Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Unfallchirugie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Professor Dr. H. D. Röher

Die Expression des Natrium-Jod Symporters in menschlichen Schilddrüsenkarzinomen unter Redifferenzierungstherapie mit Retinsäure

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jörg Segering

2002

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. phil. Alfons Labisch, M.A. Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Simon

Korreferent: Prof. Dr. med. Dall

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| 1 | Einlei | tung | 1 |
|---|--------|--|----|
| 1.1 | Das | Schilddrüsenkarzinom | 1 |
| 1.2 | Tur | nor- und Differenzierungsmarker | 2 |
| 1.3 | Der | Natrium-Jod-Symporter (HNIS) | 3 |
| 1.4 | Rec | lifferenzierung durch Retinsäure | 4 |
| 1.5 | Zie | l der Arbeit | 5 |
| 2 | Mater | ial und Methoden | 6 |
| 2.1 | Ma | terial | 6 |
| 2.2 | Met | thoden | 8 |
| 2 | .2.1 | RNA-Isolierung aus Nativgewebe | 8 |
| 2 | .2.2 | Die cDNA-Synthese | 9 |
| 2 | .2.3 | Die Polymerasekettenreaktion (PCR) | |
| 2 | .2.4 | Die kompetetive PCR | |
| 2 | .2.5 | Durchführung der kompetitiven PCR | |
| 2 | .2.6 | Die Polyacrylamidgelelektrophorese | |
| 2 | .2.7 | Photodokumentation | |
| 2.2.8 Die Quantifikation mittels Geldensitometrie | | | |
| 2.3 | Aus | swerten der Leuchtdichtewerte | 21 |
| 2.4 | Ret | inoidtherapie | 25 |
| 2 | .4.1 | Prä- und posttherapeutische Diagnostik | 25 |
| 3 | Ergeb | nisse | |
| 3.1 | Die | Expression von HNIS | |

| 3.2 | Klinische Daten der mit Retinsäure therapierten Patienten |
|------|---|
| 3.3 | Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit klinischen Ergebnissen |
| 4 | Diskussion |
| 4.1 | Die quantitative PCR |
| 4.2 | Die HNIS-Expression in menschlichen Schilddrüsenkarzinomgeweben |
| 4.3 | Redifferenzierungstherapie bei drei Patienten mit follikulären |
| Schi | Iddrüsenkarzinomen |
| 4.4 | Korrelation von experimentellen Parametern und klinischen Verlauf |
| 5 | Zusammenfassung |
| 6 | Literatur |

1 Einleitung

1.1 Das Schilddrüsenkarzinom

Das Schilddrüsenkarzinom liegt an 11. Stelle aller krebsbedingten Todesursachen und ist mit einer Inzidenz von etwa 1-5/100.000 Einwohner im Vergleich mit anderen Malignomen ein relativ seltener Tumor. Frauen sind 2-3mal häufiger betroffen als Männer.

Die klassische Einteilung des Schilddrüsenkarzinomes orientiert sich am histomorphologischen Wachstumsmuster und dem zellulären Ursprung. Unterschieden werden papilläre, follikuläre, onkozytäre und anaplastische Karzinome, deren Ursprung in thyroxinproduzierenden Follikelepithelzellen liegt. Davon abgegrenzt werden medulläre Schilddrüsenkarzinome mit Ursprung aus den parafollikulären Zellen (Calcitonin produzierende C-Zellen), Plattenepithelzellkarzinome, Sarkome und maligne Lymphome. Diese Klassifikation orientiert sich neben epidemiologischen und pathophysiologischen Daten, wie regionale Verteilung, Patientenalter, Hormonsynthese und Jodaufnahme, auch an

tumorbiologischen Charakteristika, wie Wachstumsverhalten und Metastasierungswege, und ist für die Wahl der Therapie und für die prognostische Einschätzung von Bedeutung.

Die häufigsten malignen Schilddrüsentumore sind in 90 % der Fälle differenzierte Karzinome vom follikulären oder papillären Typ. Weitaus seltener sind mit 5% medulläre und anaplastische Karzinome und mit gleichfalls 5% Lymphome und andere seltene Tumore. Klinisch treten die Tumore meist als tastbarer Knoten in Erscheinung. Malignitätsverdächtig ist ein sonographisch echoarmer Knoten, der in der Szintigraphie keine Jodspeicherung zeigt (sogenannter kalter Knoten). Eine präoperative Punktionszytologie kann in 98% der Fälle ein Malignom ausschließen oder nachweisen. Gesichert wird die Diagnose erst durch die Beurteilung eines histopathologischen Präparates.

