. Ist die CpG Site jedoch nicht methyliert und daher durch Bisulfit zu T modifiziert worden, so kann *Hinf I* das PCR-Produkt nicht schneiden, da keine Schnittstelle vorliegt.

- Schnittstelle *Hinf I*: 5'...G[▼]A N T **C**...3'
3'...C T N A **▲**G...5'

5' -ttc <u>tgacct</u> gactccttcccc <u>tgacc</u> gggg -3'	Originalsequenz (s)
3' -aag <u>actgga</u> ctgaggaagggg <u>actggg</u> cccc -5'	Originalsequenz (as)
5' -ttt t ga tt tga tttttttt tga ttt gggg -3'	Bisulfit Sequenz (s) ohne CpG
3' -aaaactaaactaaaaaaaaa <u>actaa</u> cccc -5'	Bisulfit Sequenz (as)
5' -ttt t ga tt tga tttttttt tga ttc gggg -3'	Bisulfit Sequenz (s) mit CpG
3' -aaaactaaactaaaaaaaaa <u>actaag</u> cccc -5'	Bisulfit Sequenz (as)

Abbildung 8: COBRA mit *Hinf I*; **fett und unterstrichene** Buchstaben in Original-Promotorsequenz repräsentieren das DR+12 Motiv; **t** in Bisulfit Sequenz (s) repräsentieren modifizierte, nichtmethylierte C und die unterstrichenen Buchstaben die *Hinf I*-Schnittstelle

Protokoll Restriktion:

Zu 22 µl PCR-Produkt wurden 3 µl NEB-Puffer 2 und 5 µl (50U) *Hinf I* zugegeben. Der Restriktionsansatz wurde für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die nicht verdauten PCR-Produkte und die Restriktionsansätze nebeneinander auf ein 2.5% Agarosegel aufgetragen.

Ist eine Probe innerhalb der DR+12 Site vollständig methyliert, so wird das PCR-Produkt in zwei Fragmente gespalten. Diese werden als Banden mit einer Größe von 70 bp und 176 bp im Agarosegel sichtbar.

Liegen in einer Probe jedoch methylierte sowie nicht methylierte CpG Moleküle vor, deutet dies auf eine partielle Methylierung der Promotorregion hin. Im Agarosegel werden drei Banden sichtbar: 70 bp, 176 bp und 246 bp.

Ist eine Restriktion nicht möglich, so befindet sich an der Restriktionsschnittstelle kein C, sondern ein T. Die Probe ist somit nicht methyliert und im Gel wird eine Bande bei 246 bp sichtbar.

2.3.7 TOPO-Cloning

Der einzige Weg um DNA-Methylierungsmuster mit einzelner Molekül- und einzelner Basenauflösung zu bestimmen, ist die PCR-Produkte in geeignete Vektoren zu klonieren, um anschließend die Inserts der individuellen Klone zu sequenzieren (Grunau et al., 2001).

Alle Klonierungen wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit for Sequencing der Firma Invitrogen durchgeführt. Die Plasmidvektoren im Kit (pCR[®]-4 TOPO[®]) liegen linearisiert vor und besitzen Thymidin-Überhänge an den 3'-Enden (= T-tail Vektoren), an die das Enzym Topoisomerase I gebunden ist. Die Ligation des PCR-Produkts in das Plasmid erfolgt über die Bindung der von der Taq-Polymerase an die 3'-Enden des amplifizierten PCR-Produkts angehängten Poly A- Enden mit den Thymidin-Überhängen des Vektors und wird durch die Topoisomerase I vermittelt (Shuman, 1994).

Protokoll: TOPO Cloning Reaktion: Zu 4 µl PCR-Produkt (nicht älter als 4 Stunden, finale Extension 10 statt 4 Minuten) wurden 1 µl Salt Solution und 0.5 µl TOPO Vektor (auf Hälfte des vom Hersteller empfohlenen Ansatzes reduziert) hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit 0.5 µl sterilem Wasser zu einem 6 µl-Ansatz aufgefüllt, vorsichtig gemischt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis zwischengelagert.

Anschließend wurde der Ligationsansatz nach dem "One Shot Chemical Transformation Protocol" des Herstellers in One Shot TOP10 chemisch kompetente E.coli transformiert: 2 µl der Cloning-Reaktion wurden zu einem Aliquot (25 µl) kompetenter E.coli gegeben und vorsichtig gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Mittels Hitzeschock wurden die Plasmide in die Bakterien importiert. Dazu wurde der Transformationsansatz für 30 Sekunden bei 42 °C inkubiert und danach sofort wieder auf Eis gelagert. Für das Bakterienwachstum wurden 250 µl S.O.C. Medium dazugegeben und die Ansätze 1 Stunde bei 37 °C und 200 rpm im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 50 µl des Ansatzes auf vorgewärmte LB- Amp⁺ Agarplatten (50 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diejenigen Bakterien, die

Plasmide aufgenommen haben, besitzen jetzt eine durch β -Laktamase vermittelte Ampicillinresistenz und können über dieses Antibiotikum selektiert werden.

2.3.8 Kolonie-PCR

Die Klone wurden mittels PCR analysiert („Kolonie-PCR“) und anschließend die PCR-Produkte der Inserts weiterverarbeitet. Dazu wurden die Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen angestochen und in 150 μ l H₂O geschwenkt. Dieses „Bakterien-Wasser“ diente als Template für die Kolonie-PCR. Pro Probe wurden 12 Klone in Bakterien-Wasser asserviert. Für die Kolonie-PCR wurden die Primer M13 Forward und M13 Reverse gewählt (Sequenz siehe 2.2.8), deren Bindungsstellen innerhalb der Vektorsequenz liegen und die TOPO Cloning Site umschließen. Das erwartete PCR-Produkt inklusive 5'D1-Promotor-Sequenz besitzt eine Größe von 411 bp.

Die Analyse der isolierten Klone erfolgte in einem 30 μ l PCR-Ansatz. Als Template wurde 1 μ l des Wassers, in dem die Kolonien lysiert wurden, eingesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes entspricht 2.3.4. Die Reaktion erfolgte mit 29 Zyklen bei einer Annealing-Temperatur von 55 °C. Zur Darstellung der PCR-Produkte wurden 5 μ l in einem 1.5%igen Agarosegel aufgetrennt (s. 2.3.5). Die Sequenzierung des amplifizierten 411 bp-Produkts erforderte zunächst eine Aufreinigung, die nach der Exo/Sap-Methode leicht durchzuführen war.

2.3.9 Exo/Sap-Aufreinigung von PCR-Produkten

Mit der enzymatischen Exo/Sap-Aufreinigung wurden die PCR-Produkte der analysierten Klone („Kolonie-PCR“) aufgereinigt (s. 2.3.8).

Hierzu benötigt man nur zwei Enzyme: Exonuclease I (E. coli) und Shrimp Alkaline Phosphatase (Sap). Exonuclease I eliminiert überschüssige einzelsträngige DNA am 3'-Ende ($3' \rightarrow 5'$). Durch die hydrolytischen Eigenschaften der Sap werden alle überschüssigen dNTPs der PCR Reaktion dephosphoryliert. Kombiniert man diese beiden Enzyme, so hat man ein alternatives schnelles und günstiges Aufreinigungsverfahren, das gut in Sequenzierreaktionen eingesetzt werden kann (Werle et al., 1994).

Protokoll: Zu 8 μ l PCR-Ansatz wurden 3 μ l Enzym-Mix in ein PCR-Gefäß gegeben. Dieser Mix bestand aus 0.09 μ l Exo I (\approx 1.8U), 0.32 μ l Sap (\approx 0.32U) und 1.75 μ l Wasser. Der Ansatz wurde 35 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend für 15 Minuten bei 80 °C.

2.3.10 Sequenzierung

Das Didesoxyverfahren ist die Methode der Wahl für das Sequenzieren von klonierter oder PCR amplifizierter DNA (Grunau et al., 2001). Dieses von Frederick Sanger (Sanger et al., 1977) entwickelte Verfahren zur Bestimmung von DNA-Sequenzen beruht auf kontrollierter Unterbrechung der enzymatischen DNA-Replikation. In dieser Arbeit wurden die Proben mit einem ABI 3730 DNA Analyzer der Firma Applied Biosystems untersucht. Dieses Gerät beruht auf automatisierter Fluoreszenz-DNA-Sequenzierung.

Die zu sequenzierende DNA dient als Template, an die sich ein Primer anlagert, um die Amplifikation zu beginnen. Diese Methode wird auch als zyklische Sequenzierung (cycle-sequencing) bezeichnet. Jede Probe muss diesen Schritt durchlaufen, um amplifiziert und mit fluoreszierenden Farbstoffen markiert zu werden, die der Sequencer später mit einem Laser detektiert. In diesem cycle-sequencing Ansatz werden die zu sequenzierende DNA und ein ihr komplementärer Primer mit DNA Polymerase, dNTPs, fluoreszenzmarkierten 2',3'- Didesoxynukleotiden (ddNTPs) und Puffer zusammengemischt. Jedem ddNTP wird ein anderer Farbstoff zugewiesen. Wie die PCR besteht diese Reaktion aus drei Schritten: Denaturierung (96 °C), Primer Anlagerung (55 °C) und DNA Extension (60 °C). Der Kettenabbruch geschieht während dieses Extensionsschrittes. Wird ein ddNTP in den wachsenden Strang eingebaut, ist eine weitere Verlängerung des DNA Stranges nicht mehr möglich, da keine freie 3'-OH-Gruppe mehr zur Verfügung steht. Dies resultiert in DNA Fragmenten unterschiedlicher Länge, die an ihrem 3'-Ende jeweils eine markierte Base enthalten. Anschließend werden diese Fragmente mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. In dem ABI 3730 geschieht dies über POP-7TM (performance optimized polymer) als Gelmatrix. Wenn die Fragmente sich dem Ende der Kapillare nähern, detektiert der Laser die unterschiedlich emittierenden Farbstoffe. Daraus bestimmt die Software die Abfolge der Basen.

Für die Sequenzieransätze wurde das ABI PRISM[®] BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Als Sequenzierungs-Primer wurden M13 Forward und M13 Reverse gewählt (Sequenz siehe 2.2.8).

Protokoll: Je Ansatz wurden in ein PCR-Gefäß gegeben:

DNA	2.0 µl PCR-Produkt (10 ng/100 bp; Plasmide: 500-700 ng)
5× Sequencing Puffer	1.75 µl
Primer (10 µM)	0.125 µl
BigDye	0.5 µl
	H ₂ O dest. ad 10 µl

40-50 ng Template (PCR-Produkt 411 bp) entsprechen ungefähr 2 µl eines PCR-Produkts, das im Agarosegel als deutliche Bande zu identifizieren war.

Das cycle-sequencing Programm des Thermocyclers lautet:

30 Zyklen	96 °C	10 Sek.
	55 °C	5 Sek.
	60 °C	4 Min.

2.3.11 Aufreinigung der Sequenzierreaktion mit Sephadex G-50

Vor der Beladung des Sequencers wurden die Proben mit Sephadex (Amersham Biosciences) gereinigt. Das gereinigte Produkt wurde anschließend direkt auf die Ladeplatte des Sequencers gegeben.

Durch Sephadex, ein hydratisiertes Kohlenhydratpolymer, ist es möglich, DNA aus PCR von Verunreinigungen durch dNTPs, Primer, Taq-Polymerase, Farbstoffen und anderen Stoffen der PCR nach dem Prinzip der Gelfiltrationschromatographie zu reinigen.

Als Vorbereitung wurde in eine 96-well-Platte Sephadex G-50 Superfine eingefüllt, mit H₂O versetzt und 3 h quellen gelassen. Die Sephadexplatte wurde vor dem Gebrauch bei 2000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Anschließend wurde die Sequenzierreaktion auf die Sephadexplatte aufgetragen und im folgenden Zentrifugationsschritt (2000 rpm, 5 Min.) gereinigt.

Sowohl die Sephadex Aufreinigung als auch die Sequenzierung mit dem ABI 3730 DNA Analyzer erfolgten im Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Functional Genetics and Genomics Group, Berlin Buch.

2.3.12 Statistische Auswertung und benutzte Software

Alle Versuche wurden mehrfach erfolgreich durchgeführt. Als Programm zur Ermittlung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde Microsoft Excel 2000 verwendet. Zur Auswertung, Analyse und Dokumentation der Sequenzen wurde die Software Chromas Version 2.23, Technelysium Pty Ltd (Tewantin, Australien) verwendet. Zur Erstellung von Graphen und statistischen Bewertung (Student's t-test, One-way ANOVA) wurde die Software GraphPad Prism 5.02 benutzt.

