

---

## 6 Diskussion

### 6.1 Polymerase Chain Reaction (PCR) in der medizinischen Diagnostik

Die Bestimmung von S-Tg, Ganzkörperszintigrafie und Sonografie stellen die Säulen in der Nachsorge differenzierter Schilddrüsenkarzinome (DTC) dar und sind hoch sensitive diagnostische Verfahren zur Detektion von Rezidiven und Tumorrestgewebe (113, 129, 130). Rezidive treten mit einer Häufigkeit von 20 - 40 % auf und werden oft erst Jahrzehnte nach erfolgreicher Therapie diagnostisch und klinisch manifest (109, 113). Damit liegt in der regelmäßigen Kontrolle über ein langes Nachsorgeintervall ein besonderer Stellenwert. Durch die Entwicklung hoch sensitiver immunoradiometrischer Assays für die S-Tg Bestimmung wird eine Sensitivität in Hypothyreose von 85 - 95 % und in Euthyreose von ca. 50 % erreicht (130), so dass bei unauffälligem Verlauf die S-Tg Bestimmung in Hypothyreose mit einer sonografischen Kontrolle die Regel ist (129). Die Szintigrafie wird einmalig sechs bis zwölf Monate nach Thyreoidektomie mit Radiojodablation, bei auffälligem Verlauf und Hochrisikopatienten zusätzlich im weiteren Verlauf empfohlen (130, 131). Dennoch ist der diagnostische Algorithmus in folgenden Punkten limitiert: 1. zirkulierende Tg Antikörper interferieren in ca. 20 % der DTC Patienten mit den S-Tg Assays (129); 2. eine Hypothyreose ist nötig, um eine ausreichende Sensitivität der S-Tg Assays zu erzielen (129); 3. durch ein begrenztes Auflösungsvermögen der bildgebenden Verfahren (14, 132); 4. durch mangelnde bzw. fehlende Radiojodaufnahme.

In der Entwicklung sensitiver PCR Assays hat man sich ein sensibles molekularbiologisches Verfahren versprochen, das die diagnostische Lücke zwischen Primärtherapie und klinisch manifesten Metastasen mit der Detektion einzelner disseminierter Tumorzellen im peripheren Blut schließt. So sind etablierte PCR Assays in der Lage eine Tumorzelle in einer Million Zellen zu detektieren (116, 133-135). Trotz der initial vielversprechenden Ergebnisse hinsichtlich des diagnostischen Potentials sind PCR Assays durch die hohe Sensitivität und die zahlreichen Schritte von der Probengewinnung bis hin zur Analyse des PCR Amplifikates fehleranfällig.

Im folgenden Abschnitt wird systematisch auf mögliche Fehlerquellen insbesondere von PCR Assays für peripheres Blut eingegangen.

### 6.1.1 Probengewinnung

Bereits die Technik der Venenpunktion hat Einfluss auf das Ergebnis des PCR Assays. Durch die hohe Sensitivität von einer Tumorzelle in einem Milliliter Blut (116) kann eine Kontamination durch verschleppte Epidermiszellen während der Venenpunktion zu falsch positiven PCR Ergebnissen führen. Einige Autoren verfechten diese Möglichkeit und fordern das Verwerfen der ersten Milliliter Blut. Dagegen bestätigen die Experimente von Ghossein et al. (116) diese Hypothese nicht und bezweifeln die Verschleppung von Epidermiszellen als Ursache falsch positiver Ergebnisse. Neben der Entnahmetechnik stellen die in den Blutentnahmesystemen verwendeten Antikoagulantien wie z. B. Heparin, EDTA, Zitrat, etc. mögliche Störfaktoren von PCR Assays dar. Ezlinger et al. (136) haben den von Dickover et al. (137) erstmals beschriebenen Einfluss von Heparin als Störfaktor einer PCR Analyse aufgegriffen: so liegen die in der PCR gemessenen GAPDH mRNA Konzentrationen in EDTA- und Zitrat - Blut ohne Separation der nukleären Zellen nach Null und 24 Stunden deutlich unter den mRNA Konzentrationen nach Separation. Der kleinste Störfaktor wird im Zitrat - Blut nach Separation der mononukleären Zellen gemessen. Heparin als Antikoagulant hat sich bereits in der Arbeit von Holodniy et al. (138) durch falsch negative Ergebnisse bei anschließender PCR Diagnostik als ungeeignet erwiesen.

Eine einzeitige Blutentnahme ist ebenfalls kritisch zu sehen, wenn von einer theoretischen inkonstanten Loslösung von Tumorzellen aus dem Primärtumor ausgegangen wird. Deshalb schlagen Autoren zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse einen Mix aus Blut mit verschiedenen Entnahmezeitpunkten (116) vor.

Bereits früh stellte sich in der Etablierung von PCR Assays für Tumormarker die Frage, inwieweit Zellseparations- und -anreicherungsverfahren sinnvoll sind. Kritisch sind diese Methoden insofern zu bewerten, als die „Minimal residual cancer cells“ zu einem Großteil aus der mononukleären Zellphase, jedoch auch aus der Granulozytenfraktion isoliert werden können (14, 139, 140). Aufgrund der genomischen Heterogenität solider Tumoren (141) sind immunomagnetisch basierte Zellanreicherungstechniken fehleranfällig. Im klinischen Einsatz wirken sich große Probenvolumina und zeitaufwendige Protokolle der Zellseparationsverfahren (14) sicherlich nachteilig aus.

Auf diesen Ergebnissen basierend und um einen möglichen Verlust der Tumorzellen zu verhindern, wird bei dem hier etablierten PCR Assay für Tg mRNA auf Zellseparationstechniken wie z. B. „fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) verzichtet und peripheres Blut einzeitig in fünf Milliliter EDTA abgenommen.

### 6.1.2 RNA Isolationsmethoden

Die kurze Halbwertszeit der RNA in klinischen Proben macht sorgfältiges Arbeiten in einem kleinen Zeitfenster von unter drei Stunden (142) nötig und stellt im klinischen Alltag ein nicht unerhebliches Problem dar. Ein Anstieg der RNA Konzentration nach der Blutentnahme ist u. a. durch zytokinvermittelte Geninduktion in Folge der Hämoglobinfreisetzung (143) mit nachfolgender Beeinflussung der PCR Resultate möglich. Somit ist neben einem möglichst kleinen Zeitfenster auch die Elimination bzw. Lyse der Erythrozytenfraktion wichtig, da Effekte durch z. B. Porphyrinreste des degradierten Hämoglobins auf die Taq Polymerase nicht auszuschließen sind (144). Eine Lösung für den klinischen Alltag mit einem großen Probendurchsatz stellen sogenannte RNA Stabilisatoren dar, die eine Lagerung der Proben bei Raumtemperatur von bis zu 48 Stunden bzw. bei 4°C von mehreren Tagen gestattet; deren Nutzen jedoch unterschiedlich bewertet wird (14).

Neben der klassischen RNA Isolation nach Chomczynski et al. (122) stehen kommerziell erhältliche RNA Präparationskitsysteme zahlreicher Hersteller zur Verfügung. El Hefnawy et al. (142) vergleichen nach reverser Transkription mittels PCR Analyse die Ausbeute exogen zugesetzter bakterieller  $\beta$ -Galaktosidase RNA ( $\beta$ -GUS) und 18S rRNA das präzipitationsgestützte Verfahren nach Chomczynski et al. (122) mit den kommerziellen matrixgestützten RNA Isolationssystemen von Qiagen (RNeasy mini Kit) und Promega (SV Total - RNA Isolation Set). In der anschließende PCR Analyse wird die  $\beta$ -GUS Ausbeute mit 35 - 40 % und die der 18S rRNA mit 5 - 10 % nach Chomczynski et al. (122) angegeben. Die Ausbeute der Kitsysteme liegt für SV Total - RNA Isolation Set bei 3 - 4 % der 18S rRNA, die  $\beta$ -GUS RNA ist nicht nachweisbar und für den RNeasy Mini Kit für  $\beta$ -GUS RNA bei 0,2 - 0,4 %, die der 18S rRNA ist nicht angegeben. Die Arbeitsgruppe (142) leitet aus ihren Ergebnissen einen Vorteil der präzipitationsgestützten gegenüber den matrixgestützten RNA Isolationsverfahren ab. Im RNA - Qualitätsvergleich stellt die Arbeitsgruppe keine signifikanten Unterschiede fest.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit decken sich nicht mit den Schlussfolgerungen von El Hefnawy et al. (142): die Qualität der isolierten Total - RNA ist in dem präzipitationsgestützten Verfahren nach Chomczynski et al. (122) schlechter als in den matrixgestützten kommerziellen Isolationsverfahren verschiedener Hersteller (Qiagen, Macherey- Nagel). Vorteilhaft ist vor allem die geringe RNA Konzentrationsbreite (Tabelle 12) der kommerziellen Kitsysteme, die eine standardisierte reproduzierbare RNA Präparati-

on erlauben. Ausschlaggebend für den Einsatz kommerzieller Kitsysteme in der vorliegenden Arbeit sind jedoch der geringere Zeitaufwand (60 versus 250 min) sowie die geringeren erforderlichen Probenvolumina (5 versus 10 ml), die eine Integration des PCR Assays in die klinische Routine vereinfachen.

Die diskrepante Bewertung der verschiedenen Isolationsmethoden ist wahrscheinlich auf die unterschiedlichen Probenmaterialien und Fragestellungen zurückzuführen. So stellen Bustin et al. (145) fest, dass mit diesem RNA Isolationssystem in unterschiedlichen Geweben die RNA Ausbeute, gemessen an der RNA - Konzentration im Verhältnis zur Gesamtkonzentration aller isolierten Nukleinsäuren, divergiert und somit gewebeabhängig ist. In dieser Studie entfallen in Brustdrüsenbiopsien 60 %, in Kolon-schleimhautbiopsien 70 % und in einer Zelllinie 50 % der isolierten Nukleinsäuren auf die RNA (145). Durch die RNA Konzentrationsunterschiede der Zellkulturzellen und der Biopsien wird deutlich, dass Rückschlüsse von in vitro auf in vivo schwierig sind (116). Offensichtlich verhalten sich Kulturzellen und ex vivo isolierte Zellen bei der säulengestützten RNA Isolation unterschiedlich.

Des Weiteren verdeutlichen die Resultate von Bustin et al. (146) und weiterer Studien (142, 147), dass nur ca. 50 – 80 % der isolierten Nukleinsäuren auf RNA zurückzuführen sind. Die restlichen 20 – 50 % entsprechen isolierter DNA und damit einem möglichen Störfaktor sowohl in der nachfolgenden reversen Transkription als auch v. a. in der quantitativen PCR durch z. B. mögliches Mispriming der eingesetzten Primer. Speziell in quantitativen Analysen niedrig exprimierter mRNA wie z. B. die der Tg mRNA im peripheren Blut von DTC ist ein Einfluss durch genomische DNA Kontaminationen nicht auszuschließen. Obwohl heutzutage bis auf wenige Ausnahmen in der nachfolgenden PCR intronspannende Primer eingesetzt werden, ist ein zusätzlicher Abbau der genomischen DNA durch DNase sinnvoll, da eine Beeinflussung der Reaktion z. B. durch Mispriming weiter reduziert werden kann. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass mögliche falsch positive Ergebnisse durch Pseudogene minimiert werden. Sogenannte Pseudogene entsprechen nicht transkribierter DNA. Sie weisen keine Introns auf und unterscheiden sich nur in wenigen Nukleinsäuren von der mRNA, so dass ein Mispriming in der nachfolgenden Annealingphase der PCR möglich ist (14). Diese theoretischen Überlegungen werden durch Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigt, denn bereits in der Agarosegelanalyse konventioneller PCRs weisen die mit DNase behandelten und anschließend revers transkribierten RNA Proben eine deutlich höhere Signalintensität der Banden auf (Vorversuche nicht gezeigt).

Andererseits birgt dieser zusätzliche Schritt in der RNA Isolation auch die Gefahr falsch negativer Ergebnisse in der nachfolgenden PCR durch eine nicht ausreichende Inaktivierung des Enzyms, was im Abbau der synthetisierten und zu amplifizierenden cDNA (145, 146) resultiert. Um diesem Verdacht nachzugehen, wird ein Modellversuch durchgeführt, in dem ein dem RNA Eluat zugesetztes Plasmid die cDNA simuliert und auf seine Integrität gelelektrophoretisch hin untersucht wird. Eine DNase Restaktivität ist bei verschiedenen Kits trotz strikter Einhaltung der Herstellerprotokolle wegen vermutlicher Renaturierung des Enzyms nach Denaturierung bei 95°C nachweisbar. Die verschiedenen Kitsysteme weisen eine unterschiedliche Ausprägung der DNase Restaktivität gemessen an der Integrität des Plasmids auf. Kritisch ist dieser Aspekt gerade in der Tumornachsorge und in der Diagnostik von Mikrometastasen zu sehen, denn dort ist von einer anteilig sehr geringen Zellzahl und sehr geringen Konzentrationen der cDNA Zielsequenz im peripheren Blut auszugehen. Hier ist ein falsch negatives Ergebnis durch eine mögliche unvollständige Inaktivierung des Enzyms als besonders kritisch einzuschätzen; falsch negative Ergebnisse sind jedoch auch durch mit der RNA bzw. cDNA konkurrierende DNA in der reversen Transkription und PCR denkbar.