Unter den differenzierten Malignomen ist das papilläre Karzinom mit 50-60% am häufigsten. In Nicht –Strumaendemiegebieten ist es doppelt so häufig wie das follikuläre Karzinom. Es befällt bevorzugt Frauen im Alter von 30-50 Jahren. In 30% der Fälle liegt ein Rearrangement des c-ret Onkogenes als somatische Mutation vor (ret/PTC-Onkogen). Das Malignom kann sowohl als gekapselter hoch differenzierter, aber auch als grob invasiver, niedrig differenzierter Tumor in Erscheinung treten. Es metastasiert primär lymphogen.

Bevorzugt in Strumaendemiegebieten tritt mit einer Häufigkeit von 20-30% der Fälle das follikuläre Schilddrüsenkarzinom auf. Frauen in der 4.-5. Lebensdekade sind meist betroffen. Auch hier gibt es höher und niedrig differenzierte Subtypen. Es metastasiert in erster Linie hämatogen in Lunge, Skelett und Gehirn.

Die Behandlung der differenzierten Schilddrüsenkarzinome stützt sich im Wesentlichen auf drei Therapiemodalitäten:

1. die chirurgische Entfernung der tumorbefallenen Schilddrüse (die totale Thyreoidektomie) mit Entfernung der zentralen paratrachealen Lymphknoten. Bei diagnostisch gesicherten medullären Karzinomen und bei großen differenzierten Karzinomen schließt sich eine Neck-Dissektion mit, falls vorhanden, Entfernung von Fernmetastasen an.

2. die postoperative Radiojod-Therapie insbesondere für die Behandlung von Fernmetastasen bei den differenzierten Karzinomen.

3. die Therapie mit Schilddrüsenhormonen zur Suppression des Wachstumsfaktors TSH.

Im Laufe einer Tumorprogression kommt es bei etwa einem Drittel der Schilddrüsenkarzinome zum Verlust spezifischer morphologischer und funktioneller Eigenschaften der differenzierten Tumorzelle (Goretzki et al., 1994; O'Doherty et al., 1998).

1.2 Tumor- und Differenzierungsmarker

In der gesunden Schilddrüse produzieren Follikelepithelzellen Thyreoglobulin (TG), ein Träger- und Speicherprotein, welches im Follikellumen unter Beteiligung der Schilddrüsenperoxidase (TPO) an Tyrosinreste jodiert wird. Ein TG- Anstieg im Blutplasma nach Thyreoidektomie kann ein Indikator für Metastasen oder für eine Massenzunahme eines Tumorrezidives eines differenzierten Karzinoms sein.

Als Differenzierungsmarker für Schilddrüsenkarzinome dient die Expression unterschiedlicher schilddrüsenspezifischer Gene wie Schilddrüsenperoxidase (TPO), TSH-Rezeptor (TSH-R), Thyreoglobulin (TG), Typ 1 5`-Deiodinase (5´D1) und der Natrium-JodSymporter (HNIS). In Karzinomgeweben besteht eine positive Korrelation zwischen der Expression von HNIS, TPO, TG und TSH-R (Lazar V. et al., 1999; Saito et al., 1997). Dabei ist die Expression dieser Gene, ebenso wie die der 5`-Deiodinase (Köhrle J. et al.), herabgesetzt.

Klinische Differenzierungsmarker sind die histologische Tumormorphologie, die Jodaufnahme in der Radiojod Szintigraphie und das Wachstumsverhalten des Tumors. wird Eine Tumorprogression neben einem histologisch nachweisbaren Differenzierungsverlust, durch Zunahme des Tumorgradings mit Verlust der Jodaufnahme und aggressiverem Tumorwachstum mit metastatischer Aussaat klinisch apparent. Ein weiteres Differenzierungsmerkmal ist der Glukosemetabolismus, der in Tumorzellen gegenüber gesunden Zellen deutlich gesteigert ist. Das vermehrte Trapping des markierten FDGs im Rahmen der gesteigerten Glykolyse kann mittels Positronenemissionstomographie

(PET) ermittelt und gemessen werden.