Für die Untersuchungen dieser Arbeit stand eine limitierte Anzahl an gDNA-Proben mit unterschiedlichen Stichprobengrößen der einzelnen Tumorentitäten zur Verfügung. Die untersuchten Schilddrüsenkarzinomproben und die als Kontrollgruppe herangezogenen post mortem Schilddrüsengewebeproben erlauben eine grundsätzliche Überprüfung unterschiedlicher Verfahren zur Analyse des Methylierungsstatus interessierender regulatorischer Elemente im menschlichen 5'D1-Promotor. Mögliche und interessant zu untersuchende Variablen wie Tumorstadium, Alter und Geschlecht der Patienten standen leider nicht zur Verfügung. Die Schilddrüsenkarzinomproben wurden in histologische Gruppen eingeteilt und untersucht. Als Variable stand somit die histologische Einteilung zur Verfügung. Diese Vorarbeiten würden nun weitere systematische Analysen ermöglichen und verleihen dieser Arbeit Pilotcharakter zur Beantwortung der in der Einleitung gestellten Fragen.

3 Ergebnisse

3.1 Experimentelle Ermittlung der PCR-Bedingungen

Es wurden für jede Probe der Schilddrüsenkarzinomgewebe, der humanen Schilddrüsenngewebe und der Zelllinien die PCR-Bedingungen experimentell bestimmt. Die PCR-Reaktionsansätze sind in 2.3.4 beschrieben.

Für die 1. PCR mit dem äußeren Primer-Paar –286s/+71as wurde eine Annealing-Temperatur (T_m) zwischen 55 °C und 53 °C als günstig ermittelt. Für die 2. PCR mit 1 µl der 1. PCR als Template und dem inneren Primer-Paar –286s/-40as ist die Annealing-Temperatur 5 °C unter der der jeweiligen 1. PCR zu wählen. Die T_m für die 2. PCR liegt somit zwischen 50 °C und 48 °C. Abbildung 9 zeigt die Gelelektrophorese einer erfolgreichen „Nested-PCR“. Es zeigte sich, dass nicht alle Proben bei der gleichen T_m optimal zu amplifizieren waren.

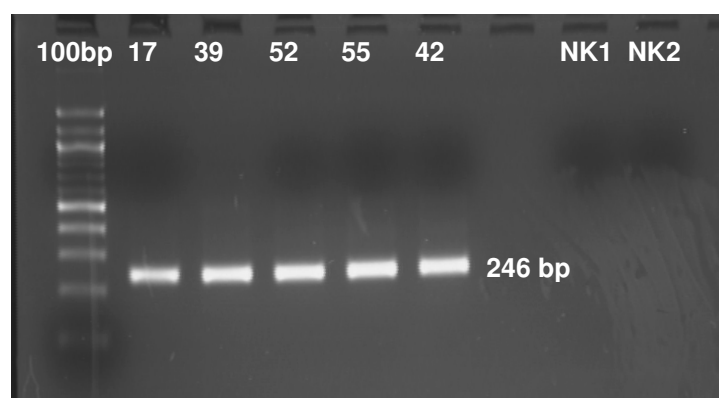


Abbildung 9: „Nested-PCR“ Schilddrüsenkarzinomgewebeproben 17, 39 52, 55 und 42; 1.5% Agarosegel in 1× TAE-Puffer; 2.5 µg Ethidiumbromid in 100 ml Gel; NK1 und NK2 Negativkontrollen 1. und 2. PCR

Probe	Primer-Paar	Annealing-Temperatur	Reaktionszyklen
17, 39, 52, 55	-286s/+71as	55 °C	35 (1. PCR)
	-286s/-40as	50 °C	40 (2. PCR)
42	-286s/+71as	53 °C	35 (1. PCR)
	-286s/-40as	48 °C	40 (2. PCR)

Tabelle 1: PCR Bedingungen der in Abbildung 9 gezeigten Schilddrüsenkarzinomgewebeproben

Probe	Tumor (Art)	1. PCR Tm	2. PCR Tm
(10) 1	MTC	55 °C	50 °C
(11) 2	MTC	55 °C	50 °C
(12) 3	MTC	55 °C	50 °C
(13) 4	MTC	55 °C	50 °C
(20) 5	MTC	53 °C	48 °C
(21) 6	MTC	53 °C	48 °C
(14) 1	FTC	55 °C	50 °C
(24) 2	FTC	55 °C	50 °C
(40) 3	FTC	53 °C	48 °C
(45) 4	FTC	53 °C	48 °C
(46) 5	FTC	55 °C	50 °C
(48) 6	FTC	55 °C	50 °C
(50) 7	FTC	55 °C	50 °C
(52) 8	FTC	55 °C	50 °C
(16) 1	UTC	55 °C	50 °C
(17) 2	UTC	55 °C	50 °C
(25)	PDTC	53 °C	48 °C
(26) 3	UTC	55 °C	50 °C
(27) 4	UTC	53 °C	48 °C
(38) -	UTC	55 °C	50 °C
(42) 5	UTC	53 °C	48 °C
(43) 6	UTC	53 °C	48 °C
(44) 7	UTC	53 °C	48 °C
(54) 8	UTC	55 °C	50 °C
(22) 1	PTC	55 °C	50 °C
(28) 2	PTC	53 °C	48 °C
(29) 3	PTC	53 °C	48 °C
(30) 4	PTC	55 °C	50 °C
(31) 5	PTC	55 °C	50 °C
(36) 6	PTC	55 °C	50 °C
(37) 7	PTC	55 °C	50 °C
(39) 8	PTC	55 °C	50 °C
(41) 9	PTC	53 °C	48 °C
(47) 10	PTC	55 °C	50 °C
(49) 11	PTC	55 °C	50 °C
(51) 12	PTC	55 °C	50 °C
(53) 13	PTC	55 °C	50 °C
(55) 14	PTC	55 °C	50 °C

Tabelle 2: Zusammenstellung der Annealing-Temperaturen (Tm) der „Nested-PCR“ für alle Schilddrüsenkarzinomgewebeproben; die in Klammern gesetzte Nummer ist die Nummerierung aus Halle (Schagdarsurengin et al., 2002), die dahinter stehende Nummer die in dieser Arbeit weiter verwendete Nummerierung.

3.2 Bisulfit Behandlung

Nach einer erfolgreich durchgeführten Bisulfit Reaktion und anschließender PCR liegen alle Cytosine als Thymin vor. 5-Methyl-Cytosin (^{5m}C) wird nicht modifiziert und liegt weiterhin als C vor (siehe 2.3.2). Um die umfangreiche Modifizierung der DNA darzustellen, folgen zwei Abbildungen mit einem Ausschnitt der 5'D1-Promotorsequenz im Bereich des inneren Primer-Paares -286s/-40as.

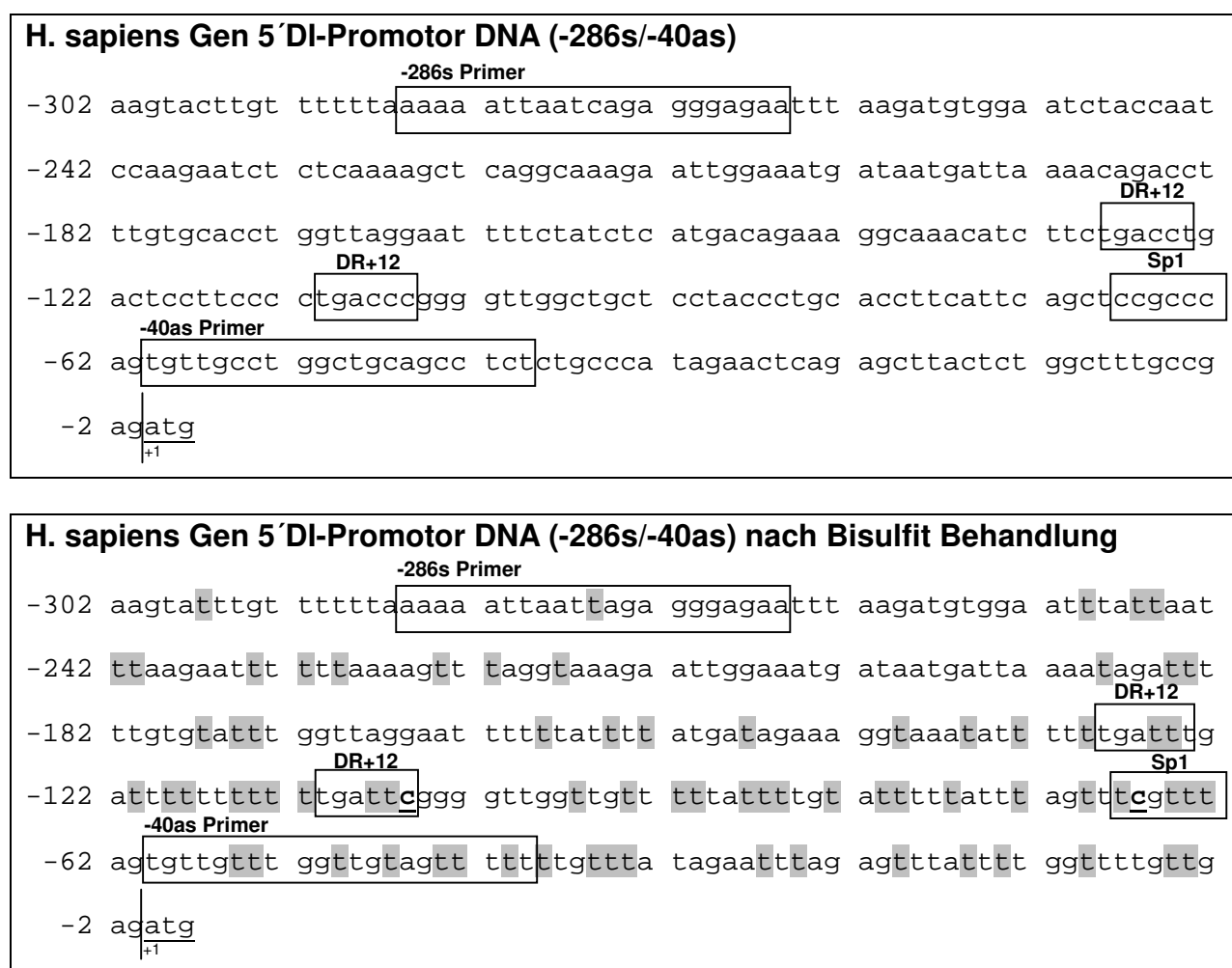


Abbildung 10: Ausschnitt H. sapiens Gen 5'D1-Promotor DNA im Bereich des inneren Primer-Paares -286s/-40as vor und nach der Bisulfit-Behandlung; **T** repräsentieren durch die Bisulfit-Reaktion modifiziertes Cytosin und **c** 5-Methyl-Cytosin, das vor dieser Reaktion geschützt ist

Anhand der Sequenzen kann verglichen werden, ob die durch Bisulfit katalysierte Konversion des Cytosin zu Uracil vollständig erfolgt ist. Dies wird nach der PCR-Amplifikation durch ein Thymin widerspiegelt. Bei allen analysierten Proben war die Konversion vollständig, was für die weiteren Analysen Voraussetzung war.

3.3 COBRA

Ziel der COBRA war es, schnell und einfach einen Hinweis auf den Methylierungsgrad des DR+12 Motivs im 5´D1-Promotor zu erhalten. Das Prinzip und das Protokoll der COBRA sind in 2.3.6 beschrieben.

Diese Analyse des DR+12 Motivs wurde an einer humanen Schilddrüse (post mortem Gewebe, makroskopisch unauffällig), den Zelllinien FTC-133, HTh 74, Hep G2, den Schilddrüsenkarzinomgeweben sowie an zwei in der Sequenzierung als methyliert (m) und nicht methyliert (u) identifizierten Klonen durchgeführt. Die Experimente wurden wiederholt (2-3mal pro Probe) und sowohl mit 30U, als auch mit 50U *Hinf* I durchgeführt. Dies änderte das Ergebnis nicht, und die Ergebnisse waren reproduzierbar.

3.3.1 Kontrollen

Als Kontrolle wurden zwei in der Sequenzierung als methyliert (m) und nicht methyliert (u) identifizierte Klone mit *Hinf* I verdaut.