Somit reduziert ein zusätzlicher DNase Schritt mögliche falsch positive Ergebnisse, birgt jedoch das Risiko falsch negativer Ergebnisse, so dass je nach Fragestellung abzuwiegen ist, inwieweit ein DNase Protokoll vorteilhaft und sinnvoll ist. Genau diese Problematik versucht ein speziell für die PCR Diagnostik im peripheren Blut entwickeltes Kitsystem zu lösen (147), dessen Vorteil jedoch in weiteren Studien bestätigt werden muss.

Aufgrund dieser Überlegungen, der Ergebnisse (Tabelle 12 ) und mit der Zielsetzung des klinischen Einsatzes des PCR Assays für Tg mRNA wird die RNA Isolation mit dem QIAamp® RNA Blood Mini Kit mit RNase-free DNase Set durchgeführt. Das Zeitfenster bis zur RNA Isolation liegt in allen Proben unter zwei Stunden. In dem verwendeten matrixgestützten RNA Präparationskit wird eine frühe Inaktivierung der RNase durch einen Guanidinisothiocyanat enthaltenden Puffer gesichert. Die ausgewählte RNA Isolationsmethode stellt einen Kompromiß zwischen klinischer Praktikabilität, Standardisierung, möglichst hoher RNA Konzentration und RNA Qualität dar.

### 6.1.3 Reverse Transkription

Der nächste Schritt in einem PCR Assay aus peripherem Blut stellt die reverse Transkription der isolierten RNA in cDNA dar, in dem die eingesetzte RNA Menge der

synthetisierten cDNA entsprechen muss. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Protokollvarianten (145):

- „one tube - two enzyme“, d.h. reverse Transkription und Amplifikation der Zielsequenz in einem Gefäß mit zwei Enzymen (reverse Transkriptase, Taq- Polymerase).
- „two tube - two enzyme“, d.h. reverse Transkription und Amplifikation der Zielsequenz in zwei Gefäßen mit zwei Enzymen (reverse Transkriptase, Taq- Polymerase).

„One Tube Assays“ mit hitzeaktivierbarer reverser Transkriptase und Taq - Polymerase mit unterschiedlichen Temperaturoptima besitzen in der Routinediagnostik im Zuge der Vollautomatisierung einen Vorteil. Dagegen sind „two tube systems“ vor allem für Etablierung von PCR Assays geeignet. Die Auswahlkriterien der Enzyme, d. h. der reversen Transkriptase und Polymerase sind: eine Enzymaktivität über eine möglichst große Substratkonzentration, ausreichende Sensitivität und Spezifität. Die Auswahl des geeigneten Protokolls und der Enzyme ist von der Fragestellung und der Zielsequenz abhängig; so bereiten G/C reiche Zielsequenzen ein Problem für die reverse Transkription bei 40 bzw. 50° C durch einen vorzeitigen Abbruch oder ein überspringen dieser Nukleotidsequenzen (148).

Eine dritte Protokollvariante, das sogenannte „one enzyme - one tube assay format“ mit einem Enzym, das die reverse Transkription und anschließende Amplifikation katalysiert, ist nicht weiterentwickelt worden. Gründe hierfür liegen vermutlich in der fehlenden Vergleichbarkeit mit anderen Formaten und methodischen Problemen (146).

In zahlreichen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vorversuchen (nicht gezeigt) weist die reverse Transkriptase SuperScript II (GibcoBRL, Inchinnan, UK) Vorteile in einem PCR Assay für Tg mRNA auf. Gestützt wird diese Beobachtung durch Bustin et al. (145), die eine fünffach höhere cDNA Ausbeute im Vergleich verschiedener reverser Transkriptasen vor allem für Zielsequenzen mit zu erwartender niedriger Expressionsrate für das o. g. Enzym nachweisen.

Neben der Enzymaktivität bestimmen auch die ausgewählten Primer die Effizienz der cDNA Synthese. In der vorliegenden Arbeit werden in der reversen Transkription oligo – dT - Primer eingesetzt. In der Etablierungsphase wird eine Protokollvariante mit unspezifischen Random - Hexamer - Primern durchgeführt, die neben der reversen Transkription der mRNA auch die der ribosomalen - und tRNA initiieren. Der Vorteil des unspezifischen random Hexamer Primings liegt in der theoretisch höheren Ausbeute an cDNA

und damit auch an Transkripten der Zielsequenz in der nachfolgenden PCR. Dieser theoretisch positive Effekt der Random Hexamer Primer wird in Einzelexperimenten (nicht gezeigt) der vorliegenden Arbeit bestätigt. Auf eine erneute zweite reverse Transkription muss jedoch aufgrund begrenzten Probenmaterials und einer eingeschränkten Vergleichbarkeit beider Varianten verzichtet werden.

#### **6.1.4 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Die PCR ist eine sensitive doch dadurch auch fehleranfällige Methode, die zu falsch positiven bzw. negativen Ergebnissen führen kann. Um eine erfolgreiche RNA Isolation und reverse Transkription sicherzustellen, sind geeignete Kontrollproben, die Störungen anzeigen, unablässig. Als Kontrolle amplifizierbarer intakter cDNA und damit auch einer erfolgreichen RNA Isolation dient die Amplifikation von konstitutiv exprimierten sogenannten Housekeepinggenen wie z. B. beta - Aktin (116) oder in der vorliegenden Arbeit GAPDH.

Das Primerdesign für die Zielsequenz stellt einen weiteren entscheidenden Faktor für die Sensitivität und Spezifität eines PCR Assays dar, wie es auch in dieser Arbeit während der Etablierungsphase (Abbildung 9, 10 und 11) und in der Literatur (149) aufgezeigt wird. Dabei ist ein Ziel, das sogenannte PCR Paradoxon (150, 151), d. h. die unspezifische Amplifikation nicht ausgewählter Gensequenzen, in einem unvorhersagbaren Ausmass zu minimieren. Gleichzeitig müssen Kontrollmechanismen für alternatives Spleißen und genomische Kontaminationen in den PCR Assay integriert werden. Intronspannende Primer übernehmen diese Kontrollfunktion in den PCR Assays, da im Falle einer genomischen Kontamination längere PCR Produkte synthetisiert und im Agarosegel nachgewiesen werden können. In der Real - Time- PCR nach dem TaqMan - Protokoll erhöht sich die Spezifität durch den zusätzlichen Einsatz der Sonde und durch Exon – Exon überspannendes Sondendesign. Bei genomischer DNA Kontamination und Exon – Exon überspannender Sonde bleibt ein Annealing und damit das spezifische Reportersignal aus.

Einen anderen limitierenden Faktor stellt der von Schamhart et al. (151) aufgegriffene Monte Carlo Effekt dar. Karrer et al. (152) führen diesen Begriff erstmals ein und definieren ihn als kleine zufällige Unterschiede in der Amplifikationseffizienz sehr niedrig konzentrierter Zielsequenzen in einem cDNA Pool. Damit könnte der Monte Carlo Effekt in der Tumornachsorge eine Quelle falsch negativer Ergebnisse darstellen, da gerade hier von verhältnismäßig niedrigen mRNA Konzentrationen der Zielsequenz ausgegan-

gen werden muss. Wie die Arbeitsgruppe belegen kann, erhöht  $MgCl_2$  die Spezifität des Primerannealings und minimiert den Monte Carlo Effekt. In der vorliegenden Arbeit ist zwar von sehr niedrigen Tg mRNA Konzentrationen in DTC auszugehen, die  $MgCl_2$  Konzentration beträgt jedoch in allen PCR Ansätzen 1,5 mM, so dass sich kein Hinweis eines Monte Carlo Effektes ergibt. Eine andere Fehlerquelle liegt in konkurrierenden Nebenreaktionen in Primerdimerisation, die die PCR Sensitivität signifikant beeinflussen können (146).

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer erfüllen die Kriterien der Spezifität und Sensitivität (s. Kapitel 5.2). In der Suche nach dem sensitivsten Primerpaar gemessen an der höchsten Signalstärke in Ethidiumbromid angefärbten Agarosegelen fällt die Wahl auf Tg Tak, das schließlich auch in der Real - Time- PCR eingesetzt wird.

### 6.1.5 Quantitative PCR

Auch in der quantitativen PCR bzw. Real - Time- PCR ist die sorgfältige Primerauswahl und die Ausschaltung von Störfaktoren wie z.B. Mispriming und Primerdimerisation entscheidend für die Sensitivität des Assays. Im Gegensatz zur konventionellen PCR ist die Real - Time- PCR keine Endpunktanalyse. Sie ermöglicht durch den Einsatz von fluorogenen Sonden (125) das entstehende PCR - Produkt in der linearen Amplifikationsphase ohne post - PCR Schritte zu detektieren und mittels Software zu quantifizieren. Weitere Vorteile liegen in standardisierten PCR Bedingungen und in einer Minimierung der Cross – over - Kontaminationen. Die Weiterentwicklung der TaMan - Sonden z. B. durch Scorpion - Primer, in denen Primer und Sonde vereint sind, (145) versprechen neben einer weiteren Vereinfachung der Real Time Protokolle eine schnellere Signalentstehung und größere Signalstärken (153, 154).

Grundsätzlich stehen zwei verschiedene Arten der Quantifizierung zur Auswahl: die absolute und relative Quantifizierung. In der vorliegenden Arbeit ist die Konzentration der Zielsequenz Tg mRNA als Ratio zur mRNA Konzentration des Housekeeping Gen GAPDH beschrieben. Diese relative Quantifizierungsmethode ist möglich, wenn die PCR Effizienz von Tg und GAPDH mRNA annähernd gleich ist. Anhand der Analyse der Standardkurven (Abbildung 7) wird eine gleiche Steigung ( $s$ ) für GAPDH und Tg mRNA ermittelt, so dass nach der Formel  $(10^{(1/s)} - 1)$  eine identische PCR Effizienz vorliegt. Alternativen zur Normierung auf ein Housekeepinggen sind die Normierung auf Gesamt RNA oder auf ribosomale RNA einer Probe (145).



Verglichen mit der relativen wird die Zielsequenz in der absoluten Quantifizierung nicht als Ratio, sondern in absoluten Zahlen angegeben. Zu beachten ist, dass auch diese Methode die Konzentration der Zielsequenz mit der eines zuvor kreierten Standards mit definierten Konzentrationen z. B. eines Plasmids vergleicht und angibt. Im Unterschied zur relativen Quantifizierung fließt jedoch keine Expressionsrate eines Housekeeping Genes oder ribosomaler RNA in das Ergebnis ein.

Die Vorteile der relativen Quantifizierung liegen in der einfacheren Etablierung, Optimierung der PCR Protokolle. Zusätzlich kann die erfolgreiche cDNA Synthese durch Expression des Housekeepinggenes kontrolliert werden. Des Weiteren lassen sich aufgrund des theoretischen proportionalen Verhältnisses der Zielsequenz zum Housekeepinggene (147), cDNA Konzentrationsunterschiede verschiedener Proben mathematisch korrigieren. Der Nachteil ist jedoch, daß die Transkriptionsrate der Zielsequenz und des Housekeepinggenes von Zytokinen und Wachstumsfaktoren reguliert wird, so dass ein interindividueller bzw. auch individueller Vergleich verschiedener Entnahmepunkte von z. B. Tg mRNA Konzentrationen schwierig ist. Zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Arbeit liegen jedoch im Gegensatz zu heute keine Studien vor, die eine Normierung auf Housekeepinggenes als nicht geeignet bewerten. Erst nachfolgende Studien einiger Arbeitsgruppen beurteilen den Einsatz von Housekeepinggenes als Normierungsparameter durch heterogene mRNA Konzentrationen als ungeeignet, da diese in viele Zellstoffwechselforgänge wie die Membran- und Zytoskelettsynthese, Apoptose, etc. involviert sind. Andere Arbeitsgruppen bewerten eine derartige Normierung als zulässig (145). Inwieweit die Normierung auf rRNA eine konstantere und stabilere Methode darstellt, muss noch weiter validiert werden. Eine Vergleichbarkeit und Abhilfe der doch problembehafteten Normierung würden durch internationale Standardlösungen mit definierten Zielsequenzkonzentrationen analog des S-Tg Standards ermöglichen.

Inwieweit die Definition eines Grenzwertes der Zielsequenz in PCR Assays v.a. in der Tumornachsorge möglich bzw. sinnvoll ist, bleibt offen. Denn selbst die Definition eines Grenzwertes für S-Tg in etablierten Immunoassays ist umstritten. So wird im S-Tg Monitoring in der DTC Nachsorge der Konzentrationsverlauf bewertet (37). Vor diesem Hintergrund und der Tatsache der Etablierungsphase des PCR Assay für Tg mRNA wird auf die Definition eines Grenzwertes verzichtet.