1.3 Der Natrium-Jod-Symporter (HNIS)

In der basolateralen Membran differenzierter Follikelepithelzellen befindet sich der Natrium-Jod-Symporter, ein aus 643 Aminosäuren bestehendes Protein, dessen Gen aus 15 Exons mit einer Länge von 20 Kilobasen auf dem Chromosom 19 lokalisiert ist. Das HNIS-Protein konzentriert Jodid aktiv entgegen eines elektrochemischen Gradienten in einer 20-40fach höheren Menge als im Plasma in die Thyreozyten. Die Energie dieses Transportes stammt aus einem zelleinwärtsgerichteten Jodid-Natrium-Cotransport, der durch eine membranständige Na⁺-K⁺-ATPase aufgebaut wird. Der Jodid-Einstrom kann durch Thiocyanat, Pertechnat und Perchlorat kompetitiv gehemmt werden.

Die Expression des HNIS-Proteins wird ebenso wie die Expression von TPO, TG und Deiodinase durch TSH stimuliert. Durch einen an der basolateralen Membran gelegenen TSH-Rezeptor wird die Information über die G-Protein- Adenylatzyklase-cAMP-Kaskade in das Zellinnere übertragen. Dort bewirkt die TSH-Stimulation einen Anstieg der HNIS-RNA, des HNIS-Proteins und der Jodaufnahme. Die genauen molekularen Mechanismen der intrazellulären HNIS-Stimulation sind bisher aber noch unbekannt (Ajjan R.A. et al. 1998 Dohan et al., 2000; Köhrle J. et al.1998; Filetti et al., 1999; Smanik et al., 1996; Carracsco et al.1993; Saito et al., 1997).

1.4 Redifferenzierung durch Retinsäure

Ein Kennzeichen von Dedifferenzierung, Tumorprogression und Metastasierung sind Verlust der Jodaufnahme und Verlust der Wachstumsregulation durch TSH. Bisher gibt es für solcherart fortgeschrittene Karzinome keine klinisch wirksame Behandlung, so daß Maßnahmen zur Induktion einer Redifferenzierung von Tumoren von besonderem Interesse sind.

Wachstum und Differenzierung von malignen Zellen können durch Derivate der Retinsäure inhibiert bzw. stimuliert werden. Diese Effekte wurden zu einem in Zellkulturen verschiedener Tumore nachgewiesen, zum anderen werden Retinoide klinisch bei epithelialen Tumoren der Haut (Sankowski A. et al., 1987) und Malignomen des hämatopoetischen Systems eingesetzt. Als Modell für eine Redifferenzierungstherapie gilt die akute Promyelozytenleukämie mit typischer Chromosomentranslokation t(15; 17) und daraus resultierenden Veränderungen des Retinsäurerezeptors RARα. Hier zeigte die Behandlung mit Tretinoin (all-trans-Retinsäure) bessere Ergebnisse als eine konventionelle Chemotherapie (Fenaux P. et al., 1992). Ihre Wirksamkeit entfalten Retinoide über nukleäre Rezeptoren, die zur Superfamilie der Steroid-Thyroidea-Hormonrezeptoren gehören. Diese Rezeptoren kontrollieren die Transkription bestimmter Gene über eine direkte Interaktion mit spezifischen DNA-Sequenzen, den RARE (retinoic acid response elements). Von diesen Genen induzierte mRNA kodiert Proteine, welche die differenzierungsförderden und die antiproliferativen Effekte vermitteln (Ciguere et al., 1994).

Zur Zeit sind sechs unterschiedliche Retinsäurerezeptoren identifiziert worden. Sie werden in zwei Unterklassen eingeteilt: den RAR- und den RXR-Rezeptoren, jeweils mit den Subtypen α,β und γ . Die Verteilung dieser Rezeptoren im Gewebe, ihre Affinität zu den verschiedenen Liganden und ihre intrazelluläre Wirkung ist unterschiedlich. Die Rezeptorexpression ist in Karzinomen der Haut, Lunge und Brust ist herabgesetzt und scheint mit den tumorbiologischen Charakteristika zu korrelieren (Swisshelm et al., 1994).