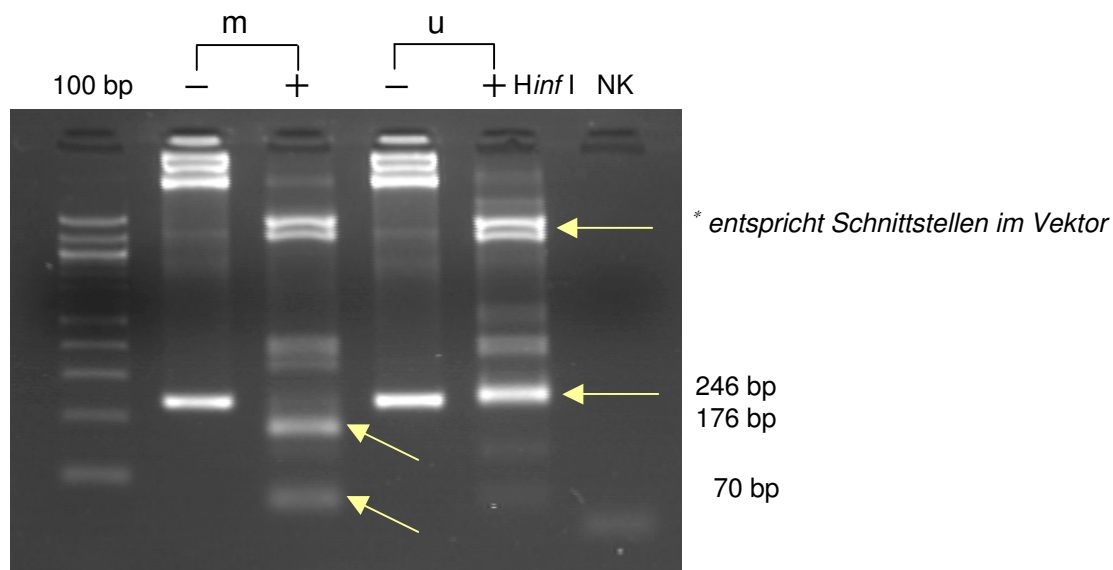


Abbildung 11: Vergleich eines methylierten (m) und nicht methylierten (u) Klon vor (-) und nach (+) Restriktion mit *Hinf* I; 2,5% Agarosegel in 1× TAE-Puffer; NK: Negativkontrolle

Abbildung 11 zeigt die vollständige Restriktion eines methylierten DR+12-Motivs durch *Hinf* I. Ein methyliertes DR+12-Motiv wird in zwei Banden mit einer Größe von 176 bp und 70 bp gespalten. Wäre eine Bande bei der unverdauten Probe sichtbar, so müsste man davon ausgehen, dass die Restriktionsbedingungen nicht strikt genug gewählt worden sind, da Probe m mittels Sequenzierung als eindeutig methyliert identifiziert

worden ist. Somit sind die gewählten Versuchsbedingungen geeignet, um vollständig methylierte Proben von partiell methylierten oder unmethylierten zu unterscheiden. Eine partielle Methylierung der DR+12 Site deutet somit auf das Vorhandensein von sowohl methylierten als auch nicht methylierten Molekülen hin und nicht auf eine unzureichende Restriktion. Eine im DR+12-Motiv nicht methylierte Probe (Klon u) wird nicht geschnitten, da die *Hinf* I-Schnittstelle modifiziert wurde. Im Agarosegel ist nur eine Bande bei 246 bp sichtbar.

3.3.2 Zelllinien und post mortem Schilddrüsengewebe

Auf der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der COBRA der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie HTh 74, der Zelllinie Hep G2 eines Hepatozellulären Karzinoms sowie der follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 zu sehen.

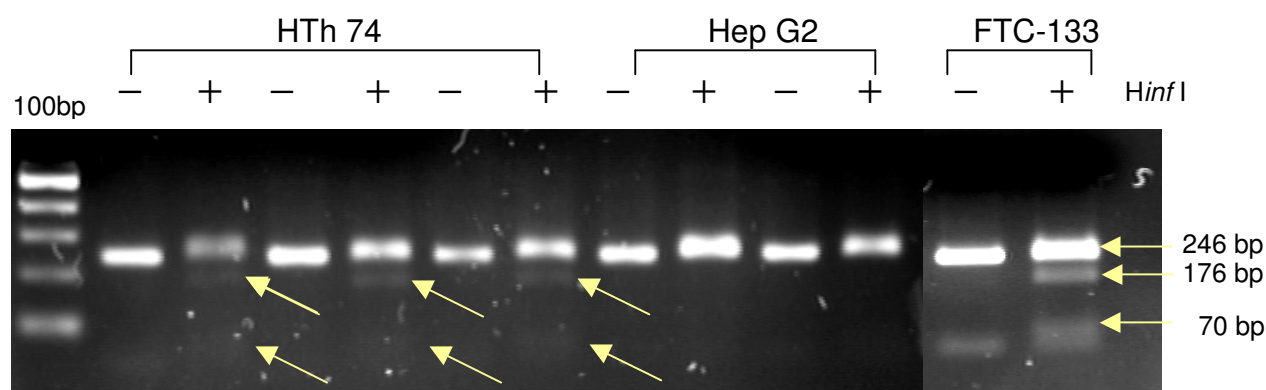


Abbildung 12: Zelllinien HTh 74, Hep G2 und FTC-133 vor (-) und nach (+) Restriktion mit *Hinf* I; 2.5% Agarosegel in 1× TAE-Puffer

Bei der Zelllinie HTh 74 werden nach der Restriktion drei Banden diskret sichtbar, was auf eine schwache partielle Methylierung des DR+12-Motivs hindeutet. Bei Hep G2 hingegen hat keine Restriktion stattgefunden. Hier scheint das DR+12-Motiv nicht methyliert zu sein. Die follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 zeigt ebenfalls eine etwas deutlichere partielle Methylierung des DR+12-Motivs.

Bei der humanen Schilddrüsengewebeprobe (post mortem Gewebe) zeigte sich in der COBRA ebenfalls keine Restriktion, was für ein unmethyliertes DR+12-Motiv dieser Probe spricht.

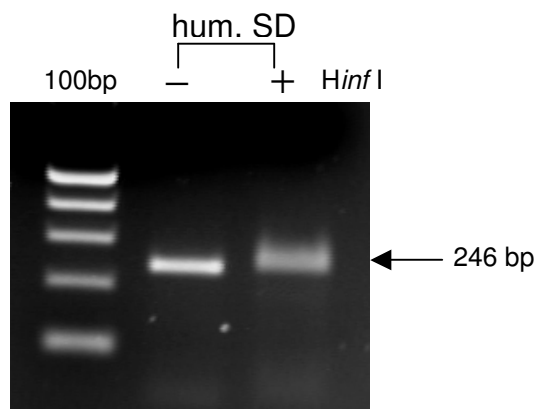


Abbildung 13: PCR-Amplifikation Bisulfit behandelte DNA aus humanem post mortem Schilddrüsengewebe (hum. SD) vor (-) und nach (+) Hinf I-Restriktion.

3.3.3 Schilddrüsenkarzinomgewebe

Die genaue Beurteilung der COBRA Ergebnisse der Schilddrüsenkarzinomproben war nicht immer eindeutig und deshalb schwer einzuschätzen, da die Banden häufig nur diskret sichtbar waren. Auf den folgenden Abbildungen sind Beispiele für Schilddrüsenkarzinomproben, die im DR+12-Motiv als partiell methyliert eingestuft wurden, sowie Proben, die als nicht methyliert beurteilt wurden.

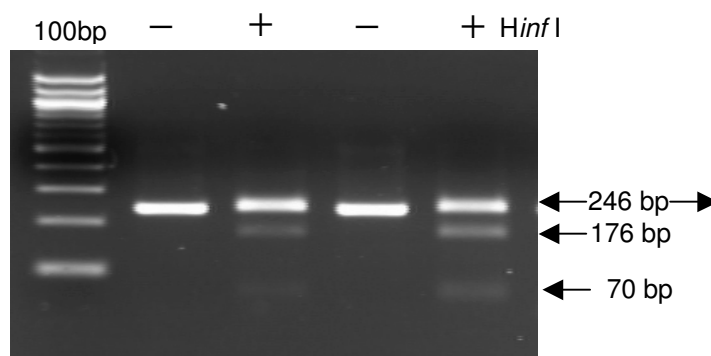


Abbildung 14

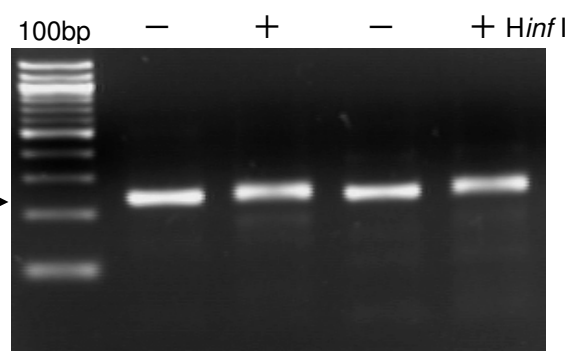


Abbildung 15

PCR-Amplifikation Bisulfit behandelte DNA aus Schilddrüsenkarzinomproben vor (-) und nach (+) Hinf I-Restriktion; Abbildung 14 zeigt partielle Methylierung des DR+12-Motivs und Abbildung 15 ein nicht methyliertes DR+12-Motiv; 2.5% Agarosegel in 1x TAE-Puffer

Übersicht über Beurteilung der COBRA Ergebnisse: Von den insgesamt sechs MTC erwiesen sich fünf Proben als nicht methyliert, während eine Probe methyliert zu sein schien. Von den acht FTC waren vier partiell methyliert und vier nicht methyliert. Bei den UTC und PDTC, insgesamt zehn Proben, zeigten acht Proben eine partielle Methylierung und zwei keine Methylierung. Von den 14 PTC wiesen neun auf eine partielle und fünf auf keine Methylierung hin.

3.4 Direkte Sequenzierung der PCR Produkte

Das 246 bp lange Amplifikationsprodukt aus den Schilddrüsenkarzinomproben wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (siehe 2.3.5). Diese Produkte wurden in die zyklische Sequenzierungsreaktion eingesetzt (siehe 2.3.9), danach mit Sephadex gereinigt (siehe 2.3.10) und sequenziert.

Es zeigten sich nicht immer eindeutige Sequenzen, da es sich nicht um eine „single cell PCR“ handelte und auch die Allele unterschiedlich methyliert sein können. Insgesamt war die Qualität der Sequenzen in einigen Fällen nicht ausreichend, um eine Methylierungsanalyse vornehmen zu können.

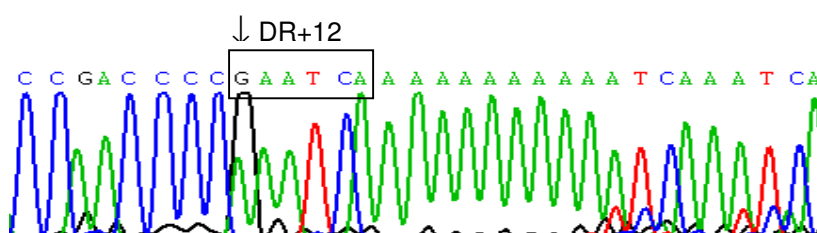


Abbildung 16: direkte Sequenzierung PCR-Produkt (antisense), DR+12 methyliert

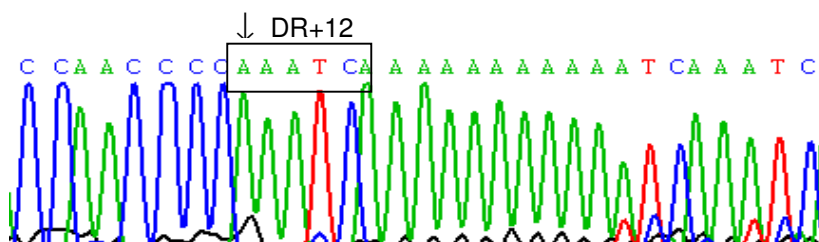


Abbildung 17: direkte Sequenzierung PCR-Produkt (antisense), DR+12 nicht methyliert

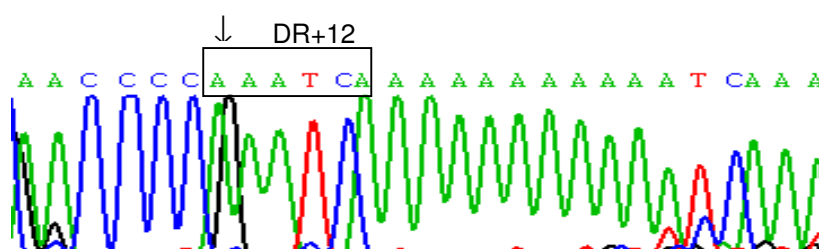


Abbildung 18: direkte Sequenzierung PCR-Produkt (antisense), DR+12 partiell methyliert (?)

Abbildungen 16, 17 und 18 sind Beispielsequenzen für die Bewertung der direkten Sequenzierung der PCR-Produkte. Abbildung 16 zeigt eine als methyliert eingestufte Sequenz, Abbildung 17 eine nicht methylierte Sequenz. In Abbildung 18 ist sowohl das A-Signal als auch das G-Signal gleich hoch. Die hier gezeigte Sequenz wurde deswegen als eine partiell methylierte Probe interpretiert.

Da diese Methode keine genaue Beurteilung des Methylierungsstatus zulässt, wurden die Proben subkloniert, um eine eindeutigere Zuordnung zu ermöglichen.

3.5 Sequenzanalyse der Klone

Um das DNA-Methylierungsmuster des 5'D1 Promotors zu bestimmen, wurden die Proben in einen TOPO Vektor kloniert (2.3.7), mittels PCR analysiert (2.3.8), nach der Exo/Sap-Methode (2.3.9) gereinigt und schließlich in die Sequenzierreaktion eingesetzt (2.3.10). Diese Produkte wurden mit Sephadex gereinigt (2.3.11) und auf den Sequencer geladen.

Es wurden für jede Probe zehn bis zwölf Klone analysiert, um ein Minimum von 10% Methylierung zu detektieren. Diese Methode lieferte genaue Methylierungsmuster der DR+12 und Sp1 Motive im 5'D1 Promotor.