### **6.1.6 Zusammenfassung**

Entscheidend für die Etablierung eines PCR Assays sind die Zielsequenz und die Fragestellung. In der vorliegenden Arbeit ist die Zielsetzung, einen Real - Time- PCR Assay für Tg mRNA im peripheren Blut zu etablieren. Dieser soll in den klinischen Ablauf der DTC Nachsorge integriert werden können, so dass sich der PCR Assay für Tg mRNA aus dem peripheren Blut nach mehreren Optimierungsschritten wie folgt zusammensetzt:

Mittels des QIAamp® RNA Blood Mini Kit mit DNase Protokoll wird die gesamte RNA aus fünf Milliliter EDTA Blut innerhalb von zwei Stunden nach Blutentnahme isoliert. Im „two tube - two enzyme“ Format erfolgt die reverse Transkription mit oligo – dT - Primern und Superscript™ II als Enzym. In der nachfolgenden PCR werden die Primerpaare TgTak und GAPDH eingesetzt. Die gleiche PCR Effizienz beider Amplifikationsprodukte erlaubt eine relative quantitative Analyse, d.h. die Konzentration von Tg und GAPDH mRNA werden mittels Standardkurven quantifiziert und Tg normiert auf GAPDH mRNA. Die in vitro ermittelte Sensitivität liegt bei ca. einer FTC 133 - Zelle in einem Milliliter EDTA - Blut. Ein Grenzwert wird nicht definiert.

## **6.2 Thyreoglobulin (Tg) mRNA als Tumormarker**

Ausgehend von der Tatsache, dass abgeschilferte Thyreozyten bzw. disseminierte DTC Metastasenzellen im peripheren Blut mit Hilfe der Detektion schilddrüsenpezifischer mRNA in der PCR nachzuweisen sind, liegt der klinische Einsatz der Tg mRNA im peripheren Blut als Tumormarker nahe. Dabei muss der etablierte PCR Assay für die Detektion von Tg mRNA als Anforderungsprofil eines Tumormarkers die Kriterien Sensitivität, Spezifität und Dynamik erfüllen. Unablässig in hoch sensitiven diagnostischen Verfahren wie der PCR sind geeignete Kontrollgruppen.

Diese Aspekte werden anhand gesunder Probanden (Mix aus  $n = 10$ ), Patienten mit kongenitaler Hypothyreose ( $n = 4$ ) und mit rhTSH behandelten DTC Patienten i.R. der Tumornachsorge ( $n = 4$ ) in diesem Kapitel überprüft.

### **6.2.1 Sensitivität und Spezifität des PCR Assays für Tg mRNA**

In den vorangegangenen Kapiteln ist bereits eine ausreichende Sensitivität mit einem Detektionslimit von einer Zelle/ ml EDTA - Blut und Spezifität des PCR Assays für Tg mRNA nachgewiesen. Eine thyreoidale Spezifität der Tg mRNA liegt nicht vor. Vielmehr setzt sich der gemessene Tg/GAPDH mRNA Wert aus thyreoidaler sowie extrathyreoi-

daler transkribierter freiwerdender zellulärer Tg mRNA und vermutlich frei sezernierter Tg mRNA zusammen.

## 6.2.2 Kontrollgruppen

### 6.2.2.1 Gesunde Probanden

In PCR Assays für die klinische Routine sind Positiv - und Negativkontrollen als Qualitäts- und Sensitivitätskontrolle zwischen den Einzelergebnissen neben den o.g. Kriterien unablässig. Primär sollte in dieser Arbeit ein Mix der Gesamt – RNA von zehn Probanden ohne Hinweis auf eine Schilddrüsenerkrankung als Negativkontrolle für eine DNA Kontamination des Real - Time - PCR - Assays für Tg mRNA dienen. Doch bereits in Vorversuchen (Ergebnis nicht gezeigt) ist in der Leerprobe Tg mRNA in der konventionellen PCR nachweisbar. Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass im peripheren Blut gesunder Menschen Thyreozyten zirkulieren, so dass der RNA Mix der zehn Gesunden als Positivprobe definiert wird. Mit Hilfe der Real – Time - PCR wird die Tg mRNA relativ zu dem Housekeepinggene GAPDH quantifiziert. Die Tg/GAPDH mRNA Ratio liegt im RNA Mix der gesunden Probanden bei  $14,9 \times 10^{-6}$ .

Die Ergebnisse decken sich mit den von Ringel et al. (155) publizierten qualitativen PCR Daten für Tg mRNA im peripheren Blut, wo das Detektionslimit mit ca. zehn Thyreozyten/ml Blut angegeben wird. Die Variationsbreite von Tg mRNA in quantitativen PCR Analysen ist hoch und liegt zwischen 26 - 1502 pg Tg mRNA/ totaler thyreoidaler RNA im peripheren Blut gesunder Menschen (n = 32) nach (156). Aus den gewonnenen Erkenntnissen der Arbeit von Wingo et al. (156) und vorausgesetzt, dass jeder Thyreozyt ca. 20 pg (156) totaler RNA besitzt, ist von 20 - 25 Thyreozyten pro Milliliter peripherem Blut gesunder Menschen auszugehen. Auf diesen Daten basierend erklärt sich auch der fehlende Tg mRNA Nachweis in der Studie von Ditkoff et al., in deren PCR Assay das untere Detektionslimit bei 200 Thyreozyten/ml Blut liegt (119).

Überraschend sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und anderer Arbeitsgruppen (155, 156) nicht: Als Ursachen sind die Loslösung einzelner Thyreozyten aus dem Zellverband in die Blutbahn unter mechanischer Belastung durch raumforderndes Tumorstadium neben der physiologischen Loslösung im Rahmen des Zellturnovers denkbar, so dass deren Tg mRNA im peripheren Blut mittels PCR detektiert werden kann.

Die bisher allgemeingültige Meinung, dass freie mRNA extrazellulär unverzüglich abgebaut wird und praktisch nicht vorliegt, wird durch die Studie von El Hefnawy et al. (142) widerlegt. Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe (142) zeigen, dass exogen zugesetzte

RNA im Plasma unverzüglich im Gegensatz zu endogener RNA, die eine Halbwertszeit von bis zu drei Stunden besitzt, abgebaut wird. Als Schutzmechanismus endogener RNA im Plasma wird die postulierte RNA – DNA - Hybrid - Hypothese widerlegt, denn nach Zugabe von RNase H, die das Nukleotidhybrid abbaut, bleibt die RNA Wiederfindungsrate unbeeinflusst. Nach Zusatz der Detergenzien Natriumdodecylsulfat (SDS) oder Triton X, die RNA - Lipid oder RNA - Protein Wechselwirkungen stören, ist eine signifikante Degradation der RNA nachweisbar, so dass Lipoproteinvesikel als Protektionsmechanismus der endogenen RNA vor Plasma - RNAsen nahe liegen. Gestützt wird diese Theorie protektierender Lipoproteinvesikel durch die Ergebnisse einer Serumfiltration (0,2 µm Porengröße), die Protein und/oder Lipid RNA Komplexe zurückhält, während freie Nukleinsäuren bzw. DNA - RNA Hybride ungehindert den Filter passieren. Entsprechend wird in der nachfolgenden Real - Time - PCR 18S rRNA in den postulierten zurückgehaltenen Protein - Lipid – RNA - Komplexen der Filtermembran in höheren Konzentrationen als im Filtrat nachgewiesen. Somit ist auch eine Sekretion von mRNA bzw. freiwerdender Tg mRNA im Rahmen des Zelluntergangs und der nachfolgenden Detektion in der PCR aufgrund protektierender Mechanismen möglich (133-135).

Zusammenfassend ist Tg mRNA in gesunden Probanden im peripheren Blut in der konventionellen und Real - Time - PCR nachweisbar. Während über die Nachweisbarkeit der Tg mRNA im peripheren Blut Gesunder (124, 139, 147, 155-158) weitgehend Einigkeit zwischen den Arbeitsgruppen herrscht, ist der Ursprung umstritten. Neben abgeschilferten Thyreozyten (116) als mRNA Quelle wird sezernierte extrazelluläre Tg mRNA geschützt in Lipoproteinkomplexen im Serum (133-135, 142) postuliert.

#### 6.2.2.2 Konnatal athyreote Patienten

Nach den oben diskutierten Ergebnissen weisen Personen ohne jeden Hinweis auf Erkrankungen der Schilddrüse messbare Konzentrationen an Tg mRNA im Serum auf, so dass sie als Positivkontrolle des PCR Assays definiert werden. Neben einer Positiv- ist jedoch auch eine geeignete Negativkontrolle notwendig, die eine Situation der Abwesenheit von Tg mRNA im Serum repräsentieren soll, um so z. B. DNA Kontaminationen anzuzeigen. Doch selbst in thyreoidektomierten und/oder radiojodablatierten Struma oder DTC Patienten besteht die Möglichkeit des Vorkommens von Schilddrüsenrestgewebe und von messbaren Tg mRNA bzw. S-Tg Werten (123, 124, 157), so dass sie keiner geeigneten Negativkontrolle entsprechen. Dagegen erscheinen konnatal athyreote Patienten ohne nachweisbares Schilddrüsenengewebe und ohne die Möglichkeit einer

schilddrüsenspezifischen Tg Synthese eine verlässliche Negativkontrolle darzustellen. Umso überraschender die Ergebnisse der vermeintlichen „echten“ Negativkontrolle: in jedem einzelnen der vier athyreoten Patienten ist Tg mRNA in der konventionellen und in der Real - Time - PCR nachzuweisen.

Die Ergebnisse sind insofern erstaunlich, da eine Kontamination durch genomische DNA ausgeschlossen ist. In den Kontrollreaktionen ohne reverse Transkriptase (RT-) und in den PCR Negativkontrollen (no template control = NTC), in denen die Templates durch RNase freies Wasser im PCR Reaktionsansatz ersetzt sind, ist kein PCR Amplifikationsprodukt nachweisbar. Neben den Negativkontrollen RT *minus* und NTC als Kontrolle für eine spezifische DNA Kontamination der isolierten RNA werden intronspannende Primer in der konventionellen und Real - Time - PCR eingesetzt. Durch den Einsatz intronspannender Primer wird eine genomische DNA Kontamination durch längere PCR Amplifikate in der Gelelektrophorese kenntlich gemacht. In allen vier Patienten A1 - A4 fallen die Kontrollen wiederholt unauffällig aus (Abbildung 11).

Neben den methodischen Fehlern durch Kontamination, die den Tg mRNA Nachweis erklären könnten, ist auch an Schilddrüsenrestgewebe als Ursache zu denken. Jedoch ließen sich aus keiner der im Alter 10 - 18 Jahren durchgeführten Szintigrafien der Patienten Hinweise auf ektopes oder hypoplastisches Schilddrüsengewebe (Tabelle 5) gewinnen. Zusätzlich ist durch die langjährige Thyroxinsubstitutionstherapie zum Zeitpunkt der Blutentnahme von einer Involution des theoretisch möglichen Schilddrüsenrestgewebes auszugehen und differenziertes physiologisches Schilddrüsengewebe eher unwahrscheinlich (Professor Dr. med. C. Reiners; ~~Wissenschaftliche Mitteilung~~). Die Nachweise von Tg mRNA in gesunden Probanden auf eine physiologische Zellabschilferung (s. vorangegangener Abschnitt) in die periphere Blutzirkulation zurückzuführen ist, muss bei nachweislich konnatal athyreoten Patienten nach anderen Erklärungen gesucht werden. Diese unerwarteten Ergebnisse, Kontamination ausgeschlossen, legen einen extrathyreoidalen Ursprung der Tg mRNA im Sinne von illegitimer (127) bzw. ektopischer (128) Transkription nahe. Illegitime oder ektopische Transkription liegt in einer Größenordnung von einem Transkript in 500 - 1000 Zellen (127, 159) und damit 1000fach niedriger als der Durchschnitt niedrig abundanter mRNA (159). Darunter wird die Fähigkeit einer jeden Zelle durch die Aktivität ubiquitärer Transkriptionsfaktoren verstanden, jede mRNA des Organismus zu synthetisieren (127, 128, 159, 160). Dabei ist von einer konstanten ungesteuerten basalen Transkriptionsrate auszugehen (160). Die minimalen Mengen an illegitim bzw. ektopisch transkribierter

mRNA können für das Leben einer Zelle bzw. eines Organismus vernachlässigt werden, da die mRNAs und ihre translatierten Proteine erst in höheren Konzentrationen biologisch relevant werden. Um dem Ursprung der Tg mRNA in den athyreoten Patienten nachzugehen, ist eine mRNA Expressionsanalyse von Tg mittels Northern Blot Technik durchgeführt worden. Die mittels PCR Amplifikation mit dem Primerpaar TgTak (s. Tabelle 7 und 8) hergestellte und anschließend mit einem  $\beta$ -emittierenden Radioisotop ( $^{32}\text{P}$ ) markierte Tg cDNA von 167 bp Länge als Hybridisierungssonde zur synchronen qualitativen und quantitativen Expressionsanalyse in verschiedenen humanen Geweben und Organen (Multiple Tissue Array). Aufgrund der geringen Oligonukleotidanzahl der cDNA von 167 bp werden Sekundärstruktureffekte, die sich in geringer Sensitivität oder unspezifischen Hybridisierungssignalen ausdrücken, vermieden und gleichzeitig eine raschere Hybridisierung begünstigt. Die Northern Hybridisierung wird mit hoher Stringenz, wie dem Protokoll Kapitel 4.8 zu entnehmen ist, durchgeführt. Mittels Phosphoimageranalyse werden die Hybridisierungssignale der  $\beta$ -emittierenden  $^{32}\text{P}$  markierten Tg cDNA Sonde der unterschiedlichen Gewebe ausgewertet. Nicht nur in Schilddrüsengewebe ist die  $\beta$ -Strahlung der Tg cDNA Sonde messbar, sondern auch in abnehmender Intensität in den Speicheldrüsen, der Trachea, den Nieren, dem Pankreas, den Nebennieren, der Leber und dem Herz. Wie zu erwarten ist die Signalintensität der Schilddrüse mindestens 25fach höher als die extrathyreoidaler Gewebe. Diese Ergebnisse bestätigen bereits publizierte Daten anderer Arbeitsgruppen: So weisen Spitzweg et al. (161) schilddrüsenspezifische Transkripte wie NIS (Natrium Jodid Symporter), TSH Rezeptor, TPO (Thyreidea Peroxidase) und Thyreoglobulin in pathologisch unauffälligem Thymusgewebe nach. Lange ist es unklar gewesen, wie die körpereigenen Proteine peripherer Organe in den Thymus gelangen. In den letzten Jahren ist gezeigt worden, dass die medullären Thymuszellen einen Großteil der Proteine des Organismus auf niedrigem Niveau exprimieren und quasi als immunologischer Homunculus alle Organe abbilden (162). Aber auch Selliti et al. (163) können Tg mRNA aus Mesangiumszellen der Niere amplifizieren.