In Schilddrüsenkarzinmomen werden alle Retinoidrezeptoren exprimiert (Schmutzler et al., 1998) und bilden somit die Grundlage für eine Redifferenzierungstherapie. Einige Arbeiten zeigen bereits eine redifferenzierende Wirkung von Retinoiden auf Schilldrüsenkarzinome. In menschlichen Schilddrüsenkarzinomzelllinien konnte die Expression von HNIS (Schmutzler et al., 1997) und der 5'-Deiodinase (Schreck et al., 1994) durch Retinoidstimulation gesteigert werden. Als weitere redifferenzierende Effekte wurden die vermehrte Expression der ICAM-1. Zelladhäsionsmoleküle E-Cadherin und sowie die Suppression des Dedifferenzierungsmarkers CD97 beobachtet. (Hoang-Vu et al., 1998; Bussi et al., 1995). In anderen Zellkulturversuchen wurde ein Anstieg von Differenzierungsparametern, wie Jodaufnahme und TSH-Bindungskapazität neben einer Änderung gesteigerte der Extrazellulärmatrix dokumentiert (van Herle et al., 1990; Havekes et al., 2000).

1.5 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit wurde die Expression des Natrium-Jod-Symporters in Normalgeweben und in Geweben papillärer und follikulärer Schilddrüsenkarzinome quantitativ mittels RT-PCR bestimmt.

Erstmals wurde eine Therapiepilotstudie mit Retinsäure zur Redifferenzierung von Schilddrüsenkarzinomen durchgeführt. In diese Studie wurden 50 Patienten eingeschlossen. Bei drei dieser Patienten wurde die HNIS-Expression in Geweben, die vor und nach der Therapie durch eine Operation entommen wurden, untersucht.

Ziel der Arbeit ist es, in diesen Geweben die Wirkung von Retinsäure auf die Expression des HNIS-Gens zu messen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Untersuchungsgruppe

Die Untersuchungen umfassen 17 Gewebproben von 14 Patienten, die im Zeitraum von 1993 bis 1998 an Schilddrüsen-Karzinomen operiert worden sind Aus dem ausgewählten Patientenkollektiv waren 2 Patienten an papillären Karzinomen und 7 Patienten an follikulären Karzinomen in unterschiedlichen Tumorstadien erkrankt. Als Referenzgewebe wurden 5 Gewebeproben aus Schilddrüsenresektaten nach Operationen bei benignen Schilddrüsenerkrankungen untersucht.

Im Rahmen einer Therapiepilotstudie wurden drei der Patienten mit fortgeschrittenen follikulären Karzinomen einer Redifferenzierungstherapie mit dem Retinsäurederivat Roaccutan^R (13-cis-Retinsäure) unterzogen. Die Behandlung wurde über einen Zeitraum von 5 Wochen in einer Dosierung von 1,5 mg pro kg Körpergewicht durchgeführt. Diese Patienten wurden vor Therapiebeginn am Primärtumor oder an Rezidiven und nach Therapieende an erneuten Rezidiven operiert, so daß hier prä- und posttherapeutische Gewebe gewonnen werden konnten.

Die Tumorgewebe wurden unmittelbar postoperativ bei -80° C eingefroren und gelagert.

Eine Übersicht über die untersuchten Gewebe ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

| Gewebenr. | | Geschlecht | Histologie | TNM | Grading |
|-----------|--------|------------|------------|-----------------------|-----------------------|
| 1 | B. A. | W | Normal | | |
| | | | Gewebe | | |
| 2 | S.G. | W | Normal | | |
| | | | Gewebe | | |
| 3 | Z.M. | W | Normal | | |
| | | | Gewebe | | |
| 4 | E.C. | W | Normal | | |
| | | | Gewebe | | |
| 5 | ? | | Normal | | |
| | | | Gewebe | | |
| 6 | H.P. | m | PTC | k.A | Solid |
| | | | | | follikulär,hellzellig |
| 7 | H.K-W. | m | PTC | pT3 Nx M1(pul) | k.A. |
| 8 | B.L. | W | FTC | pT4 pN0 pMx | G2, teils onkozytär |
| 9 | H.W. | m | FTC | pT4b p N2 Mx | G2-3 |
| 10 | K.M. | W | FTC | T3 Nx Mx | G2 |
| 11 | P.J. | m | FTC | PT3N1bM1(pul) | G2-3 |
| | | | | | |
| Patient A | | | | | |
| 12 prä | Z. I. | m | FTC | pTx Nx1bM0 | k.A. |
| 13 post | Z. I. | | " | " | k.A. |
| | | | | | |
| Patient B | | | | | |
| 14 prä | K. H. | W | FTC | pT1 N1 M1 (pul) | k.A. |
| 15 post | K. H. | | " | " | k.A. |
| | | | | | |
| Patient C | | | | | |
| 16 prä | H. H. | m | FTC | pTx Nx M1(pul, os) | k.A. |
| 17 post | H.H. | | " | ,, | k.A. |

Tab.1: Übersicht untersuchter Gewebe; PTC= papilläres Schilddrüsenkarzinom, FTC= follikuläres Schilddrüsenkarzinom, k.A.= keine Angabe, prä= vor Retinsäuretherapie, post= nach Retinsäuretherapie. Die Patienten A, B und C sind einer Redifferenzierungstherapie mit Retinsäure unterzogen worden.