Die folgenden Abbildungen zeigen zwei Beispielsequenzen, in der das DR+12-Motiv nicht methyliert ist, jedoch das Sp1 Motiv.

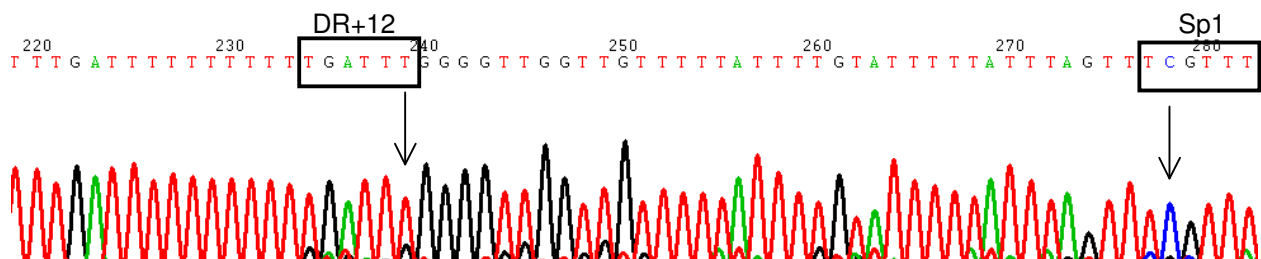


Abbildung 19: Sequenz einer subklonierten Probe (s); DR+12 nicht methyliert (T), Sp1 methyliert (C)

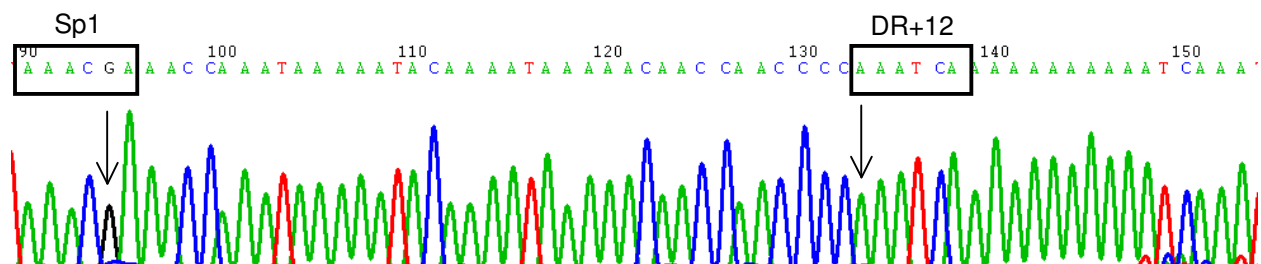


Abbildung 20: Sequenz einer subklonierten Probe (as); DR+12 nicht methyliert (A), Sp1 methyliert (G)

In Abbildung 21 sind in Box Plots die Ergebnisse für die Schilddrüsenkarzinomproben für die DR+12 und Sp1 Bindungsstelle im D1-Promotor zusammengefasst. Median und Mittelwert der methylierten Klone werden für jede Tumorentität dargestellt, die bei den UTC/ PDTC für beide Elemente am höchsten waren. Eine statistische Signifikanz konnte mit den zur Verfügung stehenden gDNA-Proben in dieser Pilotarbeit nicht dargestellt werden.

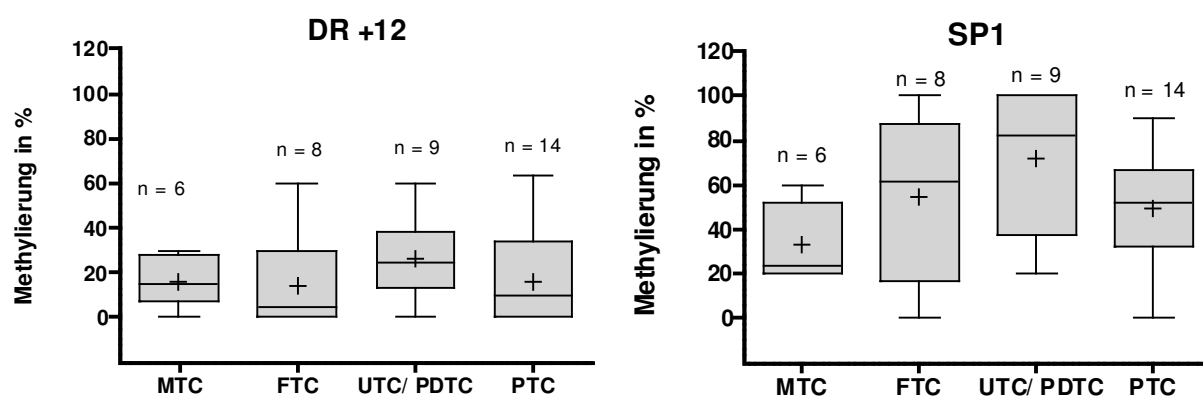


Abbildung 21: In den Box Plots ist der Anteil der methylierten Klone durch die Anzahl der analysierten Klone in Prozent pro untersuchter Tumorgewebeprobe der verschiedenen histologischen Tumorentitäten für das DR+12 Motiv und die Sp1 Sequenz im 5'D1-Promotor dargestellt. Die Anzahl n der analysierten Tumorgewebeproben pro Tumorart wird über den Balken angegeben. Der Median wird dargestellt und der Mittelwert zusätzlich durch + markiert.

3.5.1 Ergebnis der Analysen der medullären Schilddrüsenkarzinome (MTC) – Sequenzanalyse der Klone

Probe	Anzahl analysierter Klone	DR+12 methyliert	Sp1 methyliert
MTC-1	11	3	3
MTC-2	10	3	6
MTC-3	10	1	5
MTC-4	10	1	2
MTC-5	10	2	2
MTC-6	10	0	2
Σ MTC	61	10	20

Tabelle: 3 Übersicht der Sequenzanalysen der MTC

Von den sechs MTC wurden jeweils 10 – 11 Klone hinsichtlich ihres Methylierungsstatus im DR+12 bzw. Sp1-Motiv analysiert. Tabelle 3 stellt die

Ergebnisse in der Übersicht dar. Von den 61 untersuchten Klonen zeigten 10 eine Methylierung des DR+12-Motivs (16.4%) wobei individuell 0 – 3 Methylierungen pro Probe detektiert wurden. Die Methylierung des Sp1-Motivs liegt um den Faktor 2 höher (32.8%) mit 2 - 6 Methylierungen pro analysierter Probe. Insgesamt weisen sowohl das DR+12 als auch das Sp1-Motiv einen eher geringen Methylierungsgrad auf.

3.5.2 Ergebnis der Analysen der follikulären Schilddrüsenkarzinome (FTC) – Sequenzanalyse der Klone

Probe	Anzahl analysierter Klone	DR+12 methyliert	Sp1 methyliert
FTC-1	11	1	4
FTC-2	10	1	6
FTC-3	10	0	8
FTC-4	10	6	9
FTC-5	11	0	11
FTC-6	10	0	1
FTC-7	11	0	1
FTC-8	11	4	7
Σ FTC	84	12	47

Tabelle: 4 Übersicht der Sequenzanalysen der FTC

Pro Probe der insgesamt acht untersuchten FTC wurden ebenfalls 10 – 11 Klone bezüglich der Methylierung der interessierenden Promotorbereiche analysiert. Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse der FTC. Von den 84 analysierten Klonen wiesen 12 eine Methylierung des DR+12-Motivs auf (14.3%). Die Spannweite lag hier zwischen 0 - 6 methylierten Klonen pro Probe. Vier der Tumorproben waren im DR+12-Motiv vollständig nicht methyliert. Die Sp1 Site zeigte insgesamt einen steigenden und ca. 4fach höheren Methylierungsgrad mit 1 - 11 Methylierungen pro untersuchter Probe (56% der 84 Klone). Eine Tumorprobe zeigte eine vollständige Methylierung der Sp1 Site.

3.5.3 Ergebnis der Analysen der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome inklusive einem gering differenzierten Schilddrüsenkarzinom (UTC und PDTC) – Sequenzanalyse der Klone

Probe	Anzahl analysierter Klone	DR+12 methyliert	Sp1 methyliert
UTC-1	11	1	8
UTC-2	10	2	10
UTC-3	10	0	2
UTC-4	12	3	3
UTC-5	10	6	10
UTC-6	10	4	10
UTC-7	11	4	11
UTC-8	10	3	5
PDTC	11	2	9
Σ UTC/PDTC	95	25	68

Tabelle: 5 Übersicht der Sequenzanalysen der UTC und des PDTC

Eine der insgesamt neun UTC Proben konnte nicht sequenziert werden, da keine ausreichende Anzahl an Klonen mit dem gewünschten Insert zur Verfügung stand. Tabelle 5 stellt die Ergebnisse der acht untersuchten UTC und des PDTC dar. Es wurden 10 – 12 Klone pro Tumorprobe bezüglich des Methylierungsstatus untersucht. Im DR+12-Motiv zeigten 25 der 95 analysierten Klone eine Methylierung (26.3%). Eine Tumorprobe war im DR+12-Motiv nicht methyliert. Eine hohe Methylierungsrate wurde für die Sp1 Site entdeckt mit 2 - 11 Methylierungen pro Probe (71.6% der 95 Klone). Vier Tumorproben zeigten an dieser Stelle eine vollständige Methylierung.

3.5.4 Ergebnis der Analysen der papillären Schilddrüsenkarzinome (PTC) – Sequenzanalyse der Klone

Probe	Anzahl analysierter Klone	DR+12 methyliert	Sp1 methyliert
PTC-1	11	0	0
PTC-2	11	7	9
PTC-3	12	0	2
PTC-4	10	4	9
PTC-5	12	4	9
PTC-6	12	0	6
PTC-7	11	1	7
PTC-8	11	1	6
PTC-9	11	0	4
PTC-10	10	0	6
PTC-11	10	1	4
PTC-12	10	1	3
PTC-13	11	4	6
PTC-14	12	2	4
Σ PTC	154	25	75

Tabelle: 6 Übersicht der Sequenzanalysen der PTC

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der 14 untersuchten PTC dargestellt. Es zeigte sich ein geringer Methylierungsgrad bezüglich des DR+12-Motivs mit 25 methylierten Klonen von insgesamt 154 analysierten Klonen (16.2%). Fünf Tumorproben wiesen keine Methylierung des DR+12-Motivs auf. Die individuelle Spannweite lag zwischen 0 - 7 methylierten Klone pro Probe. Ein 3fach höherer Methylierungsgrad (75 Methylierungen von 154, 48.7%) konnte für die Sp1 Site ermittelt werden mit 0 - 9 Methylierungen pro analysierter Probe.

3.5.5 Ergebnis der Analysen der Zelllinien – Sequenzanalyse der Klone

Zelllinie	Anzahl analysierter Klone	DR+12 methyliert	Sp1 methyliert
Hep G2 (1)	10	0	1
Hep G2 (2)	10	0	6
FTC-133 (1)	10	3	7
FTC-133 (2)	12	2	10
HTh 74	12	4	12

Tabelle: 7 Übersicht der Sequenzanalysen der Zelllinien

Eine Zusammenstellung der Ergebnisse der Versuche der Zelllinien wird in Tabelle 7 dargestellt. Von der hepatozellulären Karzinomzelllinie Hep G2 wurden zwei Proben kloniert und ausgewertet. Es wurden je 10 Klone pro Probe analysiert. Beide Proben wiesen im DR+12-Motiv keine Methylierung auf. Die Sp1 Site war bei beiden Proben unterschiedlich methyliert mit einem bzw. sechs methylierten Klonen.

Für die Auswertung der follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 wurden ebenfalls zwei Proben kloniert und analysiert. Hier wurden 10 und 12 Klone untersucht. Es zeigte sich eine geringe bis moderate Methylierung des DR+12-Motivs mit 3 bzw. 2 methylierten Klonen. Die Sp1 Site hingegen wies einen hohen Methylierungsgrad mit 7 und 10 methylierten Klonen auf.

Für die Analyse des Methylierungsstatus der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie HTh74 wurden 12 Klone ausgewertet. 4 Klone zeigten eine Methylierung des DR+12-Motivs, wohingegen eine vollständige Methylierung der Sp1 Site ermittelt werden konnte.

3.5.6 Ergebnis der Analysen der post mortem Schilddrüsengewebebe- proben – Sequenzanalyse der Klone

Probe	Anzahl analysierter Klone	DR+12 methyliert	Sp1 methyliert
1	11	1	5
2	11	4	7
3	7	0	2
4	10	1	4
5	12	0	4
6	9	2	8
Σ	60	8	30

*Tabelle: 8 Übersicht der Sequenzanalysen der post mortem Schilddrüsengewebebe-
proben*

Von den 6 post mortem Schilddrüsengewebebe-
proben wurden je 7 - 12 Klone untersucht.
Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengestellt. Es zeigte sich eine geringe
Methylierung des DR+12-Motivs (13.3%). Von insgesamt 60 analysierten Klonen
zeigten 8 eine Methylierung des DR+12-Motivs. 2 Proben waren an dieser Stelle nicht
methyliert. Für die Sp1 Site konnte ein höherer Methylierungsgrad ermittelt werden mit
30 methylierten Klonen von 60 untersuchten (50%).