Die Organverteilung überrascht nur bedingt: In der Organogenese der Schilddrüse steuern die Transkriptionsfaktoren TTF1, TTF2 und Pax8 die einzelnen Entwicklungsphasen, v. a. ihr gemeinsames Auftreten wird daher auch als schilddrüsenspezifisch bezeichnet und ist ein wichtiger embryonaler Differenzierungsfaktor. Aber auch in anderen Geweben wird die Organogenese durch die Expression o. g. Transkriptionsfaktoren beeinflusst. So sind in der Pulmogenese TTF1 (164) und Pax8 in der Nephrogenese

(165) als wichtiger Trigger identifiziert worden. Mit dem extrathyreoidalen Nachweis der mehr oder minder schilddrüsenspezifischen Transkriptionsfaktoren TTF1 und PAX8 ist eine extrathyreoidale Tg mRNA Expression in pulmonalen und nephrogenen Geweben denkbar. Daneben ist die Einflussnahme ubiquitärer Transkriptionsfaktoren i. S. der ektopten illegitimen Transkription auf die Tg Expression im extrathyreoidalen Gewebe vorstellbar.

Nicht nur solides Gewebe stellt eine potentielle Quelle der Tg mRNA im peripheren Blut dar, sondern auch Lymphozyten und Granulozyten sind zu einer illegitimen/ektopten Tg mRNA Synthese befähigt (124, 139, 166). So werden in Vorversuchen (nicht dargestellt) der vorliegenden Arbeit nach Ficoll – Gradienten - Zentrifugation des peripheren Blutes sowohl in der polymorphnukleären (Granulozyten) als auch mononukleären (Lymphozyten, Monozyten) Fraktion Tg mRNA in der konventionellen PCR nachgewiesen.

Die illegitime Transkription scheint sich auch in den weiterentwickelten Immunoassays, d.h. auf Proteinebene, wiederzuspiegeln, wie die vorliegenden Ergebnisse bei einer ungestörten Wiederfindung nahelegen. So ist in allen vier Patienten (A1, A2, A3, A4) nach initial negativer S-Tg Bestimmung (Dynotest Tg) in einem sensitiveren Immunoassay (Dynotest Tg-plus) S-Tg messbar. Festzuhalten ist, dass in konnatal athyreoten Patienten ohne Schilddrüsenrestgewebe eine Abschilferung von Thyreozyten in die periphere Blutbahn als Tg mRNA Quelle ausgeschlossen ist, so dass die nachgewiesene Tg mRNA auf ektope bzw. illegitime Tg mRNA Transkription in Blutzellen und/oder extrathyreoidalem Gewebe schließen lässt. Dies veranschaulicht noch einmal die Sensitivität der PCR Methode.

### **6.3 Dynamik des PCR Assays für Tg mRNA in vivo**

Anhand der Real - Time- PCR Ergebnisse der athyreoten Patienten, in denen von einer sehr niedrigen Tg Expressionsrate auszugehen ist, bestätigt sich eine ausreichende Sensitivität des PCR Assays für die Detektion von Tg mRNA. Zum Anforderungsprofil eines Tumormarkers gehört neben einer ausreichenden Sensitivität und Spezifität auch die Fähigkeit Konzentrationsänderungen i.S. einer Tumorprogression, -metastasen oder eines -rezidivs anzuzeigen, die sogenannte Dynamik. Um dieses Kriterium zu überprüfen werden Tg mRNA Werte im peripheren Blut von DTC Patienten (n = 4) vor und nach rhTSH Stimulation untersucht. Eine Expression des TSH - Rezeptors (TSHr) mit intakter Signaltransduktion vorausgesetzt, sollte rhTSH in zirkulierenden Schilddrüsenkarzinom-

zellen zu einem Anstieg der Tg mRNA führen. Einige Arbeitsgruppen (101, 167, 168) haben bereits eine erhöhte Radiojodaufnahme und eine erhöhte S-Tg Konzentration durch rhTSH Stimulation im Rahmen der Tumornachsorge bewiesen. Eine Tg mRNA Erhöhung nach Absetzen der L-Thyroxin Hormonsubstitutionstherapie sowie ein post-operativer Konzentrationsabfall der Tg mRNA ist bereits dokumentiert worden. Daten hinsichtlich des Verhaltens der Tg mRNA nach rhTSH Stimulation liegen zum Zeitpunkt der Experimente noch nicht vor.

In vier im Rahmen der Nachsorge mit rhTSH behandelten Patienten wird nach Stimulation ein Anstieg der Tg/GAPDH mRNA Konzentration dokumentiert (Abbildung 13, Tabelle 14). So erhöht sich auf mRNA Ebene das Tg/GAPDH Verhältnis nach Stimulation wie folgt: in R1 steigt sie auf das 1,22fache, in R2 auf das 3,5fache, in R3 auf das 2,5fache und in R4 auf das 1,5fache des Basalwertes. Wie erwartet steigen auch die S-Tg Werte (R1: 1,1fach, R2: 1,5fach, R3: 0,9 fach, R4: 1,6fach).

Inwiefern ist jedoch der Tg mRNA Anstieg durch ektope bzw. illegitime Transkription erklärbar? Sellitti et al. (163) weisen in humanen Nierenzellen eine Tg und TSHr Expression auf mRNA und Proteinebene sowie einen cAMP Anstieg nach TSH Stimulation nach; ein Tg Anstieg als spezifische Antwort auf eine TSH Stimulation ist jedoch auf beiden Ebenen nicht zu verzeichnen. Im Tiermodell bleibt auch nach Zugabe des second messengers (cAMP) des Adenylatcyclase gekoppelten TSHr die physiologische Erhöhung der Tg Transkriptionsrate in murinen Mesangiumszellen aus, so dass nur von einer partiellen TSHr Funktion auszugehen ist. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich die Hypothese aufstellen, dass ein Tg mRNA bzw. Proteinanstieg nach TSH Stimulation eine weitgehend intakte schilddrüsenpezifische Signaltransduktion sowie eine thyrozytenspezifische Zellorganisation voraussetzt. Davon ist jedoch in Mesangiumszellen und anderen Organen mit ektopischer Tg Synthese nicht auszugehen. Vielmehr ist in diesen Organen ein TSHr mit nur partiell erhaltener Signaltransduktion zu vermuten.

Im Thymus ist TSHr mRNA neben anderen schilddrüsenpezifischen Genen (NIS, TPO, Tg) zwar nachgewiesen (161), eine umfangreiche Literaturrecherche hat jedoch keinen Aufschluss über die Intaktheit einer TSHr Signaltransduktion ergeben.

In DTC dagegen kann eine gestörte, aber in Abhängigkeit der Histologie und des Grads dennoch weitgehend erhaltene schilddrüsenpezifische Signaltransduktion als gesichert gelten (169, 170). So weist DTC Gewebe eine gestörte bzw. verminderte mRNA und Proteinexpression der schilddrüsenpezifischen Gene für Tg, NIS, TPO, ThOX und Pendrin und eine weitgehend unbeeinflusste TSHr Expression auf (171). Kli-



nische Studien und experimentelle Arbeiten (172, 173) belegen eine deutlich erhöhte Radiojodaufnahme nach TSH Stimulation (155, 171, 174), so dass eine intakte Signaltransduktion nahe liegt. Selbst in dedifferenzierten Tumoren und in Metastasen (157) von DTC ist eine intakte Signaltransduktion für TSHr nachweisbar (171). Nach diesen Überlegungen und Ausführungen ist der dokumentierte Tg/GAPDH mRNA Anstieg nach rhTSH Stimulation in R1 – R4 als thyreoidalen Ursprung anzusehen.

Dies sind jedoch nur prinzipielle Überlegungen. Die individuelle Expression schilddrüsenspezifischer Gene und die Intaktheit der Signaltransduktion der Tumorzellen im Primärtumor oder in Metastasen sind unklar, zumal zusätzlich eine Divergenz des Primärtumors und der Metastasen bezüglich der biologischen Eigenschaften nicht unwahrscheinlich ist. Dennoch lässt sich aus den Daten der Real – Time - PCR für Tg mRNA, mit einem dokumentierten Anstieg der Expression nach rhTSH Stimulation, die Schlussfolgerung ziehen, dass Tg mRNA Konzentrationsänderungen z. B. i. R. einer Tumorphase detektierbar sind. Im Gegensatz zu extrathyreoidalem Gewebe ist im Tumorzellverband thyreoidalen Ursprungs gemäß den vorangegangenen Ausführungen von einer weitgehend intakten TSH Signaltransduktionskette auszugehen. Damit sind auch die ermittelten Tg mRNA Konzentrationen nach rhTSH Stimulation als thyreoidalen Ursprungs bzw. von DTC abstammend zu werten. Gleichzeitig bedeutet dies, dass stimulierte Tg mRNA Werte analog zu den S-Tg Werten einen zuverlässigeren Parameter in der Tumornachsorge darstellen.

Als problematisch ist jedoch auch nach TSH Stimulation der vermutlich individuell unterschiedliche Anteil der illegitimen Transkription an dem Gesamt Tg mRNA Pool anzusehen, der einen interindividuellen Tg mRNA Vergleich erschwert.

#### **6.4 Tg/GAPDH mRNA in Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom (DTC)**

In der Zusammenschau erfüllt der etablierte Tg mRNA Assay das Anforderungsprofil eines Tumormarkers mit den Kriterien Sensitivität, Spezifität und Dynamik. Zur ersten Abschätzung des klinischen Einsatzes des Real – Time - PCR Assays zur Therapiekontrolle in der Tumornachsorge und als Tumorverlaufsmarker, ist eine heterogene Gruppe von DTC Patienten (n = 12) nach Thyreoidektomie und Radiojodablation untersucht worden.

In allen DTC Patienten (n = 12) inklusive der mit rhTSH behandelten Patienten (n = 4) ist Tg mRNA in der konventionellen und Real – Time - PCR nachweisbar. Eine Korrelation zwischen den Tg/GAPDH mRNA und S-Tg Werten kann in beiden Patientengruppen jedoch nicht hergestellt werden. Dieses Ergebnis enttäuscht insofern, als dass eine Korrelation des theoretisch potentiellen Tumormarkers Tg mRNA mit dem etablierten S-Tg nicht gelingt.

Die mangelnde Korrelation der S-Tg und Tg/GAPDH mRNA Werte der jeweiligen Patienten - methodische Fehler ausgenommen - erklärt sich aus der Beantwortung der Frage was gemessen wird: Die S-Tg Bestimmung erfasst das gesamte frei sezernierte Tg Protein ohne die genauen Freisetzungsmechanismen zu kennen, durch Zelluntergang freigesetztes S-Tg und durch einen geringen Anteil extrathyreoidal translatiertes Tg z.B. des Thymus und/oder der Nieren. Dabei kann von einer Tg Proteinhalbwertszeit von ca. 62, 5 Stunden ausgegangen werden. Dagegen setzt sich der Tg mRNA Pool aus der mRNA von abgeschilferten Thyreozyten, DTC - Zellen, in Lipoproteinvesikeln geschützter und illegitimer ektopter mRNA zusammen. Die Halbwertszeit von mRNA im Serum beträgt nur ca. drei Stunden. Zusätzlich erschwert eine zeitversetzte Kinetik bei der Umsetzung der genetischen Information über die Transkription, Translation und Proteinfreisetzung der Tg mRNA und des Proteins einen direkten Vergleich zu einem Blutentnahmezeitpunkt. Anhand dieser Gegenüberstellung von Tg mRNA und Protein werden die Unterschiede der beiden Parameter deutlich und eine fehlende Korrelation der Ergebnisse des Immunoassays und PCR Assays für Tg auch verständlich.

Zu berücksichtigen ist aber auch die besondere Situation in DTC Patienten, denn es ist durchaus denkbar, dass ein maligne transformierter Zellverband noch in der Lage ist Tg mRNA zu exprimieren, obwohl eine Tg Translation und/oder Freisetzung ausbleibt. Ursächlich könnte z. B. eine Störung der posttranslationalen Modifikation und/oder des Tg Sekretionsmechanismus sein. Die Folge wäre die laborchemische Konstellation positiver Nachweis von Tg mRNA im PCR Assay und fehlendes S-Tg im Immunoassay (vgl. N7). Während dieser Aspekt einen hypothetischen Charakter für das DTC besitzt, ist eine erhaltene PSA mRNA Synthese bei ausbleibender PSA Proteinsynthese für das Prostatakarzinom bereits bestätigt worden (175).

Die stark divergierenden individuellen Tg/GAPDH mRNA Konzentrationen ohne Korrelation zum klinischen Stadium sind vermutlich auf die unterschiedlichen genetischen und epigenetischen Defekte des malignen Zellverbandes zurückzuführen. Die jeweiligen zu Grunde liegenden Defekte gehen wahrscheinlich mit unterschiedlichen

Transkriptomen und Proteasomen der DTC Subtypen sowie letztendlich mit unterschiedlichen Tg Konzentrationen im peripheren Blut einher. In Feinnadelaspirationsbiopsien sind bereits auf Transkriptomebene eine große Variationsbreite der Tg mRNA Konzentrationen der DTC Subtypen mittels serieller Genexpressionsanalyse (SAGE) (7) und Real – Time - PCR Analyse (176) nachgewiesen worden. Dabei werden für FTC die Tg mRNA Konzentrationen mit 0,21 –161 fmol/µg RNA und für PTC mit 0,05 - 209 fmol/µg RNA angegeben (176). Die Ergebnisse der Tg mRNA Expressionsanalysen in Abhängigkeit von der Histologie decken sich mit denen der immunhistochemischen Untersuchungen der DTC Subtypen (171, 174, 177). Die S-Tg Werte schwanken in Abhängigkeit der Histologie aber auch individuell, wie Robbins et al. (178) zeigen. So weisen Patienten ohne klinischen und paraklinischen Hinweis eines DTC Rezidivs in dieser Studie eine mittlere S-Tg Konzentration von 0,6 ng/ml mit Maximalwerten bis zu 7,6 ng/ml auf. In diesem Zusammenhang sei auch darauf verwiesen, dass die Zahl der Tg Protein exkretionsfähigen Zellen innerhalb einer Neoplasie in Abhängigkeit der biologischen Eigenschaften divergiert (179) und z. B. periphere Metastasenzellen höhere Tg Syntheseraten besitzen (157, 178).

S-Tg gilt nicht nur als Parameter in der Therapiekontrolle der DTC Nachsorge, sondern korreliert auch mit dem klinischen Stadium und dem Befund der bildgebenden Diagnostik (37). Die Tg/GAPDH mRNA Werte weisen bei kleiner Fallzahl (n = 12) und heterogener Zusammensetzung bezogen auf die unterschiedliche Histologie, Therapie und den Krankheitsverlauf keine Korrelation zum klinischen Stadium (TNM, AMES, MACIS Klassifikation) auf. So beträgt der Tg/GAPDH mRNA Mittelwert von Patienten mit bekannten Metastasen  $3,44 \times 10^{-6}$  und bei Patienten ohne Metastasen  $10,33 \times 10^{-6}$ . Damit werden bereits publizierte Studien, die eine Korrelation der Tg mRNA mit der MACIS (2, 180) und mit Ganzkörperszintigrammen in therapierten PTC (181) nachweisen, nicht bestätigt.

Doch welches Fazit ist aus dieser Tg Konzentrationsbreite sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene für den Einsatz als Tumormarker abzuleiten? Anhand der Resultate der vorliegenden Arbeit wird deutlich, dass die Tg Bestimmung aufgrund der Konzentrationsunterschiede auf Transkriptom- und Proteinebene als individueller Verlaufparameter zu verstehen ist. Dabei handelt es sich um einen Parameter, der in der Lage ist, einen erfolgreichen Therapieverlauf über Konzentrationsänderungen anzuzeigen, ohne jedoch einen Grenzwert definieren zu können.

Über den klinischen Einsatz eines Tumormarkers bzw. eines Nachweisverfahrens entscheidet auch die prognostische Aussagekraft der Methode hinsichtlich des weiteren Krankheitsverlaufs. Um das Potential des etablierten PCR Assays für Tg mRNA als Prognoseindikator zu beurteilen, ist retrospektiv über einen Zeitraum von drei Jahren der Krankheitsverlauf nach Bestimmung der Tg/GAPDH mRNA Werte untersucht worden. Dabei sind statistisch validierte Aussagen bei sehr kleinem Patientenkollektiv nur eingeschränkt möglich. Der Krankheitsverlauf der Patienten M2, M3 und N1 - N6 ist nach drei Jahren in der Tumornachsorge (S-Tg, Sono und Szintigrafie) als unauffällig zu beurteilen. Die Patienten M1 und M5 sind an der malignen Erkrankung bzw. an deren Folgen und N1 und N3 bei unbekannter Todesursache verstorben. Die Krankheitsverläufe von M4, N5 und N6 sind bei mangelnder Nachsorge Compliance nicht beurteilbar. Eine Korrelation des Krankheitsverlaufes mit den drei Jahren zuvor bestimmten Tg/GAPDH mRNA Konzentrationen kann in keinem der Patienten hergestellt werden. Weder die Patienten mit Tumorprogress und Tod durch die maligne Erkrankung noch die Patienten mit unauffälligem Verlauf weisen besonders hohe bzw. niedrige Tg/GAPDH mRNA Konzentrationen auf. In bezug auf Tabelle 15 seien an dieser Stelle die Tg/GAPDH mRNA Ratios von Patient M1 mit  $1,0 \text{ Tg/GAPDH}^{x10^{-6}}$  mRNA, der an der Tumorerkrankung im weiteren Verlauf verstorben ist, und die von Patient M2 mit  $2,6 \text{ Tg/GAPDH}^{x10^{-6}}$  mRNA mit unauffälligem Krankheitsverlauf angeführt, an deren Werten beispielhaft die fehlende Korrelation offensichtlich ist. Nicht nur in der Gruppe mit bekannter Metastasierung (M1 - M5), sondern auch in der Gruppe N1 - N6, die sich ohne klinische und paraklinische Anhaltspunkte eines Rezidivs in Remission befinden, korrelieren die erhobenen Tg/GAPDH mRNA Werte mit dem Krankheitsverlauf nicht. An dieser Stelle sei erneut auf den höheren Mittelwert der Tg/GAPDH mRNA der Patienten ohne Metastasierung (N1 - N6  $4,69^{x10^{-6}}$ ) im Vergleich zu dem der Patienten mit bekannten Metastasen (M1 - M5 mit  $3,44^{x10^{-6}}$ ) zum Zeitpunkt der Blutentnahme verwiesen. Damit ergibt sich anhand der vorliegenden Arbeit kein Hinweis eines sensitiveren Stagings (182) durch die Tg mRNA Bestimmung in der Tumornachsorge. Bewusst ist an dieser Stelle N7 ausgenommen worden; auf den Patienten wird in einem gesonderten Kapitel im Sinne eines Fallberichtes näher eingegangen werden.

Zusammenfassend ist eine Korrelation der Tg/GAPDH mRNA Werte mit den S-Tg Werten, dem klinischen Stadium und dem Krankheitsverlauf in keiner der untersuchten Patientengruppen im Gegensatz zu S-Tg (113, 131, 183) abzuleiten. Zurückführen ist dies wahrscheinlich auf die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften und Ursprünge

der mRNA bzw. des Proteins und die besondere Situation in DTC. Ein Nutzen als Tumormarker in der DTC Nachsorge ist eher als gering zu bewerten.

#### 6.4.1 Literaturüberblick der PCR Assays für Tg mRNA aus peripherem Blut

**Literaturüberblick PCR Assays für den Tg mRNA Nachweis im peripheren Blut in DTC**

| Studie                        | quantitativ | Falsch positiv  | Falsch negativ | Richtig positiv | Richtig negativ | Positiv-  | Negativkontrolle   |
|-------------------------------|-------------|---|----------------|-----------------|-----------------|-----------|--------------------|
| Bellantone et al. (184)       | nein        | Unterschiede abhängig von Histologie  |                |                 |                 |           |                    |
| Biscolla et al. (185)         | nein        | 3/19  | 5/14           | 10/15           | 16/19           | -         | -                  |
| Bojunga 1 et al. (186)        | nein        | 63/137  | 4/13           | 9/13            | 74/137          | 30/135    | 105/135            |
| Bojunga 2 et al. (186)        | nein        | 111/137   | 2/13           | 11/13           | 26/137          | 102/135   | 33/135             |
| Bugalho et al. (166)          | semi        | Kein Unterschied thyreodektomierter und gesunder Probanden  |                |                 |                 |           |                    |
| Chinappa et al. (187)         | nein        | 2/31  | 0/18           | 18/18           | 29/31           | -         | -                  |
| Ditkoff et al. (119)          | nein        | 7/78  | 0/9            | 9/9             | 71/78           | 0/15      | 15/15              |
| Fugazzola et al. (188)        | nein        | 9/18  | 2/22           | 20/22           | 29/18           | 2/2       | 0/2                |
| Grammatopoulos et al. (182)   | nein        | 3/10  | 1/14           | 13/14           | 7/10            | -         | -                  |
| Gupta et al. (149)            | nein        | 3/21  | 1/6            | 5/6             | 18/21           | -         | 17/18              |
| Ringel et al. 1 (155)         | nein        | 7/35  | 7/30           | 23/30           | 28/35           | -         | -                  |
| Tallini et al. (124)          | nein        | 5/8   | 6/16           | 10/16           | 3/8             | -         | 0/11(0/10)nach 30, |
| <i>Denizot et al. (189)</i>   | ja          | 0/8   | 13/15          | 2/15            | 0/8             | 2/2 (0/4) | 0/6 (0/7)          |
| <i>Elisei et al. (139)</i>    | ja          | 22/29   | 2/17           | 15/17           | 7/29            | 17/20     | 3/20               |
| <i>Eszlinger et al. (136)</i> | ja          | Keine Unterschiede zwischen DTC Patienten mit oder ohne Metastasen sowie zu anderen thyreoidalen Erkrankungen |                |                 |                 |           |                    |
| <i>*Fenton et al. (181)</i>   | ja          | Nur für PTC signifikant mit positiver Korrelation zum Stadium   |                |                 |                 |           |                    |
| <i>*Ringel et al. 2 (190)</i> | ja          | 13/33   | -              | -               | 5/5             | -         | -                  |
| <i>*Savagner et al. (157)</i> | ja          | 3/15  | 6/25           | 19/25           | 12/15           | -         | -                  |
| <i>Span et al. (140)</i>      | ja          | Kein Unterschied Patienten und Kontrollen positiv   |                |                 |                 |           |                    |
| <i>Takano et al. (158)</i>    | ja          | Patienten und Kontrollen positiv  |                |                 |                 |           |                    |
| <i>Wingo et al. (156)</i>     | ja          | PCR Assay nur an gesunden Probanden durchgeführt  |                |                 |                 |           |                    |

**TABELLE 16: LITERATURÜBERBLICK DER PCR ASSAYS FÜR Tg MRNA IN DTC.**

Die Arbeitsgruppen sind nach konventioneller und quantitativer PCR für Tg mRNA in der DTC Nachsorge geordnet. Arbeitsgruppen, die in quantitativen PCR Assays für Tg mRNA in der DTC Nachsorge einen Nutzen, sind mit \* bzw. diejenigen, die keinen Nutzen sehen, durch eine *kursive* Schrift gekennzeichnet.

Um die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besser einordnen zu können, wird in diesem Abschnitt ein kurzer Literaturüberblick der PCR Assays für Tg mRNA im peripheren Blut gegeben. Viel ist sich von PCR Assays gerade in der Tumornachsorge versprochen worden, so dass von verschiedenen Arbeitsgruppen zahlreiche konventionelle und Real

- Time- PCR Assays für die Bestimmung von Tg mRNA im peripheren Blut etabliert worden sind. In der Tabelle 16 sind die Studien und deren z. T. kontroverse Ergebnisse zusammengestellt. Aufgrund der großen Anzahl der Studien wird im folgenden Abschnitt nur auf einzelne PCR Assays für Tg mRNA im peripheren Blut näher eingegangen.