3.6 Vergleich des Methylierungsstatus im DR+12-Motiv nach COBRA und nach Sequenzanalyse der subklonierten Proben

Folgende Tabellen zeigen eine Zusammenstellung der Ergebnisse des Methylierungsstatus des DR+12-Motivs nach COBRA und nach Sequenzanalyse der Klone und stellen einen direkten Vergleich der beiden Methoden dar.

MTC (n = 6)

Probe	COBRA	Sequenzanalyse
MTC-1	N	3/11
MTC-2	N	3/10
MTC-3	N	1/10
MTC-4	N	1/10
MTC-5	M	2/10
MTC-6	N	0/10

Tabelle 9

FTC (n = 8)

Probe	COBRA	Sequenzanalyse
FTC-1	P	1/11
FTC-2	N	1/10
FTC-3	P	0/10
FTC-4	P	6/10
FTC-5	N	0/11
FTC-6	P (schwach)	0/10
FTC-7	N	0/11
FTC-8	N	4/11

Tabelle 10

UTC und PDTC (n = 9)

Probe	COBRA	Sequenzanalyse
UTC-1	P	1/11
UTC-2	P	2/10
UTC-3	P	0/10
UTC-4	P	3/12
UTC-5	P	6/10
UTC-6	P	4/10
UTC-7	P	4/11
UTC-8	P	3/10
PDTC	N	2/11

Tabelle 11

PTC (n = 14)

Probe	COBRA	Sequenzanalyse
PTC-1	P	0/11
PTC-2	P	7/11
PTC-3	N	0/12
PTC-4	P	4/10
PTC-5	P	4/12
PTC-6	P	0/12
PTC-7	N	1/11
PTC-8	P (schwach)	1/11
PTC-9	P (schwach)	0/11
PTC-10	N	0/10
PTC-11	N	1/10
PTC-12	N	1/10
PTC-13	P	4/11
PTC-14	P	2/12

Tabelle 12

Zelllinien und Schilddrüsengewebe

Probe	COBRA	Sequenzanalyse
Hum.SD	N	8/60 (n=6)
Hep G2	N	0/20 (n=2)
FTC-133	P	5/22 (n=2)
HTh 74	P	4/12 (n=1)

Tabelle 13

Tab. 9-13:

P = partiell methyliert, N = nicht methyliert, M = methyliert

x/y: Anzahl der methylierten Klone von den insgesamt untersuchten Klonen

Hum. SD = post mortem Schilddrüsengewebe

4 Diskussion

4.1 *Einschätzung der angewandten Methoden*

Zur Analyse des menschlichen Typ I-5'-Deiodase Promotors wurden in dieser Dissertationsarbeit drei verschiedene Methoden angewandt. Diese umfassten die direkte Sequenzierung Bisulfit modifizierter PCR-Produkte, COBRA und Sequenzanalyse subklonierter PCR-Produkte. Die zuletzt genannte Methode wird in der Literatur derzeit als Goldstandard zur Überprüfung der DNA Methylierung an bestimmten Gen Loci angesehen (Dehan et al., 2009).

4.1.1 Direkte Sequenzierung

Eine erste wichtige Feststellung bei der Auswertung der Experimente war, dass die direkte Sequenzierung der PCR-Produkte nicht aussagekräftig war. Hier zeigten sich nicht immer eindeutige Sequenzen in Bezug auf die Methylierung der interessierenden CpG-Dinukleotide (vergleiche Abbildung 18 in Kapitel 3.4, S. 42). Bei der direkten DNA-Sequenzierung der Schilddrüsenkarzinomproben handelt es sich nicht um eine Einzelzell-PCR. Unterschiedlich methylierte Moleküle der gleichen Probe können amplifiziert werden und führen so zu nicht eindeutigen Signalen. Bei unterschiedlichen Methylierungsgraden und somit unterschiedlichen Sequenzen nach Bisulfitbehandlung (Cytosin versus Thymin in einer Sequenz) kann dies zu einer bevorzugten Amplifizierung einer Sequenz führen (Warnecke et al., 1997). Eine Verfälschung bzw. Verzerrung des Ergebnisses der PCR und damit inakkurate Einschätzung des Methylierungsstatus kann daraus resultieren. Da die meisten Zellen der Gewebeproben keine vollständige Methylierung oder vollständig fehlende Methylierung aufwiesen war die direkte Sequenzierung unzureichend, um quantitative Aussagen zum Methylierungsgrad treffen zu können.

4.1.2 Sequenzanalyse nach Subklonierung

Durch die Klonierung der PCR-Produkte in einen geeigneten Vektor konnten differenziertere Aussagen zur einzelnen Molekül- und Basenpaarauflösung gemacht werden. In dieser Arbeit wurden mindestens 10 Klone pro Probe untersucht, um einen Methylierungsgrad von 10% zu detektieren. Um noch genauere Einschätzungen machen zu können, müssten mehr Klone pro Probe untersucht werden. Auch mit nur 10 auszuwertenden Klonen pro Probe ist diese Methode sehr arbeits- und kostenintensiv.

Für jeden Klon wurden die sense und antisense Sequenz ausgewertet. Ein weiterer Vorteil dieses derzeitigen Goldstandards ist die Möglichkeit mehrere CpG-Stellen in der Zielsequenz zu untersuchen. Auf diese Art und Weise konnte man die CpG's im DR+12 Motiv und in der Sp1-Sequenz mit einer Methode untersuchen.

4.1.3 COBRA

Auch die COBRA ist eine etablierte Methode zum Nachweis von DNA-Methylierung an bestimmten Gen Loci. Die COBRA ist sehr sensitiv und finanziell erschwinglich. Zu einer möglichen Ergebnisverzerrung durch die PCR kommt zusätzlich die Beschränkung auf spezifische Restriktionsschnittstellen. In dieser Arbeit konnte nur mit der Restriktionsendonuklease *Hinf* I der Methylierungsstatus des DR+12 Motivs untersucht werden. Eine gleichzeitige Analyse der Sp1 Sequenz war mit dieser Methode nicht möglich.

4.2 Ergebnisunterschiede bei der Auswertung des DR+12 Motiv

Sowohl mit der COBRA als auch mit der Sequenzanalyse der subklonierten PCR-Produkte konnten für jede Probe Ergebnisse erzielt werden. Bei der direkten Sequenzierung gab es bei fünf der Schilddrüsenkarzinomgewebeproben kein Ergebnis. Nur wenige Proben zeigten nach der direkten Sequenzierung ein interpretierbares Signal, so dass diese Methode zur Methylierungsanalyse des DR+12 Motivs als unzureichend gewertet wurde.

Beim Vergleich der Ergebnisse der COBRA und der Sequenzanalyse der subklonierten Proben zeigten sich teils inkongruente Aussagen (siehe Kapitel 3.6, S. 50). Einige in der COBRA als unmethyliert identifizierte Proben zeigten in der Sequenzanalyse eine geringe partielle Methylierung. Einige in der COBRA als partiell methyliert eingestufte Proben konnten in der Sequenzanalyse jedoch keine Methylierung des interessierenden CpG's aufweisen. Dies wirft zunächst Fragen bezüglich der Sensitivität dieser Methoden zur Methylierungsanalyse des DR+12 Motivs auf.

Eine entscheidende Beobachtung ist jedoch, dass die Ergebnisse der untersuchten Zelllinien übereinstimmen (siehe Tabelle 13, S. 50). Bei den Zelllinien ist der zelluläre Karzinomursprung genau bekannt. Bei den Schilddrüsenkarzinomgewebeproben hingegen ist zum einen mit einem gewissen Anteil normaler, gesunder Zellen zu rechnen, zum anderen ist die zelluläre Zusammensetzung der Tumorproben heterogen.

Dies bedeutet, dass die unterschiedliche zelluläre Zusammensetzung der Tumorproben und die „Verunreinigung“ durch gesunde Zellen einen Einfluss auf das Ergebnis ausüben können und somit zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Follikel-epithelzellen könnten z.B. einen anderen Methylierungsstatus als Bindegewebszellen präsentieren. Um diese Verfälschung auszuschließen wäre eine lasergesteuerte Mikrodisektion der Tumorgewebeproben mit anschließender Einzel-PCR erforderlich. Eine weitere mögliche Interpretation der unterschiedlichen Ergebnisse ist die bereits vorher beschriebene Verfälschung durch die bevorzugte Amplifikation von methylierten oder unmethylierten Sequenzen in der PCR (PCR-Bias), die sich auch auf die nachfolgende COBRA auswirkt.

Die Sequenzanalyse der subklonierten Proben lieferte eindeutige und genaue Methylierungsmuster der individuellen Moleküle. Mit diesem Verfahren konnten beide interessierenden CpG-Dinukleotide gleichzeitig untersucht werden. Um noch detailliertere Analysen unternehmen zu können sollte ggf. eine lasergesteuerte Mikrodisektion der Tumorgewebeproben erfolgen und mehr Klone pro Probe untersucht werden.

4.3 Epigenetische Veränderungen bei Karzinomen

Epigenetische Veränderungen sind häufig beobachtete Ereignisse in vielen verschiedenen menschlichen Karzinomen (ausführliche Beschreibung Kapitel 1.3, S.7). Epigenetische Modifikationen verändern den Aktivitätszustand eines Gens ohne die genetische Nukleotidfrequenz zu verändern. Zu den epigenetischen Modifikationen zählen DNA-Methylierungen und Histonmodifikationen. Jeder Zelltyp verfügt über seinen eigenen spezifischen Methylierungsstatus. DNA-Methylierung spielt nicht nur bei der normalen Determinierung und Differenzierung von Zellen eine entscheidende Rolle, sondern dieser spezifische Methylierungsstatus wird auch beim Altern und bei Krankheiten modifiziert (Beck et al., 2003).

Es ist nicht genau geklärt, welche regulatorischen Mechanismen zu einer veränderten Methylierung in Karzinomen führen. Eine mögliche Erklärung wäre eine Überexprimierung der DNMT, die zu Hypermethylierung bestimmter Promotorsequenzen führen. Mutationen von DNMT1 wurden ebenfalls in Zusammenhang mit der Karzinogenese bei kolorektalen Karzinomen beschrieben (Miremedi et al., 2007). Dies geschieht zum einen über veränderte Methylierungsmuster

von Tumorsuppressorgenen, zum anderen über die global reduzierten Methylierungslevel, die zu genomischer Instabilität führen.

Neuere Aspekte in der Karzinomforschung umfassen MikroRNA (miRNA). Dies sind kleine regulatorische RNAs, deren Expression bei vielen verschiedenen menschlichen Karzinomen dysreguliert ist (Mitchell et al., 2008; Nikiforova et al., 2008). Bei Schilddrüsenkarzinomen konnte gezeigt werden, dass verschiedene Tumorarten eindeutige MikroRNA Profile aufweisen, die sich weiterhin innerhalb der Tumorart unterscheiden und spezifische onkogenetische Mutationen widerspiegeln (Nikiforova et al., 2008). Diese MikroRNA Profile können z.B. bei der Diagnostik von Schilddrüsentumoren herangezogen werden und Entscheidungshilfen für das Therapieregimen geben. Ein weiterer Vorteil der spezifischen MikroRNAs ist, dass sie im Plasma oder Serum der Patienten als zirkulierender Biomarker für den von ihnen ausgehenden Tumor dienen können (Mitchell et al., 2008).

4.4 Epigenetische Einflüsse bei Schilddrüsenkarzinomen

Das Wissen molekularer und epigenetischer Veränderungen bei Schilddrüsenkarzinomen kann und sollte zur Diagnostik der Schilddrüsentumore herangezogen werden. Es bleibt zu klären, welche Epigenom regulierenden Enzyme i.e. DNMTs, Histonacetyltransferasen, Histondeacetylasen, Histonmethyltransferasen und Histondemethylasen in Schilddrüsenkarzinomen verändert exprimiert werden. Für Schilddrüsenkarzinome existieren bisher noch keine Daten. Eine Überexpression von DNMT1, DNMT3A und DNMT3B wurde jedoch zum Beispiel in verschiedenen Studien bei kolorektalen Karzinome beschrieben (Miremadi et al., 2007).

4.4.1 Genetische Veränderungen bei Schilddrüsenkarzinomen

Häufig beschriebene genetische Veränderungen in Schilddrüsentumoren umfassen aktivierende Veränderungen (RET, TRK, MAPK, BRAF, RAS, PAX8-PPAR γ), sowie Mutationen, die zu einem Funktionsverlust führen (PTEN, TP53) (Segev et al., 2003; Eszlinger et al., 2008; Kondo et al., 2008). Weitere Informationen zu den genetischen Alterationen in Schilddrüsenkarzinomen werden in Kapitel 1.3, S. 10 beschrieben.