Der erste konventionelle Tg mRNA PCR Assay ist von Ditkoff et al. (119) etabliert worden. In die Studie (n = 100) sind 87 Patienten mit DTC, sechs mit benigner Erkrankung und anschließender Thyreoidektomie, und fünf gesunde Probanden eingeschlossen worden. Tg mRNA ist in 9/9 DTC Patienten mit Metastasen, in 7/78 DTC Patienten ohne Metastasen und in keinem der elf Patienten mit benignen sowie gesunden Probanden nachgewiesen worden. Mit diesen Ergebnissen ist erstmals gezeigt worden, dass Tg mRNA im peripheren Blut amplifiziert werden kann und diese mit dem klinischen DTC Stadium korreliert. Zwei nachfolgende Studien von Ringel et al. (155, 190) bestätigen den Nutzen des Tg mRNA PCR Assays in der DTC Nachsorge. In der ersten Studie (155) wird Tg mRNA aus dem peripheren Blut von 68 DTC Patienten nach erfolgter Thyreoidektomie unter Hormonsubstitutionstherapie untersucht. In allen Patienten mit szintigrafisch nachgewiesener Metastasierung (n = 14) ist Tg mRNA detektierbar, während nur acht dieser Patienten auffällige S-Tg Werte aufweisen. Unter T4 Therapie korreliert der szintigrafische Befund besser mit dem Ergebnis des PCR Assays als mit den S-Tg Befunden (79 % versus 36 % positive Korrelation, P < 0,01). In der zweiten quantitativen Analyse (190) liegen die Tg mRNA Konzentrationen über dem Detektionslimit von 3 pg Tg Äquivalent/ $\mu$ g thyreoidaler RNA in 38 % der Patienten mit negativer Szintigrafie, in 75 % mit thyreoidaler Anreicherung, in 84 % mit lokalem szintigrafischem Rezidiv und in 94 % mit peripheren Metastasen. Des Weiteren belegen Ringel et al. (190) keinen Einfluss von Tg Antikörpern auf den PCR Assay und bestätigen erneut die Korrelation mit dem szintigrafischen Befund. Aus den Daten leiten sie eine größere Sensitivität bei gleicher Spezifität während der L-Thyroxin Gabe im Vergleich zur S-Tg Bestimmung ab. Die Arbeit von Tallini et al. (124) vergleichen prä - und/oder postoperative Tg, TPO und Ret/PTC1 mRNA Konzentrationen in einem konventionellen PCR Assays in 24 DTC Patienten und 20 mit einer benignen thyreoidalen Erkrankung. Von 16 Patienten mit Metastasen sind zehn und von den acht Patienten ohne Metastasen sind fünf positiv auf Tg mRNA getestet worden. Die weiterführende Diagnostik bestätigt in vier der fünf positiven Fälle ein Rezidiv. Des Weiteren sind positive PCR Ergebnisse für Tg mRNA signifikant höher in Patienten mit einer malignen als mit benignen Erkrankungen. Savagner et al. (157) definieren in der Real – Time - PCR einen Grenzwert für die

Savagner et al. (157) definieren in der Real – Time - PCR einen Grenzwert für die Tg mRNA Konzentration im Serum von 1 pg/ $\mu$ g Total - RNA und berücksichtigen die illegitime Transkription. Die Arbeitsgruppe stellt weniger falsch negative Ergebnisse in dem PCR Assay im Vergleich zur S-Tg Bestimmung fest. Li et al. (147) weisen höhere Tg/beta Aktin mRNA Werte in DTC Patienten verglichen mit gesunden Probanden nach und führen diese auf eine erhöhte Transkriptionsrate und/oder eine Freisetzung von Tg mRNA aus dem Tumorzellverband bzw. aus den Metastasenzellen zurück. Zahlreiche weitere Arbeitsgruppen sehen in PCR Assays für Tg mRNA einen Vorteil in der Tumornachsorge von DTC gegenüber der S-Tg Bestimmung und/oder der Szintigrafie (149, 185, 187, 188).

Während die o.g. Autoren den Einsatz von Tg mRNA PCR Assays in der DTC Nachsorge durchweg positiv bewerten, beurteilen andere Arbeitsgruppen PCR Assays in der DTC Tumornachsorge als ungeeignet (136, 139, 140, 158, 186, 189, 191). Diese Arbeitsgruppen können keine Korrelation der Tg mRNA Konzentrationen mit S-Tg und dem Krankheitsverlauf dokumentieren. Bojunga et al. (186) führen einen konventionellen PCR Assay für Tg mRNA mit zwei Sensitivitäten durch zwei verschiedene Zyklenzahlen (30 versus 40 Zyklen) durch. Bei einer Zyklenzahl von 30 (normale Sensitivität) ist Tg mRNA thyreoidal nachweisbar. Wird der PCR Assay dagegen mit einer hohen Sensitivität, d. h. einer Zyklenzahl von 40 durchgeführt, ist auch extrathyreoidale Tg mRNA zu erfassen. Damit bestätigen Bojunga et al. (186) die quantitativen Ergebnisse von Tallini et al. (124), die in humanen nicht thyreoidal malignen Zelllinien (n = 10) und in Kontrollen (n = 11, inklusive laryngo - thyreidektomierter Patient bei squamösem Karzinom) nach 30 Zyklen keine Tg mRNA, hingegen nach 40 Zyklen in allen Proben Tg mRNA nachweisen. Takano et al. (158) weisen Tg mRNA in allen untersuchten thyreidektomierten DTC Patienten ohne signifikante Unterschiede der Tg mRNA Konzentration in Patienten mit oder ohne Metastasierung sowie in vier Patienten mit medullären Schilddrüsenkarzinomen nach.

Denizot et al. (189) führen als weitere Fehlerquelle in der Beurteilung der Tg mRNA Konzentration alternatives Splicing mit verschiedenen RNA Transkripten (5), die in benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen identifiziert worden sind (18), an. Durch diese im Falle des Tg Gens recht hohe Anzahl von elf alternativen Splicetranskripten fällt der Primerauswahl eine besondere Bedeutung zu, die sowohl zu falsch positiven bzw. falsch negativen Ergebnissen führen kann. Aber auch hier gehen die Ansichten über den Einfluss des alternativen Splicings auf das Ergebnis der PCR Assays

auseinander: So verwenden Savagner et al. (157), Tallini et al. (124) und Elisei et al. (139) Primersequenzen verwenden, die nicht in Gensequenzen bekannten alternativen Splicings liegen und kommen dennoch zu konträren Bewertungen hinsichtlich des klinischen Nutzens der Tg mRNA Assays im peripheren Blut in der DTC Nachsorge. Aus diesem Grund bezweifeln auch Span et al. (140) einen signifikanten Einfluss alternativer Splicetranskripte auf die PCR Ergebnisse. So hat die Literaturrecherche für das in dieser Arbeit verwendete Primerpaar zwar alternatives Splicing in Exon 46 in drei von 35 Tg cDNA Klonen von zwei Verwandten mit Pendred Syndrom ergeben, in 150 Tg cDNA Klonen von sieben anderen Schilddrüsen sind in dieser Studie jedoch keine Spliceformen nachweisbar (118). Damit ist ein Einfluss auf die Ergebnisse des PCR Assays für Tg mRNA der vorliegenden Arbeit eher unwahrscheinlich.

Neben der Frage, ob Tg mRNA und S-Tg Werte miteinander korrelieren, ist auch von Interesse, ob es eine Korrelation zwischen Tg mRNA Werten und dem klinischen Stadium und/oder szintigrafischen Befund gibt. Hier liegt ebenfalls eine konträre Datenlage vor: Während Ringel et al. (190) eine positive Korrelation der Tg mRNA Werte mit dem szintigrafischen Befund mit signifikanten Unterschieden der Tg Expressionsrate von Patienten mit pathologischer im Vergleich zu fehlender Radiojodaufnahme postulieren (156, 190), bestreiten Span et al. (140) eben diese anhand ihrer Untersuchungen. So wiederholen Span et al. (140) den von Ringel et al. (190) etablierten Real - Time - Assay an 58 Patienten mit FTC ( $n = 16$ ), PTC ( $n = 21$ ) und histologischen DTC Mischformen ( $n = 18$ ) ohne signifikante Unterschiede der Tg/ beta Aktin mRNA von Patienten mit bzw. ohne Radiojodaufnahme nachzuweisen ( $P = 0,871$ ). Die prospektive Aussagekraft der Tg mRNA Bestimmung im peripheren Blut ist nach den Resultaten von Elisei et al. (139) in Frage zu stellen. Zwar besitzt der Tg mRNA Assay eine Sensitivität von 82,3 %, jedoch nur eine Spezifität von 24,2 %. Kritisch wird von den Autoren vor allem das Ergebnis der als krankheitsfrei definierten Gruppe ( $n = 29$ ) mit 75,8% positiver Tg mRNA bei negativer S-Tg Bestimmung gesehen: Denn in einer retrospektiven Studie entwickeln in einem mittleren Beobachtungszeitraum von 8,51 Jahren nur 0,6 % von 315 DTC Patienten mit negativer Bildgebung und negativen S-Tg Werten ein Rezidiv. Auf dem Boden dieser Studie ist es schwer vorstellbar, dass die 75,8 % der 29 DTC Patienten mit positiver Tg mRNA ohne eine weitere paraklinische oder klinische Pathologie ein Rezidiv entwickeln werden. Barzon et al. (192) vergleichen die Sensitivität von schilddrüsenspezifischen Markern (NIS, Tg, PDS, TSHr, TPO) in der Real – Time - PCR und kommen zu dem Schluss, dass die Bestimmung von Tg, NIS und PDS zur Differenzie-



rung von gesunden und in Remission befindlichen Patienten mit einer Sensitivität von 93,1 % bzw. 100 % und einer Spezifität von 29,4 % bzw. 7,1% unter thyreoidaler Hormonsubstitutionstherapie bzw. post rhTSH eine hohe falsch positive Rate besitzt. Dagegen sind TPO und TSHr mRNA im peripheren Blut Gesunder und im Stadium der Remission befindlichen Patienten nicht nachweisbar. Somit scheint die kombinierte Bestimmung von Markern z.B. von TPO und TSHr mRNA mit der Zielsetzung die falsch positiven Ergebnisse zu minimieren sinnvoll. Tg mRNA als molekularer Tumormarker alleine ist dagegen nicht geeignet (192).

Doch wie sind die konträren Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen zu erklären? Eine Ursache der konträren Beurteilung des diagnostischen Nutzens von PCR Assays in der DTC Nachsorge liegt sicherlich in der unterschiedlichen Probenaufarbeitung, der Primerauswahl und in unterschiedlichen PCR Protokollen der einzelnen Arbeitsgruppen. Eszlinger et al. (136) zeigen, dass bereits die Blutentnahme mit dem verwendeten Antikoagulant und den nachfolgenden Separationsschritten des Vollblutes das PCR Ergebnis beeinflussen. So ist eine ca. fünffach höhere GAPDH mRNA Ausbeute in der quantitativen PCR in Zitrat-Blut nach zuvoriger Separation der mononukleären Zellen verglichen mit EDTA bzw. Zitrat Blut ohne zusätzlichen Separationsschritt nach Null und 24 Stunden zu verzeichnen. Die Arbeitsgruppe verweist auch auf die von Dickover et al. (137) erschienene Publikation, in der ein Einfluss der verschiedenen Antikoagulantien auf die detektierte HIV - Viruslast nachgewiesen worden ist; vor allem Heparin als Antikoagulant scheint die nachfolgende PCR Analyse zu inhibieren.

Damit lassen sich die konträren Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen erklären, denn jede führt Blutentnahmen und RNA Isolationsverfahren auf eine andere Art und Weise durch, so dass von einer unterschiedlichen RNA Qualität in der reversen Transkription mit nachfolgend unterschiedlicher cDNA Konzentration auszugehen ist. Eine vor allem im klinischen Alltag praktikable Lösung stellen möglicherweise Kit Systeme dar, die speziell für die Blutentnahme mit nachfolgender PCR Diagnostik Störfaktoren eliminieren und die isolierte zelluläre RNA über einen längeren Zeitraum stabilisieren (147).

Doch nicht nur in der Probenverarbeitung unterscheiden sich die verschiedenen PCR Studien, auch hinsichtlich der eingesetzten RNA Konzentration bezogen auf die nachfolgende PCR Reaktion in der reversen Transkription fallen Abweichungen auf: z.B. setzen Takano et al. (158) 0,05 µg gesamt RNA, Savagner et al. (157) 0,1 µg Gesamt -

RNA und Ringel et al. (190) 0,0625 µg Gesamt - RNA ein, in der vorliegenden Arbeit werden 0,125 µg gesamt RNA pro PCR Reaktion eingesetzt.

Wie auch in dieser Arbeit gezeigt worden ist, beeinflussen die in der reversen Transkription verwendeten Primer (Oligo-dT versus Random - Hexamer - Primer) über eine veränderte cDNA Konzentration die sich anschließende PCR Amplifikationsrate. Während einige Arbeitsgruppen oligo-dT-Primer (158) verwenden, ziehen andere Random – Hexamer - Primer (156, 157, 190) vor, so dass ein Vergleich der PCR Assays erschwert ist. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass jede Arbeitsgruppe andere Primerpaare verwendet, die mit einer veränderten Sensitivität des PCR Assays einhergehen. Damit ist eine Vergleichbarkeit verschiedener Studie nicht möglich. Gerade in der Bewertung von PCR Assays für Tg mRNA ist zu bedenken, dass von Tg elf Splicevarianten bekannt sind (118). Savagner et al. (157) ermitteln sowohl in DTC Patienten als auch in Gesunden eine Häufigkeit von 33 % einer Tg Splicevariante bezogen auf die gesamte Tg mRNA, so dass nach geeigneten Primern gesucht werden muss um eine Beeinflussung zu minimieren.

Sicherlich ist ein Teil der gegensätzlichen Studien durch das individuelle Aufarbeiten der Proben zu erklären, wie die divergenten Resultate des von Ringel et al. (190) etablierten und von Span et al. (140) wiederholten PCR Assays nahe legen.