RET/PTC Neuaneurordnungen sind besonders häufig bei PTC von Patienten vorzufinden, die ionisierender Strahlung ausgesetzt waren, und bei pädiatrischen Tumoren. Bei den sporadischen PTC erwachsener Patienten ist die Häufigkeit von RET Neuaneurordnungen

niedriger (~20%). Insgesamt findet man in ca. 70% der PTC eine der folgenden Mutationen: RET, TRK, NRAS, HRAS, KRAS oder BRAF, wobei die BRAF Mutation mit ca. 45% die am häufigsten beschriebene Mutation bei PTC ist (Fagin et al., 2008).

Die häufigste Mutation bei FTC sind mit 20 – 50% RAS Mutationen (NRAS > HRAS > KRAS). Ca. 35% der FTC sind mit PAX8-PPAR γ Neuarrangements assoziiert (Fagin et al., 2008).

Bei PDTC werden mit ca. 40 – 55% ebenfalls RAS Mutationen beobachtet. BRAF Mutationen sind hingegen eher seltener (12 – 17%). Bei UTC hingegen sind BRAF Mutationen mit ca. 25 – 50% der vorherrschende onkogenetische Defekt innerhalb des MAP-Kinase-Signalweges (Fagin et al., 2008). Mutationen im Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase-Signalweg (PI3K) werden bei UTC mit ca. 23% beschrieben. Eine reduzierte PTEN Expression tritt ebenfalls häufig bei UTC auf. TP53 Mutationen werden kaum (0 – 9%) bei gut differenzierten Schilddrüsenkarzinomen gefunden, jedoch häufig bei PDTC (17 – 38%) und UTC (67 – 88%) (Fagin et al., 2008). Eine weitere mit aggressiven Tumoreigenschaften assoziierte und bei PDTC und UTC vorkommende Veränderung ist der Verlust der E-cadherin Expression und eine β -Catenin Mutation (Pötter et al., 1999; Fagin et al., 2008; Kondo et al., 2008).

4.4.2 Epigenetische Veränderungen bei Schilddrüsenkarzinomen

Epigenetische Veränderungen wie Promotormethylierung regulieren die Genexpression und sind ein häufig beobachtetes Ereignis in vielen menschlichen Karzinomen (Kurkjian et al., 2008). Ein verändertes Methylierungsmuster und die damit verbundene Stilllegung ist für verschiedene Tumorsuppressorgene in Schilddrüsentumoren beschrieben worden; diese umfassen PTEN, RASSF1A, TIMP3, SLC5A8, DAPK und RAR β 2 (Schagdarsurengin et al., 2006; Xing, 2007). Wichtige am Schilddrüsenhormonmetabolismus beteiligte Gene sind ebenfalls in malignen thyreoidalen Neoplasien herunterreguliert. Eine Geninaktivierung durch Promotormethylierung in Schilddrüsenkarzinomen wurde für NIS, TSHR, ER α , ER β , SLC26A4 (Pendrin) und SLC5A8 nachgewiesen (Schagdarsurengin et al., 2006; Xing, 2007; Kondo et al., 2008). Dies hat schwerwiegende klinische Konsequenzen: So führt die Stilllegung des NIS durch Promotormethylierung z.B. dazu, dass die Karzinomzellen kein Radioiodid mehr aufnehmen und speichern. Dies ist eine wichtige Erklärung für ein Therapieversagen der Radioiodtherapie und einer damit einhergehenden schlechteren

Prognose der Erkrankung. Eine bisher nicht geklärte Frage ist, ob die epigenetische Inaktivierung dieser schilddrüsenspezifischen Gene, die keine klassische Tumor suppressive Funktion ausüben, eine primäre Rolle in der Entwicklung von Schilddrüsenkarzinomen spielt, oder eher ein sekundäres Ereignis durch verändert aktivierte Signalwege (wie Aktivierung BRAF) darstellt (Xing, 2007). Da das Stilllegen dieser schilddrüsenspezifischen Gene häufig mit einer Tumorprogression und Entdifferenzierung einhergeht, könnte eine veränderte Methylierung eine treibende Kraft in der Onkogenese der Schilddrüse und Progression sein. Die Kenntnis des Methylierungsstatus schilddrüsenspezifischer Gene könnte somit einen wichtigen Prognosemarker der Erkrankung darstellen und bietet zusätzlich die Möglichkeit neuer Therapiestrategien. Epigenetische Therapiekonzepte könnten zum einen die Re-Differenzierung von Karzinomzellen durch Re-Expression schilddrüsenspezifischer Gene umfassen. So könnte eine Therapie mit einem DNMT-Inhibitor zur Re-Expression von NIS führen und somit den Tumor vielleicht einer Radioiodtherapie (erneut) zugänglich machen. Eine weitere Möglichkeit ist die Blockierung von Tumorwachstum und -invasion durch Re-Expression tumorsuppressiver Moleküle (Kondo et al., 2008). Da eine hohe Methylierungsrate häufig bei UTC gefunden wurde, könnte ein „Methylierungsscreening“ weiterhin bei der Zuordnung der Tumorentitäten helfen (Schagdarsurengin et al., 2006).

4.5 Die Typ I -5'-Deiodase in Schilddrüsenkarzinomen

Ein wichtiges Enzym im Schilddrüsenhormonmetabolismus ist die Typ I 5'-Deiodase. Die 5'D1 ist seit langem als „De“-Differenzierungsmarker bei malignen Schilddrüsenenerkrankungen bekannt. Im Vergleich zu „normalem“ Schilddrüsenengewebe ist die 5'D1 Aktivität und Expression bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen herunterreguliert, und bei undifferenzierten Karzinomen sogar sehr niedrig bis nicht mehr nachweisbar (Köhrle, 1997). Bei metastasierten follikulären Schilddrüsenkarzinomen wurden Fallberichte mit hoher 5'D1 Aktivität und Symptomen einer Thyreotoxikose unter TSH-Suppressionstherapie mit L-Thyroxin beschrieben (Miyachi et al., 2008). Im Fall der papillären Karzinome wurden teils entgegengesetzte Beobachtungen gemacht. Zum einen wurde eine niedrige bis normale Aktivität nachgewiesen, in einigen Fällen jedoch auch eine erhöhte Aktivität (Köhrle, 1997). Weitere Arbeitsgruppen konnten bei den PTC ebenfalls eine niedrigere Aktivität

beobachten (Toyoda et al., 1992). Die Ergebnisse ließen sich bei Versuchen mit Schilddrüsenkarzinomzelllinien verifizieren (Köhrle, 1997). Die reduzierte oder auch abgeschaltete 5'D1 Expression und Aktivität steht in enger Korrelation zum Differenzierungsgrad der Karzinome. Der Verlust der 5'D1 Expression in Karzinomgeweben und die streng kontrollierte lokale T₃-Produktion während des Prozesses der Dedifferenzierung könnte einer der molekularen Defekte der Wachstumskontrolle sein, die zu einem Verlust der Wachstumskontrolle und zu Invasion und Metastasierung führen (Schreck et al., 1994). Durch eine geringere periphere Konversion von T₃ aus T₄ durch einen Verlust der 5'D1 Expression in Schilddrüsenkarzinomen wird TSH über den Rückkopplungsmechanismus vermehrt ausgeschüttet, was zu einem Stimulations- und Wachstumsreiz der Karzinomzellen durch TSH führt.

Unabhängig vom klinischen Nutzen der TSH-suppressiven Therapie und dem verbesserten krankheitsfreien Überleben ist der genaue Wirkmechanismus umstritten. Einige Daten sprechen eher für einen Wachstumsreiz, der durch Schilddrüsenhormone vermittelt wird (Brabant, 2008). In undifferenzierten Karzinomen wird der TSHR zum Beispiel nicht exprimiert, was gegen einen alleinigen TSH-Effekt spricht (Brabant, 2008). Die durch den TSHR vermittelte Wachstums- und Differenzierungsregulation wirkt über Gs und Gq/11-Proteine gekoppelt. Eine mögliche Erklärung für den Nutzen der TSH-suppressiven Therapie liegt in einer direkten Wirkung von T₃. Ein normal gebundener TR kann über verschiedene Signalwege indirekten Einfluss auf Proliferation und Dedifferenzierung ohne TSH-Interaktion nehmen (Brabant, 2008). Dies könnte bedeuten, dass die T₃-Konzentration innerhalb des Tumorgewebes die günstigen Effekte der L-Thyroxin Therapie ausübt, und nicht die Suppression des TSH (Brabant, 2008). Wenn diese Hypothese stimmt, könnte dies auch eine Erklärung für aggressive Tumoreigenschaften bei Karzinomen mit reduzierter 5'D1 Expression und Aktivität sein. Durch die reduzierte oder fehlende lokale 5'D1-Aktivität in Schilddrüsenkarzinomen wird L-Thyroxin nicht in T₃ umgewandelt, was wiederum zur Stimulation von Proliferation durch den ungebundenen TR führt.

Daraus lässt sich auch schlussfolgern, warum gerade bei den aggressiven UTC, die häufig eine lokal fortgeschrittene Invasion und Fernmetastasen aufweisen, die 5'D1 Expression und Aktivität sehr niedrig oder nicht mehr nachweisbar sind.

Die genaue Aufgabe der thyreoidalen 5'D1 ist nicht ausreichend geklärt. In Maus Knock-out Modellen wurde beschrieben, dass die 5'D1 für die Aufrechterhaltung des

zirkulierenden T_3 unter normalen Maushaltungsbedingungen entbehrlich zu sein scheint (Streckfuss et al., 2005; Schneider et al., 2006).

In der Arbeit von Schneider (Schneider et al., 2006) wurde postuliert, dass die 5'D1 bestimmt, welche Mengen T_3 und T_4 aus der Schilddrüse nach Spaltung aus T_g sezerniert werden. Aus der Arbeit ging weiterhin hervor, dass eine Hauptaufgabe der 5'D1 die 5'-Deiodierung anderer Iodthyroninsubstrate, z.B. der sulfatierten oder glukuronidierten Konjugate sein könnte und somit der Inaktivierung der Schilddrüsenhormone und ihrer Metabolite. Dies wäre gerade bei hyperthyreoten Bedingungen zum Schutz eines Überangebotes an Schilddrüsenhormonen eine wichtige Aufgabe.

4.6 Methylierungsstatus DR+12 und Sp1 in Schilddrüsenkarzinomen

In dieser Dissertationsarbeit konnte gezeigt werden, dass wichtige regulatorische Bereiche im Promotor der menschlichen 5'D1 in Schilddrüsenkarzinomgeweben methyliert sind. Die untersuchten regulatorischen Bereiche umfassen zum einen DR+12, ein T_3 responsives Element, und zum anderen eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1. Somit kann die Liste der durch Methylierung inaktivierten schilddrüsen-spezifischen Gene in Schilddrüsenkarzinomen um das 5'D1 Gen erweitert werden. Auch wenn der 5'D1 Genpromotor keine typischen CpG-Inseln aufweist, so könnte genau die Methylierung dieser beiden Elemente zur Geninaktivierung führen. Diese Interpretation wird auch durch die Arbeit von Jones (Jones et al., 2002) (vgl. Kap. 1.3, S.9) unterstützt, in der gezeigt wurde, dass auch CpG-arme Promotoren den Transkriptionsstatus eines Gens beeinflussen können.

Die verschiedenen histopathologischen Tumorentitäten unterschieden sich hinsichtlich ihres Methylierungsgrades in beiden untersuchten regulatorischen Elementen (vgl. Kapitel 3.5.1 – 3.5.5, S. 44 - 48). Die Proben der differenzierten Schilddrüsenkarzinome zeigten hierbei gleiche Tendenzen bezüglich ihres Methylierungsstatus. Ein höherer Methylierungsgrad konnte hingegen bei den undifferenzierten Karzinomproben festgestellt werden. Die hepatozelluläre Karzinomzelllinie Hep G2, die eine hohe 5'D1 Aktivität zeigt, war im DR+12 Motiv vollständig nicht methyliert. Die Sp1 Site zeigte hingegen eine geringe Methylierung (7 von 20 analysierten Klonen waren methyliert; 35%). Die follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133, die eine reduzierte 5'D1 Aktivität aufweist, ist moderat im DR+12 Motiv methyliert (5 methylierte Klone von 22

untersuchten) und zeigt einen hohen Methylierungsgrad der Sp1 Site (17 von 22 Klonen). In der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinie HTh 74 mit kaum detektierbarer 5´D1 Aktivität ist das DR+12 Motiv moderat methyliert (4 von 12 Klonen), und die Sp1 Site komplett methyliert.

Insgesamt zeigt sich in dieser Arbeit ein Trend zur Signifikanz zur höhergradigen Methylierung in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomgeweben und –zelllinien gegenüber den differenzierten. Insbesondere die Methylierung der Sp1 Site scheint hierbei eine wichtige Rolle einzunehmen. Eine weitere bedeutende Beobachtung dieser Arbeit war die Tatsache, dass eine Methylierung des DR+12 Motivs immer in Kombination mit einer Methylierung der Sp1 Site vorlag. Es konnte kein einziges methyliertes DR+12 Motiv ohne methyliertes Sp1 nachgewiesen werden. Dies könnte für eine regulatorische Kombination dieser beiden Motive sprechen und somit für eine größere Effizienz in der Down-Regulation der 5´D1.

Interessant wäre, ob eine Methylierung der 5´D1 auch mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert. Da keine Daten bezüglich des TNM-Stadiums (Tumorgröße und –ausdehnung, Lymphknotenbefall, Metastasierung) der Tumorgewebeproben vorlag, lässt sich hierzu leider keine Aussage machen. Die Methylierung von TIMP3, SLC5A8, DAPK und RARβ2 ist z.B. signifikant mit aggressiven Tumoreigenschaften in PTC assoziiert (Hu et al., 2006). Bei Methylierung und Herunterregulierung dieser Gene wurden extrathyroidale Invasion, Lymphknotenmetastasierung, Multifokalität und fortgeschrittene Tumorstadien signifikant häufiger beobachtet.

Ein Problem bei der Beurteilung der Proben ist, dass der Vergleich zu normalen gesunden Schilddrüsen fehlt. In dieser Arbeit wurde für diesen Zweck makroskopisch unauffälliges post mortem Schilddrüsengewebe untersucht. In den sechs analysierten Proben konnten ebenfalls für beide regulatorischen Elemente Methylierung nachgewiesen werden (DR+12 13.3%, Sp1 50%). Dies stellt insgesamt eine deutlich niedrigere Methylierungsrate als die der aggressiven undifferenzierten Karzinome dar. Insgesamt sollte die Bewertung dieser vermeintlich gesunden Schilddrüsen vorsichtig erfolgen, da viele Schilddrüsenkarzinome mikroskopische Zufallsbefunde sind (Goretzki et al., 1996; Jameson et al., 2003). Das mikroskopische PTC zum Beispiel kommt autoptisch bei 25% der Schilddrüsen vor (Jameson et al., 2003). Es ist somit nicht auszuschließen, dass einzelne Proben bereits mikroskopische Karzinome enthielten, und somit vielleicht auch bereits epigenetischen Modifikationen unterlagen. Zur

weiteren Einschätzung eines „normalen“ Methylierungsstatus der 5´D1 sind weitere Untersuchungen an eindeutig makro- und mikroskopisch gesunden Schilddrüsengeweben erforderlich, sowie ggf. eine lasergesteuerte Mikrosdissektion der pathologisch klassifizierten Schnitte vor der molekulardiagnostischen PCR-Analyse. Dies würde weitere wichtige Zusatzinformationen zur Beurteilung des Methylierungsstatus der 5´D1 bieten, da bei dieser ex vivo Tumoranalyse noch keine Informationen über die zelluläre Zusammensetzung der Tumorproben vorlagen. Man könnte auf diese Art und Weise z.B. überprüfen, ob Thyreozyten gegenüber Fibroblasten im Tumorgewebe einen anderen Methylierungsstatus des 5´D1 Gens aufweisen.

Mit den in Kapitel 1.5 beschriebenen Stimulationsversuchen in Zellkulturexperimenten mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-aza-2´-Deoxycytidine konnte gezeigt werden, dass sowohl die 5´D1- mRNA- Expression, als auch die 5´D1 -Enzymaktivität in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC-133 und HTh 74 (re-)stimuliert werden kann. Bei der hepatozellulären Karzinomzelllinie Hep G2 zeigten sich diese Effekte hingegen nicht. Dies zeigt, dass Methylierung einen modulierenden Effekt auf die 5´D1 Expression und Enzymaktivität ausübt. Es bleibt jedoch zu klären, ob die 5´D1 Promotormethylierung ein primäres Ereignis in Karzinomen darstellt, oder durch andere Veränderungen, z.B. aktivierte Signalwege, getriggert wird. Da die meisten Karzinomgewebeproben eine Methylierung beider regulatorischer Elemente wie die Zelllinien FTC-133 und HTh 74 widerspiegeln, könnte die Promotormethylierung dieser Bereiche zur Inaktivierung der 5´D1 während der Karzinogenese beitragen.

Die geringe Anzahl der untersuchten Schilddrüsenkarzinomgewebeproben in dieser methodisch ausgerichteten Pilotstudie erlaubt bisher noch keine statistisch signifikante Auswertung. Es verleiht dieser Arbeit den Charakter einer experimentellen Fallaufarbeitung, um die in der Einleitung gestellten Fragen zu untersuchen.

Grundsätzlich scheint eine Methylierung der beiden untersuchten Motive eher mit einer schlechteren Prognose assoziiert zu sein, da ein hoher Methylierungsgrad gerade bei den aggressiven undifferenzierten Karzinomen gefunden werden konnte. Der für eine systematische und routinemässige derartige Analyse erforderliche experimentelle Aufwand wäre in der klinischen Routine in dieser Form zur Zeit leider zu hoch und zu kostenintensiv. Es bleibt weiterhin zu klären, ob eine derartige Methylierungsanalyse des 5´D1-Promotors und anderer Promotoren bei Schilddrüsentumoren weitere diagnostische, prognostische oder therapeutische Auswirkungen hätte. Ein

„Methylierungsscreening“ als zusätzliche Diagnostik, wie es z.B. bei kolorektalen Karzinomen bereits angewendet wird (Epigenomics, PRESEPT-Studie), könnte jedoch in Zukunft wichtige Informationen vorab erbringen.

4.7 Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellungen

Zusammenfassend werden die in Kapitel 1.6 (S. 16) hergeleiteten Fragestellungen beantwortet.

1. Die in dieser Arbeit untersuchten regulatorischen Bereiche im Promotor der 5´D1 zeigten eine Methylierung von CpG-Dinukleotiden des DR+12 Motivs und einer Sp1 Sequenz in Schilddrüsenkarzinomgeweben und –zelllinien. Beide Bereiche zeigten unterschiedliche Grade der Methylierung, wobei eine Methylierung des DR+12 Elements immer mit einer Methylierung des Sp1 kombiniert vorlag.
2. Der Methylierungsstatus der 5´D1 in Schilddrüsenkarzinomen könnte zur Genexpression und Enzymaktivität passen. Es ist nicht klar, welches Element wichtiger für die Herunterregulierung der 5´D1 Expression in Karzinomen ist, oder ob die spezielle Kombination dieser beiden Elemente zur Inaktivierung via Methylierung führt. Wichtig ist die Erkenntnis, dass bei den UTC, den aggressivsten Tumoren, bei denen keine 5´D1 Aktivität mehr nachgewiesen werden kann, der höchste Grad der Methylierung detektiert werden konnte.
3. Eine Tendenz zu einem höheren Methylierungsgrad wurde für die hoch aggressiven UTC nachgewiesen. Interessant wäre hier ein Vergleich nicht nur in Bezug auf die histopathologische Einteilung, sondern auch hinsichtlich des Tumorstadiums, und insbesondere in Bezug auf eine fortgeschrittene metastasierte Erkrankung. Vielleicht korreliert eine höhere Methylierungsrate auch mit einer fortgeschrittenen Erkrankung. Dies würde auch die Streubreite innerhalb einer Tumorgruppe erklären; eine metastasierte Erkrankung könnte mit einer höheren Methylierungsrate einhergehen als eine lokale Erkrankung. Hierzu konnte in dieser Arbeit keine Aussage gemacht werden, da keine weiteren Informationen zu den Patienten, zum TNM-Stadium der einzelnen

Schilddrüsenkarzinomgewebeproben und zur möglicherweise unterschiedlichen zellulären Zusammensetzung der analysierten Tumorgewebe vorhanden waren.

4.8 Therapeutische Ausblicke

Trotz der multimodalen Therapiekonzepte (Operation, Radioiodtherapie, TSH-suppressionstherapie, perkutane Radiatio, Chemotherapie) in der Behandlung maligner Schilddrüsenerkrankungen haben sich die Überlebensraten in den letzten Jahrzehnten nicht viel verbessert (Sherman, 2003). Neuere Therapieansätze sollten deshalb in der Zukunft genauer geprüft und erörtert werden.

Die durch Methylierung inaktivierten Schilddrüsen-spezifischen Gene NIS und TSHR konnten durch Behandlung mit Methylierungsinhibitoren in Modelluntersuchungen in Zelllinien reaktiviert werden (Venkataraman et al., 1999; Provenzano et al., 2007; Xing, 2007). Dies ist von klinischer Bedeutung. Wenn ein Tumor oder eine Metastase nicht mehr auf die Radioiodtherapie anspricht, so könnten Methylierungsinhibitoren die Re-Expression des NIS induzieren, und somit erneut der Radioiodtherapie zugänglich machen. Auch die Re-Stimulation der 5'D1-Aktivität durch Inhibierung der Promotormethylierung könnte günstige Effekte ausüben.

Der Prototyp der DNA-Methyltransferase-Inhibitoren ist 5-azacytidin (Vidaza[®]), sowie sein Desoxyribose Analogon 5-aza-2'-deoxycytidine (Decitabine, Dacogen[™]). Diese Nukleosidanaloga werden in die DNA inkorporiert und inhibieren die DNMT's (Lyko et Brown, 2005; Szyf, 2005). Ein vielversprechender und effektiver Ansatz ist ferner die Kombination von DNMT-Inhibitoren und Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitoren (Szyf, 2005; Muntean et Hess, 2009). Vidaza[®] wurde 2004 und Decitabine 2006 zur Therapie myelodysplastischer Syndrome und leukämischer Erkrankungen von der FDA (US Food and Drug Administration) zugelassen (Luczak et Jagodzinski, 2006; Kurkjian et al., 2008; Muntean et al., 2009).

Studien mit diesen neuen Medikamenten könnten zeigen, ob sie auch bei Schilddrüsenkarzinomen günstige Effekte aufweisen. Allerdings sollte dies nur bei fortgeschrittenen Fällen erfolgen, in denen die etablierten Therapien versagen. Eine Therapie mit DNMT-Inhibitoren erhebt nicht den Anspruch einer Standardtherapie maligner Schilddrüsenerkrankungen, sondern sollte als Therapieversuch bei Versagen der konventionellen Therapieregimen gesehen werden.

5 Zusammenfassung

Als Schlüsselenzym im Schilddrüsenhormonmetabolismus vermittelt die Typ I-5'-Deiodase (5'D1) die Aktivierung des Prohormons T_4 in das biologisch aktive T_3 . Etwa 70% des im Blut zirkulierenden systemischen T_3 wird durch die 5'D1 bereitgestellt, die überwiegend in der Leber, der Niere, der Schilddrüse und der euthyreoten Hypophyse exprimiert wird. Dieses Enzym wird sowohl durch sein Produkt T_3 als auch durch Retinsäure positiv reguliert, jedoch ist nur wenig darüber bekannt, welche Faktoren für eine negative Regulation verantwortlich sind.

Die 5'D1 ist in Schilddrüsenkarzinomgewebe und Schilddrüsenkarzinomzelllinien signifikant herunterreguliert. Während die 5'D1 eine hohe Aktivität in gesunden Schilddrüsen zeigt, ist ihre Aktivität hingegen in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen reduziert und bei undifferenzierten Karzinomen sogar nicht mehr nachweisbar.

Epigenetische Effekte wie Promotormethylierung führen zum Stilllegen von Genen, dem so genannten „Gene Silencing“. In dieser Dissertationsarbeit wurde der Methylierungsstatus der humanen 5'D1 an wichtigen regulatorischen Bereichen des Promotors in Zusammenhang mit der Genexpression und Enzymaktivität in Schilddrüsenkarzinomgeweben und -zelllinien untersucht. Mit verschiedenen Methoden (direkte Sequenzierung Bisulfit modifizierter PCR-Produkte, Sequenzanalyse subklonierter PCR-Produkte und COBRA) konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit untersuchten regulatorischen Bereiche des 5'D1 Promotors, ein T_3 - und Retinsäure-responsives Element (DR+12) und eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1, zu unterschiedlichen Graden Methylierung in Schilddrüsenkarzinomgeweben und -zelllinien aufwiesen. Eine Methylierung des DR+12 Motivs war immer mit einer Methylierung der Sp1 Site kombiniert. Der höchste Grad der Methylierung wurde bei den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen, den aggressivsten Tumoren, bei denen keine 5'D1 Aktivität mehr nachgewiesen werden kann, detektiert.

Bei Vorversuchen mit dem DNA-Methylierungsinhibitor 5-aza-2'-Deoxycytidine konnte die reduzierte 5'D1 Expression und Aktivität in Schilddrüsenkarzinomzelllinien restimuliert werden. Zum einen zeigt dies den Einfluss epigenetischer Effekte auf die Regulation der 5'D1, zum anderen eine mögliche therapeutische Option, die bei fortgeschrittenen Tumoren in Zukunft Anwendung finden könnte.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse kann die Liste der in Schilddrüsenkarzinomen durch Methylierung inaktivierten schilddrüsenspezifischen Gene somit um das Gen der humanen Typ I-5'-Deiodase erweitert werden.