Allen Studien gemein ist jedoch, dass ein etablierter PCR Assay für Tg mRNA den optimistischen initialen Einschätzungen in der Tumordiagnostik hinsichtlich der Sensitivität gerecht wird, hinsichtlich der Spezifität jedoch enttäuscht (192). Die nachgewiesene Tg mRNA ist nicht zwangsläufig zirkulierenden Thyreozyten zu zuschreiben, sondern sie entspricht vielmehr einem Pool aus zellulärer und extrazellulärer thyreoidal sowie extrathyreoidal synthetisierter Tg mRNA. Dabei ist von individuellen Schwankungen des jeweiligen Anteils auszugehen, so dass die Definition eines Grenzwertes als eher schwierig und nur bedingt sinnvoll einzuschätzen ist. Möglicherweise repräsentieren die in Hypothyreose ermittelten Tg/GAPDH mRNA Werte vor allem den thyreoidalen Anteil des Pools, da in ektopem Gewebe mit illegitimer Transkription von einer unvollständigen TSH Stimulation auszugehen ist (161, 163). Der Einfluss der illegitimen Transkription wird konträr diskutiert und ist unklar, denn selbst Arbeitsgruppen, die methodisch die ektople bzw. illegitime Transkription extrapolieren, kommen zu unterschiedlichen Bewertungen des klinischen Nutzens von PCR Assays in der DTC Nachsorge (136, 140, 157). Unter anderem müssen individuelle tumorbiologische Charakteristika berücksichtigt werden. So kann die intermittierende Zellablösung aus dem Tumorzellverband zu falsch

negativen PCR Ergebnissen führen (116) und erschwert die Detektion zirkulierender Metastasenzellen und deren Transkripte mittels PCR Assays. In diesem Zusammenhang sei auch darauf verwiesen, dass der Nachweis von Metastasenzellen in der Blutbahn nicht zwangsläufig eine Metastasierung in anderen Organen nach sich zieht. Dieses Phänomen wird als „Metastaseninsuffizienz“ bezeichnet (193) und ist auf eine immunologische Reaktion des Organismus zurückzuführen, die eine Absiedlung der nachgewiesenen Metastasenzellen verhindert (194, 195); der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

#### **6.4.2 Falldarstellung**

Aber wie ist nach den vorangegangenen Ausführungen und der doch eher ernüchternden Einschätzung des klinischen Nutzens des Real – Time - PCR Assays für Tg mRNA in der DTC Nachsorge der Verlauf von Patient N7 zu beurteilen? Patient N7 sticht in der Auswertung hinsichtlich der paraklinischen Diagnostik 2000 (Tg/GAPDH mRNA, S-Tg, bildgebenden Befunde) und des Krankheitsverlaufs heraus: Die Erstdiagnose eines PTC wird 1995 mit der Tumorformel pT4a, N1b, M1 gestellt. Die Primärtherapie erfolgt 1995 mit einer Thyreoidektomie sowie modifizierter Neckdissection rechts und einer anschließenden Radiojodtherapie. Im weiteren Krankheitsverlauf folgen multiple Revisionen und die Resektion der A. carotis interna rechts sowie vier Radiojodtherapien mit insgesamt 24 GBq mit I-131, zuletzt 2002. Die vorbekannten Lungenrundherde zeigen eine deutliche Regredienz in der computertomografischen Kontrolle 2002. Die wiederholten S-Tg Bestimmungen und Szintigrafien, sowohl in Euthyreose als auch Hypothyreose, fallen unauffällig aus. Sonografisch findet sich eine im Vergleich zur Voruntersuchung unveränderte Raumforderung unklarer Dignität links zervikal. Dagegen liegt bereits 1999 ein sehr hoher Tg/GAPDH mRNA Wert ( $44 \times 10^{-6}$ ) vor. Anders die bildgebenden Befunde der Szintigrafie und Computertomografie in der Tumornachsorge 2003: neben den bekannten pulmonalen Metastasen werden, bei weiterhin negativen S-Tg Bestimmungen, ossäre Metastasen nachgewiesen.

In der Bewertung des vorliegenden Fallberichtes sind folgende Erklärungen möglich:

- **Methodische Fehler des PCR Assays**

Zum einen könnte eine fehlerhafte Tg/GAPDH mRNA Messung im Sinne eines falsch positiven Ergebnisses, z. B. durch eine Kontamination mit spezifischer bzw. unspezifischer DNA die Ursache sein. In mehrfachen Versuchswiederholungen unter Mitführen

der erforderlichen Kontrollen ergibt sich jedoch kein Anhaltspunkt für eine Kontamination. Aufgrund der relativen Quantifizierung der Tg mRNA zur GAPDH mRNA wäre auch ein falsch hoher Quotient durch eine sehr niedrige Expressionsrate des Housekeeping-gene GAPDH möglich. In der Real – Time - PCR sind Triplikatbestimmungen durchgeführt worden, die keine signifikante Abweichung der Einzelwerte (48238 pg GAPDH mRNA, 48085 pg GAPDH mRNA, 46987 GAPDH mRNA) vom Mittelwert (47770 pg GAPDH mRNA) ergibt. Auch der Vergleich mit der Minimalkonzentration bzw. Maximalkonzentration von 37000 bzw. 1000000 pg GAPDH mRNA anderer Patienten stellt sich unauffällig dar. Damit ist ein falsch hoher Wert der Real – Time - PCR durch einen rechnerisch methodischen Fehler als Erklärung ausgeschlossen.

- **Fehlerhafte S-Tg Bestimmung**

Werden die wiederholt negativen S-Tg Werte in den Fokus gerückt, ist eine Beeinflussung des Immunoassays mit nachfolgendem falsch negativem Ergebnis durch Tg Antikörper und andere unspezifische Störfaktoren denkbar. Doch die international anerkannte Kontrolle der Immunoassays, die Wiederfindungsrate, ist mit 95 - 100% ungestört. Um eine S-Tg Fehlbestimmung durch eine fehlerhafte Durchführung des Assays auszuschließen, ist das Probenmaterial durch den Hersteller (Brahms Diagnostica), mit gleichem Ergebnis gegenkontrolliert worden. Hinweise auf Tg Antikörper haben sich in wiederholten Messungen, ebenfalls nachkontrolliert durch den Hersteller, nicht ergeben. In älteren Immunoassays wäre auch der so genannte Hook Effekt, d.h. falsch negative Ergebnisse durch sehr hohe S-Tg Konzentrationen, als Ursache für das nicht messbare S-Tg anzuführen. In den immunoradiometrischen Assays der neueren Generation, wie in diesem Fall angewendet, ist der Hook Effekt jedoch nicht möglich. Methodische Fehler der S-Tg Bestimmung, die die Konstellation Tg/GAPDH mRNA positiv und S-Tg negativ erklären, sind somit weitgehend ausgeschlossen.

Denkbar als Ursache wäre auch eine verkürzte Halbwertszeit mit nachfolgendem falsch negativen Ergebnis sein (196). Die normale Halbwertszeit für Thyreoglobulin wird in der Literatur mit 65,2 Stunden angegeben (197). In DTC, wie im vorliegenden Fall mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, ist die Synthese eines abnormalen Thyreoglobulins oder von Tg Fragmenten (198) nicht abwegig. Aufgrund der Metastasierung muss auch an veränderte biologische Eigenschaften der Metastasenzellen gedacht werden, die bei geringer Differenzierung mit sehr niedrigen S-Tg Konzentrationen bzw. nicht nachweisbaren Konzentrationen einhergehen können (199). In Abhängigkeit von

der Tumorhistologie weisen Patienten mit metastatisiertem FTC höhere S-Tg Konzentrationen auf als mit PTC (200, 201). Somit ist von einer erschwerten S-Tg Detektion im vorliegenden Fall auszugehen. In der Literatur die Rate falsch negativer S-Tg Ergebnisse, d. h. Patienten mit Hinweisen auf eine thyreoidale Tumorerkrankung und unauffälligem S-Tg, mit 46 % (192) angegeben, so dass der beschriebene Fallbericht keinen Einzelfall darstellt.

- **Störung der Umsetzung der genetischen Information**

Denkbar wäre auch, dass gewebespezifische mRNA im Gegensatz zum Protein vom Tumorzellverband bzw. den Metastasenzellen „noch“ exprimiert wird (116). Für gering differenzierte Prostatakarzinomzellen ist bereits gezeigt worden, dass zwar PSA mRNA mittels PCR nachgewiesen werden kann, gleichzeitig jedoch kein PSA Protein im Western Blot Verfahren zu detektieren ist (202).

- **Zweittumor**

In vorliegenden Fallbericht liegt eine für PTC untypische hämatogene Metastasierung mit ossären Metastasen vor, so dass auch an einen Zweittumor gedacht werden muss. Die hämatogene Metastasierung von PTC in den Knochen wird mit einer Häufigkeit von 1,4 – 7 % angegeben. Damit ist sie eine seltene Metastasierung, entspricht aber gleichzeitig nach der Lunge der zweithäufigsten Lokalisation der hämatogenen Metastasierung (203, 204). Aufgrund der Radiopharmakon Aufnahme ist an maligne Tumoren und Metastasen mit NIS Expression (Speicheldrüse, Magen, Brustdrüse, Haut, Eierstock, Thymus, Lunge, Nebenniere (161, 163) und Tumoren mit ossärer Metastasierung (Brustdrüse, Lunge, Niere, Blase, Lymphomen, Sarkomen) zu denken. So liegt in etwa 80 % der ossären Metastasen ein Prostata-, Mamma- oder Bronchialkarzinom vor. Hinweise in der durchgeführten klinischen und bildgebenden Diagnostik auf einen Zweittumor o.g. Organspezifität ergeben sich nicht. Unter Berücksichtigung des hohen Stagings (pT4N1M1) bei Primärdiagnose ist ein Progress des PTC mit ossärer Metastasierung am wahrscheinlichsten.

- **Fehlerhafte Szintigrafie**

Doch wie lassen sich die wiederholt unauffälligen Szintigrafien in der Krankengeschichte erklären? Tumorbiologisch fällt in DTC mit zunehmendem Tumor- bzw. Entdifferenzierungsgrad die Tg, TPO und NIS im Gegensatz zur TSHr mRNA Expression ab (174), was in SAGE Analysen (7) auf mRNA Ebene bestätigt und mittels Immunhistochemie

(205) auf Proteinebene gezeigt werden kann. Biscolla et al. (185) bestätigt in drei von sechs Patienten mit gleicher Befundkonstellation eine fehlende bzw. verminderte NIS Expression in der PCR der Biopsien des Metastasengewebes. Damit ist mit zunehmendem Tumorgrad auch von einer verminderten Radiopharmakonaufnahme auszugehen. Der Prozentsatz nicht messbaren S-Tgs trotz bildmorphologisch gesicherten Tumorrestgewebes oder Metastasen wird in einer Metaanalyse mit 4,2% (201) angegeben.

Außerdem ist zu berücksichtigen, dass in der Schilddrüsen- und Knochenszintigrafie unterschiedliche Radiopharmaka verwendet werden. Während das Radionuklid Technetium 99m in beiden Fragestellungen das gleiche ist, werden in der Schilddrüsenszintigrafie Pertechnetat und in der Skelettszintigrafie Polyphosphonate (z.B. Methylendiphosphonat oder Dicarboxydiphosphonat) als Radiopharmakon eingesetzt. Aufgrund des langen Krankheitsverlaufs im vorliegenden Fall kann eine niedrige NIS Expression postuliert werden, die mit einer niedrigen Tc-99m Aufnahme des Tumorgewebes und der Metastasen einhergeht. Die Skelettszintigrafie dagegen setzt keine NIS Expression voraus, ist somit unspezifischer und die ossären Metastasen sind nachweisbar.

Nach diesen Überlegungen und Ausführungen ist von einem Rezidiv mit ossärer Metastasierung eines PTC ohne S-Tg Anstieg auszugehen, das auch bildmorphologisch nachvollzogen werden kann.

Wird die Literaturrecherche speziell auf die o.g. diagnostische Befundkonstellation hin fokussiert, springen immer wieder Einzelfallberichte mit einer ähnlichen Befundkonstellation, d.h. positive Tg mRNA ohne weiteren Hinweis eines Rezidivs, ins Auge. Leider verfolgen nur wenige Arbeitsgruppen den weiteren Krankheitsverlauf hinsichtlich eines Rezidivs. In der konventionellen PCR Studie von Grammatopoulos et al. (182) ist initial weder Tg mRNA noch S-Tg messbar, im weiteren Krankheitsverlauf wird die Tg mRNA in der konventionellen PCR 45 Tage vor der Szintigrafie und dem S-Tg Anstieg pathologisch. Auch Denizot et al. (189) berichten von einem Patienten mit nachgewiesener Tg mRNA in der konventionellen qualitativen PCR zeitlich vor einem kritischen S-Tg Anstieg ohne weitere Zeitangaben. Dabei handelt es sich wie im vorliegenden Fallbericht histologisch um ein PTC mit ossärer Metastasierung. Ähnlich ist der Verlauf von drei von sechs DTC Patienten mit initial positiver Tg mRNA in der PCR bei sonst unauffälliger Klinik und Paraklinik, in denen histologisch mittels FNAB ein Rezidiv gesichert wird (185). Ebenso werden in Real – Time - PCR Assays immer wieder Einzelfallberichte mit einem Tg mRNA Anstieg zeitlich vor einer pathologischen Szintigrafie dokumentiert. So auch in der Real Time PCR Studie von Savagner et al. (157) in der neun von 15 Patienten mit Verdacht, aber ohne Hinweis eines Rezidivs mit

von 15 Patienten mit Verdacht, aber ohne Hinweis eines Rezidivs mit positiver Tg mRNA auffallen. Im weiteren Verlauf weisen zwei dieser Patienten neun bzw. elf Monate später pathologische Szintigrafien auf. Tallini et al. (124) untersuchen in der ersten Studie in vier PTC Patienten die Tg mRNA Detektion im peripheren Blut mittels PCR im Vergleich zu pathologischen S-Tg Werten, Szintigrafiefbefunden und der therapeutischen Intervention. In einem Patient wird die Tg mRNA ca. zwei Monate vor einem S-Tg Anstieg verzeichnet (124). Elisei et al. (139) gehen genau dieser Fragestellung und der Bewertung der Befundkonstellation positive Tg mRNA bei klinisch und paraklinisch unauffälligem Befund nach. In dieser Studie (n = 100, 80 DTC, 20 Gesunde) (139) werden neun Patienten ohne Hinweis (S-Tg, Szintigrafie) eines Rezidivs mit isolierter Tg mRNA Erhöhung über einen Zeitraum von vier Jahren hinsichtlich des Krankheitsverlaufs und der Paraklinik beobachtet. Die Patienten weisen keine erhöhte Inzidenz eines Tumorrezidivs im Vergleich gegenüber den anderen Patienten ohne Tg mRNA Erhöhung im Beobachtungszeitraum auf. Chinappa et al. (187) dokumentieren in zwei von 31 DTC Patienten mit positiver Tg mRNA und unauffälliger Nachsorge auch innerhalb des nächsten Jahres einen unauffälligen Verlauf. In diesen beiden Studien, die einen Nutzen der PCR in der DTC Nachsorge eher abstreiten, liegt der Beobachtungszeitraum bei einem (187) bzw. vier Jahren (157).

Macht man sich erneut bewusst, dass Rezidive von DTC zwar meistens innerhalb der ersten sechs Monate nach Primärtherapie (206), aber auch bis zu 37 Jahre später (179) auftreten können, sind die gewählten Zeiträume noch als zu kurz zu bewerten. In der Tumornachsorge ist die Diskrepanz zwischen positiver S-Tg Bestimmung und negativem szintigrafischem Befund hinlänglich untersucht (207), jedoch ist deren klinische Signifikanz umstritten (207). Werden die entsprechenden Nachweisgrenzen mit in die Überlegungen eingeschlossen, die für chemische mit  $10^4$ -  $10^5$  Tumorzellen, für bildgebende mit  $10^9$  Tumorzellen (111) und für molekulargenetische Verfahren mit einer malignen in  $10^6$  gesunden Zellen (208) angegeben werden, erscheint die additive Tg mRNA Bestimmung sinnvoll.

Der Vollständigkeit halber soll erwähnt werden, dass die Literaturrecherche auch häufig die umgekehrte Befundkonstellation, d.h. ansteigende S-Tg Werte bei unauffälliger PCR und Szintigrafie ergeben (124, 155, 182, 190). Daraus folgt, dass der PCR Assay nur eine ergänzende Diagnostik darstellt. Zusammenfassend ist in dem vorliegenden Einzelfallbericht von einem DTC Rezidiv mit fehlender S-Tg Synthese bzw. - freisetzung bei jedoch erhaltener Tg mRNA Synthese auszugehen, die auf die speziellen tumorbio-

logischen Charakteristika zurückgeführt werden kann. Auf dem Boden der Einzelfallberichte und des Verlaufs des vorliegenden Falles zeichnet sich eine mögliche diagnostische Indikation des PCR Assay für Tg mRNA als Verlaufsparemeter in der Tumornachsorge ab. Vor allem in den 4,2 % der DTC Patienten ohne S-Tg Nachweis trotz positiver Bildgebung (201) könnte der PCR Assay eine Tumornachsorge ermöglichen, die den individuellen Tumorcharakteristika gerecht wird. Weitere, v.a. Langzeitstudien sind jedoch nötig, um die klinische Signifikanz bezogen auf die therapeutische Intervention zu klären.

Ziel für die Zukunft muss es sein, den Einfluss und Anteil der ektopen Transkription näher zu beschreiben und zu quantifizieren. Eine Möglichkeit ist die Einführung von Kontrollmarkern wie es Savagner et al. (157) vorschlagen, die die illegitime Transkription erfassen und mit deren Hilfe die quantitativen Ergebnisse der PCR Analyse korrigiert werden können.



## **7 Polymerase Chain Reaction für Tg mRNA in der DTC Nachsorge – die Chance?**

Zielsetzung dieser Arbeit war es einen quantitativen PCR Assays für Tg mRNA im peripheren Blut aufzubauen, der in den klinischen Algorithmus der DTC Tumornachsorge integriert werden kann. In zahlreichen Versuchen kristallisierte sich ein kommerziell erworbenes RNA Isolationsverfahren mit einem zusätzlichen DNase Protokoll als das geeignetste heraus, das reproduzierbare Daten liefert und in der Tumornachsorge eingesetzt werden kann. Trotz der Tatsache, dass eine Restaktivität der DNase die nachfolgende PCR beeinflussen kann, wird auf den zusätzlichen Protokollschritt zur Minimierung von genomischen DNA Kontaminationen nicht verzichtet.

Doch inwieweit ist die Tg/GAPDH mRNA Bestimmung eine geeignete Methode den Krankheitsverlauf in der DTC Tumornachsorge zu überwachen? Anders gefragt ist Tg/GAPDH mRNA eine Alternative zu dem bisherigen Tumormarker S-Tg?

Zu dem Anforderungsprofil Tumormarker gehört eine ausreichende Sensitivität, Spezifität und Dynamik. Werden die Ergebnisse der drei untersuchten Patientengruppen (Kontrollgruppe, athyreote Patienten, rhTSH Patienten) auf die Eignung der Tg/GAPDH mRNA Bestimmung als Tumormarker geprüft, ist Folgendes festzuhalten: Eine ausreichende Spezifität wird anhand der durchgeführten Vorversuche und einem Abgleich der eingesetzten Primersequenzen mit der publizierten Transkriptom- und Genomsequenz (BLAST- und BLAT- Search) bestätigt. Die Daten der in vitro Vorversuche ergeben ein Detektionslimit von ca. einer Zelle in einem Milliliter EDTA Blut, so dass eine hohe Sensitivität des etablierten Assays erzielt wird. Aus dem dokumentierten Anstieg der Tg/GAPDH mRNA nach rhTSH Stimulation lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass auch eine Tg mRNA Konzentrationserhöhung im Rahmen eines Tumorprogresses mit erhöhten Tumorzellen in der Blutbahn zu erfassen ist. Somit ist von einer ausreichenden Dynamik des etablierten PCR Assays für Tg/GAPDH mRNA auszugehen.

Damit erfüllt der etablierte PCR Assay im Wesentlichen das Anforderungsprofil eines klinischen Verlaufsparameters in der Tumornachsorge und zeichnet sich v.a. durch eine hohe Sensitivität aus. Doch gerade diese hohe Sensitivität stellt auch eine Einschränkung der PCR Diagnostik in der klinischen Routine dar, wie die Untersuchung einer heterogen zusammengesetzten Gruppe von DTC Patienten in der vorliegenden Arbeit unter Einbeziehung weiterer Publikationen zeigt. In allen hoch sensitiven diagnostischen Verfahren sind Negativkontrollen zur Qualitätssicherung unablässig, und genau diese

Funktion sollten die konnatal athyreoten Patienten übernehmen. Zahlreiche Studien von PCR Analysen mit unterschiedlichen Primerpaaren weisen Tg mRNA im peripheren Blut nach. Die Literaturrecherche und die Resultate eines Multiple Tissue Northern Blottings für Tg mRNA legen nahe, dass mit der PCR Analyse neben der thyreoidalen auch die sogenannte illegitime Tg mRNA Expression extrathyreoidalen Gewebes und der Blutzellen miterfasst wird (ca. ein Transkript in 500 - 1000 Zellen) (127, 159) liegt. Damit entspricht die im peripheren Blut detektierte Tg/GAPDH mRNA einem Pool der mRNA abgeschilfter Thyreozyten sowie Mikrometastasen und illegitim transkribierter extrathyreoidaler Tg mRNA. Hier liegt neben der Metastaseninsuffizienz (193) eine weitere Ursache und ein Problem der PCR Assays in der DTC Tumornachsorge, da nachgewiesene Tg mRNA nicht zwangsläufig mit einer Metastasierung des Primärtumors gleichzusetzen ist. Nichts desto weniger deutet sich diese Problematik auch in den hochsensitiven Immunoassays wie z. B. Dynotest Tg plus an, denn auch dort ist S-Tg im peripheren Blut jener athyreoten Patienten nachweisbar. Im Hinblick auf die stimulierten Tg/GAPDH mRNA Werte ist theoretisch denkbar, dass diese größtenteils thyreoidalen Ursprungs sind, denn nur dort ist von einer intakten TSH Signaltransduktion mit nachfolgender Tg Synthese auszugehen (161, 163). Damit ist der dokumentierte und postulierte Vorteil der PCR Assays für Tg mRNA (190) in Euthyreose kritisch zu bewerten. Ziel für die Zukunft muss es sein, den Einfluss und Anteil der ektopen Transkription näher zu beschreiben und zu quantifizieren. Eine Möglichkeit ist die Einführung von Kontrollmarkern, die die illegitime Transkription erfassen und mit deren Hilfe die quantitativen Ergebnisse der PCR Analyse korrigiert werden können, wie es z. B. Savagner et al. (157) vorschlagen.

Im Vergleich mit der etablierten klinischen Diagnostik (S-Tg, Sonografie, Szintigrafie) von DTC, dem sogenannten Goldstandard, ist keine Korrelation zwischen dieser und den PCR Ergebnissen herzustellen. In der Nachsorgediagnostik scheint die Real - Time - PCR keine Vorteile gegenüber der S-Tg Bestimmung hin zu einer individuellen risikostratifizierten Tumornachsorge zu bringen. Im Hinblick auf S-Tg ist dies auf die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften wie z. B. die divergierenden Halbwertszeiten der beiden Parameter zurückzuführen. Eine weitere Erklärung ist die Tatsache, dass die S-Tg Messung das in die Blutbahn sezernierte Tg Protein misst, hingegen die Tg/GAPDH mRNA Konzentration im Serum einem Pool intrazellulärer sowie freier thyreoidaler und extrathyreoidaler Tg mRNA entspricht. In bezug auf die mangelnde Korrelation mit den bildgebenden Befunden und dem klinischen Stadium ist die besondere

Situation in maligne transformierten Zellverbänden zu bedenken. So ist eine intermittierende Freisetzung der okkulten Zellen in Form einer Mikrometastasierung nicht unwahrscheinlich, die gleichzeitig die Detektion der Tumorzellen über die Tg mRNA in der PCR erschwert. Aber auch die veränderten histologischen Eigenschaften der DTC, die mit einem maligne transformierten Genom, Transkriptom und Proteasom einhergehen, sind eine Erklärung für die fehlende Korrelation mit dem Goldstandard.

Die initial optimistische Einschätzung eines Nutzens und Vorteils der PCR für die Bestimmung von Tg mRNA im peripheren Blut sind einer Ernüchterung gewichen, wie auch die Ergebnisse zahlreicher anderer Arbeitsgruppen belegen. Erschwerend, ein abschließendes Urteil hinsichtlich des Nutzens in der DTC Nachsorge von PCR Assays zu fällen, kommt die Tatsache hinzu, dass alle Arbeitsgruppen unterschiedliche Protokollvarianten verwenden und somit ein Vergleich nur bedingt möglich ist. Hier liegt wohl ein Grund für die konträren Einschätzungen des Nutzens von PCR Assays für Tg mRNA in der DTC Nachsorge mit Verfechtern (100, 119, 156, 157, 181, 184, 185) einerseits und Gegnern (136, 139, 140, 158, 166, 189, 209) andererseits. Eine Lösung des Problems der mangelnden Vergleichbarkeit würden standardisierte Protokolle und Kontrollproben darstellen, die im Anschluß eine abschließende fundierte Bewertung über den Einsatz von PCR Assays in der DTC Nachsorge erlauben würde.

Eine Indikation als additive Diagnostik der Tg mRNA Bestimmung deutet sich trotz der eher ernüchternden Daten der vorliegenden Arbeit in einem Fallbericht an: ein Patient mit unauffälligem S-Tg und im Verlauf pathologischer Szintigrafie fällt bereits früh durch sehr hohe Tg mRNA Werte auf. Um jedoch eine prädiktive Aussagekraft der Tg/GAPDH mRNA Bestimmung zu postulieren, sind weitere Studien, v.a. Langzeitstudien von Nöten. Diese müssen versuchen dem langen natürlichen Verlauf von DTC mit möglichen Metastasen über einen Zeitraum von bis zu 37 Jahren postoperativ Rechnung zu tragen. Des weiteren ist es unerlässlich die Karzinogenese in DTC und die damit einhergehenden Genom-, Transkriptom- und Proteasompathologien weiter zu analysieren, um so eine sensitivere DTC und Nachsorge Diagnostik zu erreichen. Weitere PCR Studien sind nötig, um einen möglichen Vorteil von sogenannten Multiplex PCRs, d.h. der simultanen Konzentrationsbestimmung verschiedener thyreoidaler mRNAs zu evaluieren. Zum derzeitigen Erkenntnisstand ist ein Einsatz der Real – Time - PCR mit singulärer Bestimmung von Tg mRNA in der klinischen Routine der DTC Nachsorge nicht sinnvoll. Die Frage, ob die Polymerase Chain Reaction für Tg mRNA in der DTC Nachsorge ein

Schritt bzw. eine Chance hin zu einer sensitiveren Nachsorge darstellt, lässt sich daher am treffendsten mit „noch nicht“ beantwortet.