6 Literaturverzeichnis

- Baylin, S. B. (2005). "DNA methylation and gene silencing in cancer." *Nat Clin Pract Oncol* 2 Suppl 1: S4-11.
- Beck, S. et Olek, A., Eds. (2003). *The Epigenome*. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Brabant, G. (2008). "Thyrotropin suppressive therapy in thyroid carcinoma: what are the targets?" *J Clin Endocrinol Metab* 93(4): 1167-9.
- Cardis, E., Howe, G., Ron, E. et al. (2006). "Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on." *J Radiol Prot* 26(2): 127-40.
- Dehan, P., Kustermans, G., Guenin, S., Horion, J., Boniver, J. et Delvenne, P. (2009). "DNA methylation and cancer diagnosis: new methods and applications." *Expert Rev Mol Diagn* 9(7): 651-7.
- Eszlinger, M., Krohn, K., Hauptmann, S., Dralle, H., Giordano, T. J. et Paschke, R. (2008). "Perspectives for improved and more accurate classification of thyroid epithelial tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 93(9): 3286-94.
- Fagin, J. A. et Mitsiades, N. (2008). "Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 22(6): 955-69.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S. et al. (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(5): 1827-31.
- Goretzki, P. E., Frilling, A., Simon, D. et Roehrer, H. D. (1990). "Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man." *Recent Results Cancer Res* 118: 48-63.
- Goretzki, P. E., Simon, D. et Dotzenrath, C., Eds. (1996). *Schilddrüsenmalignome. Praktische Endokrinologie*, Urban & Schwarzenberg.
- Grunau, C., Clark, S. J. et Rosenthal, A. (2001). "Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters." *Nucleic Acids Res* 29(13): E65-5.
- Heldin, N. E., Gustavsson, B., Claesson-Welsh, L. et al. (1988). "Aberrant expression of receptors for platelet-derived growth factor in an anaplastic thyroid carcinoma cell line." *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(23): 9302-6.

-
- Heuer, H. et Visser, T. J. (2009). "Minireview: Pathophysiological importance of thyroid hormone transporters." *Endocrinology* 150(3): 1078-83.
- Holliday, R. et Pugh, J. (1975). "DNA modification mechanisms and gene activity during development." *Science* 187: 226-232.
- Hu, S., Liu, D., Tufano, R. P. et al. (2006). "Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer." *Int J Cancer* 119(10): 2322-9.
- Jakobs, T. C., Koehler, M. R., Schmutzler, C., Glaser, F., Schmid, M. et Kohrle, J. (1997a). "Structure of the human type I iodothyronine 5'-deiodinase gene and localization to chromosome 1p32-p33." *Genomics* 42(2): 361-3.
- Jakobs, T. C., Schmutzler, C., Meissner, J. et Kohrle, J. (1997b). "The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene--mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element." *Eur J Biochem* 247(1): 288-97.
- Jameson, J. L. et Weetman, A. P. (2003). *Erkrankungen der Schilddrüse. Harrisons Innere Medizin*. Dietel, M., Dudenhausen, J. et Suttorp, N. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag. 2.
- Jones, P. A. et Baylin, S. B. (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet* 3(6): 415-28.
- Kloos, R. T., Eng, C., Evans, D. B. et al. (2009). "Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association." *Thyroid* 19(6): 565-612.
- Koenig, R. J. (2005). "Regulation of Type I Iodothyronine Deiodinase in Health and Disease." *Thyroid* 15(835-840).
- Köhrle, J. (1997). "Thyroid carcinoma: interrelationships between local thyroid hormone metabolism by the type I 5'-deiodinase and the expression of thyroid hormone receptors and other thyroid-specific (de-)differentiation markers." *Curr Top Pathol* 91: 83-116.
- Köhrle, J. (1999). "Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family." *Mol Cell Endocrinol* 151(1-2): 103-19.
- Köhrle, J. (2007). "Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination." *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 21(2): 173-91.
- Kondo, T., Asa, S. L. et Ezzat, S. (2008). "Epigenetic dysregulation in thyroid neoplasia." *Endocrinol Metab Clin North Am* 37(2): 389-400, ix.

-
- Krebsgesellschaft, Deutsche., Ed. (1999). Qualitätssicherung in der Onkologie - Interdisziplinäre Leitlinien 1999: Diagnose und Therapie maligner Erkrankungen. München, Bern, Wien, New York.
- Kurkjian, C., Kummar, S. et Murgo, A. (2008). "DNA Methylation: Its Role in Cancer Development and Therapy." *Curr Probl Cancer* 32: 187-235.
- Lang, F. (1998). Hormone. Taschenatlas der Pathophysiologie. Silbernagel, S. et Lang, F. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- LoPresti, J. S. et Singer, P. A. (1997). Physiology of Thyroid Hormone Synthesis, Secretion, and Transport. *Thyroid Disease: Endocrinology, Surgery, Nuclear Medicine, and Radiotherapy*. Falk, S. A. Philadelphia, Lippincott-Raven.
- Lottspeich, F. et Zorbach, H., Eds. (1998). Bioanalytik. Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag GmbH.
- Luczak, M. W. et Jagodzinski, P. P. (2006). "The role of DNA methylation in cancer development." *Folia Histochemica et Cytobiologica* 44(3): 143-154.
- Lyko, F. et Brown, R. (2005). "DNA Methyltransferase Inhibitors and the Development of Epigenetic Cancer Therapies." *Journal of the National Cancer Institute* 97(20): 1498-1505.
- Mentrup, B., Herbert, S., Schmutzler, C. et Köhrle, J. (2003). Expression of Type I Iodothyronine 5'-Deiodinase and Sodium Iodide Symporter mRNAs Is Enhanced by an Inhibitor of DNA Methylation in Human Thyroid Carcinoma Cell Lines. Endocrine Society, Philadelphia, USA.
- Miremedi, A., Oestergaard, M. Z., Pharoah, P. D. et Caldas, C. (2007). "Cancer genetics of epigenetic genes." *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1: R28-49.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M. et al. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10513-8.
- Miyauchi, A., Takamura, Y., Ito, Y. et al. (2008). "3,5,3'-Triiodothyronine Thyrotoxicosis due to Increased Conversion of Administered Levothyroxine in Patients With Massive Metastatic Follicular Thyroid Carcinoma." *J Clin Endocrinol Metab* 93(6): 2239-2242.
- Muntean, A. G. et Hess, J. L. (2009). "Epigenetic dysregulation in cancer." *Am J Pathol* 175(4): 1353-61.

- Nikiforova, M. N., Tseng, G. C., Steward, D., Diorio, D. et Nikiforov, Y. E. (2008). "MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility." *J Clin Endocrinol Metab* 93(5): 1600-8.
- Oertel, Y. C. (2006). *Classification of Thyroid Malignancies. Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management.* Wartofsky, L. et Nostrand, D. V. Totowa, NJ, Humana Press Inc.
- Pötter, E., Bergwitz, C. et Brabant, G. (1999). "The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues." *Endocr Rev* 20(2): 207-39.
- Provenzano, M., Fitzgerald, M., Krager, K. et Domann, F. (2007). "Increased iodine uptake in thyroid carcinoma after treatment with sodium butyrate and decitabine (5-Aza-dC)." *Otolaryngol Head Neck Surg* 137(5): 722-8.
- Riggs, A. D. (1975). "X inactivation and DNA methylation." *Cytogenet Cell Genet.* 14: 9-25.
- Robert-Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Eds. (2008). Krebs in Deutschland 2003-2004. Häufigkeiten und Trends. Berlin.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F. et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230(4732): 1350-4.
- Sanger, F., Nicklen, S. et Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Schagdarsurengin, U., Gimm, O., Dralle, H., Huang-Vu, C. et Dammann, R. (2006). "CpG Island Methylation of Tumor-Related Promoters Occurs Preferentially in Undifferentiated Carcinoma." *Thyroid* 16(7): 633-642.
- Schagdarsurengin, U., Gimm, O., Hoang-Vu, C., Dralle, H., Pfeifer, G. P. et Dammann, R. (2002). "Frequent epigenetic silencing of the CpG island promoter of RASSF1A in thyroid carcinoma." *Cancer Res* 62(13): 3698-701.
- Schmid, K. W. (2007). "[Problem areas of tumour classifications--thyroid carcinomas]." *Verh Dtsch Ges Pathol* 91: 57-65.
- Schneider, M. J., Fiering, S. N., Thai, B. et al. (2006). "Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (Dio1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice." *Endocrinology* 147(1): 580-9.

- Schreck, R., Schnieders, F., Schmutzler, C. et Köhrle, J. (1994). "Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines." *J Clin Endocrinol Metab* 79(3): 791-8.
- Segev, D. L., Umbricht, C. et Zeiger, M. A. (2003). "Molecular pathogenesis of thyroid cancer." *Surg Oncol* 12(2): 69-90.
- Sherman, S. I. (2003). "Thyroid carcinoma." *Lancet* 361(9356): 501-11.
- Shuman, S. (1994). "Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase." *J Biol Chem* 269(51): 32678-84.
- Smallridge, R. C., Marlow, L. A. et Copland, J. A. (2009). "Anaplastic thyroid cancer: molecular pathogenesis and emerging therapies." *Endocr Relat Cancer* 16(1): 17-44.
- Spitzweg, C. et Morris, J. C. (2002). "The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications." *Clin Endocrinol (Oxf)* 57(5): 559-74.
- Streckfuss, F., Hamann, I., Schomburg, L. et al. (2005). "Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice." *Biochem Biophys Res Commun* 337(2): 739-45.
- Suske, G. (1999). "The Sp-family of transcription factors." *Gene* 238(2): 291-300.
- Szyf, M. (2005). "Therapeutic implications of DNA methylation." *Future Oncol* 1(1): 125-35.
- Venkataraman, G. M., Yatin, M., Marcinek, R. et Ain, K. B. (1999). "Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻-symporter gene methylation status." *J Clin Endocrinol Metab* 84(7): 2449-57.
- Warnecke, P. M., Stirzaker, C., Melki, J. R., Millar, D. S., Paul, C. L. et Clark, S. J. (1997). "Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA." *Nucleic Acids Res* 25(21): 4422-6.
- Web Site: <http://www.epigenomics.com>
- Web Site: <http://www.presept.net/print.php?query=/en/medical-professionals/&lang=2>
- Werle, E., Schneider, C., Renner, M., Volker, M. et Fiehn, W. (1994). "Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing." *Nucleic Acids Res* 22(20): 4354-5.
- Xing, M. (2007). "Minireview: Gene methylation in Thyroid Tumorigenesis." *Endocrinology* 148(3): 948 - 953.

- Xiong, Z. et Laird, P. W. (1997). "COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay." *Nucleic Acids Res* 25(12): 2532-4.
- Zhang, C. Y., Kim, S., Harney, J. W. et Larsen, P. R. (1998). "Further characterization of thyroid hormone response elements in the human type 1 iodothyronine deiodinase gene." *Endocrinology* 139(3): 1156-63.

7 Anhang

7.1 Veröffentlichungen

7.1.1 Originalarbeit

Mentrup B., Pohlabein K., Schagdarsurengin U., Schmutzler C., Hoang-Vu C., Dammann R. and Köhrle J.: "CpG Methylation in Transcription Factor Binding Sites of the Human Type I 5'-Deiodinase Gene". Manuskript für das International Journal of Cancer ist in Präparation.

7.1.2 Kongress- und Tagungsbeiträge

Pohlabein K., Mentrup B., Schagdarsurengin U., Dammann R., Hoang-Vu C., Schmutzler C. and Köhrle J.: „Analysis of the methylation status of the human type I iodothyronine deiodinase promoter in thyroid carcinoma tissues“.

(2004): 15th European Students' Conference, Berlin.

(2004): Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), Berlin.

(2003): Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF), Halle.

7.2 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen ganz herzlich danken, die am Gelingen dieser Arbeit maßgeblich beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau Dr. Birgit Mentrup für die konstruktive Beratung und kompetente Unterstützung während meiner ganzen Promotionszeit. Ihre zahlreichen Anregungen flossen direkt in die Forschungsarbeit ein und sorgten stetig für Verbesserungen und Ergänzungen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle, dem Leiter des Instituts, für die Möglichkeit diese Dissertationsarbeit an seinem Institut zu erstellen sowie für die konstruktive und hilfreiche Kritik. Außerdem danke ich ihm für die Bereitstellung der für die Laborarbeit benötigten Mittel und die Gelegenheit meine Ergebnisse auf Tagungen einem Fachpublikum zu präsentieren.

Ein großer Dank und großes Lob auch an alle hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeiter des Instituts für Experimentelle Endokrinologie der Charité Berlin für das angenehme, freundliche und lehrreiche Arbeitsklima. Gedankt sei auch der Hallenser Arbeitsgruppe für die Bereitstellung der Schilddrüsenkarzinomgewebeproben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, hier insbesondere Stefanie Beil, die mich immer unterstützt und mir zur Seite gestanden haben.

7.3 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.4 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Kerstin Pohlabein, dass die vorliegende Dissertationsarbeit mit dem Thema „Analyse des Methylierungsstatus des menschlichen Typ I-5'-Deiodase Promotors in Schilddrüsenkarzinomen“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde. Sie stellt auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dar. Die benutzten Hilfsmittel sowie die verwendete Literatur sind vollständig angegeben.

Datum

Unterschrift