2.2 Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung aus Nativgewebe

Verwendet wurde das RNeasy total purification Kitt (Fa. Qiagen)

Die bei –80°C gelagerten Gewebeblöcke wurden mit einem sterilen Skalpell im gefrorenen Zustand zerkleinert und die abgetrennten Gewebestücke in vorgewogene Eppendorfgefäße überführt. Das Gewicht der Gewebsstücke konnte so auf einer Feinwaage bestimmt werden und sollte idealerweise maximal 50 µg betragen. Die kleingeschnittenen Gewebe wurden anschließend in einer Teflonkapsel mit einer Wolframkugel in flüssigem Stickstoff gekühlt. Die Kapsel wurde in einem Dismembranator eingespannt und das Gewebe bei 2000 rpm über 1 Minute zertrümmert. Die bis 30 µg schweren Gewebe wurden in 350 µl, die bis 50 µg schweren Gewebe in 600 µl Lysispuffer aufgenommen.

Nachdem das Puffer-Gewebetrümmer-Gemisch aufgetaut war, wurde es 3 min bei 15.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß übertragen und im Verhältnis von 1:1 mit70% Ethanol gemischt. Das die Zelltrümmer enthaltene Pellet wurde verworfen.

Die Ethanolsuspension wurde nun in eine Filtersäule übertragen und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Dabei wird die RNA auf der Filtermembran fixiert. Das Filtrat wurde verworfen. Um die RNA zu reinigen wurde anschließend nacheinander 700 μ l wash Puffer und zweimal 500 μ l RPE Puffer auf die Filtermembran aufgetragen und jeweils bei 10.000 rpm für 15 sec zentrifugiert. Das Filtrat wurde jeweils verworfen.

In einem letzten Schritt wurde 50 µl nukleasefreies Wasser auf die Membran aufgetragen, 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und so die RNA aus der Membran ausgewaschen und in einem Eppendorfgefäß aufgefangen.

2.2.2 Die cDNA-Synthese

Mit Hilfe der cDNA-Synthese läßt sich aus einem RNA Gemisch gezielt zur mRNA komplementäre DNA vervielfältigen. Dabei wird als Primer für die Reverse Transkriptase eine poly T Sequenz verwendet, die sich in an das poly A Ende der mRNA anlagert. In der anschließenden Synthesephase wird durch die Reverse Transskriptase aus Nucleotidtriphosphaten ein der mRNA – Sequenz complementärer DNA-Strang gebildet.

Verwendete Reagenzien

- 2,5 μ l pd T₁₂₋₁₈ (Fa.Pharmacia Biotech)
- 2,5 µl 10x RT-Puffer (Biolabs, New England)
- 2,5 µl 10mM dNTP (Fa. Promega)
- 0,5µl Bovine Serum Albumin (5mg/ml) (Fa. AGS GMBH)
- 0,7 µl RNAse Inhibitor 40 u/µl (Fa. Promega)
- 2 µl Reverse Transkriptase (Fa. Biolabs, New England)
- 9,3 µl nuklease freies Wasser (Fa. Promega)

Durchführung der cDNA-Synthese

Die RT-PCR wurde in einem Reaktionsvolumen von 25µl in autoklavierten 500µl Eppendorfgefäßen durchgeführt

Zunächst wurden 5µl RNA mit 2,5µl pd T_{12-18} Oligonukleotid gemischt und zur Denaturierung der RNA Stränge für 5 min auf 75°C erhitzt. Um eine Renaturierung zu verhindern, wurde der Ansatz anschließend sofort auf Eis gelagert. Jedem Reaktionsgefäß wurden dann 2,5µl RT- Puffer, 2,5µl 10mM dNTP, 0,5 µl BSA, 0,7µl RNAse Inhibitor, 2µl Reverse Transkriptase und 9,3µl nukleasefreies Wasser hinzugegeben und die Reaktion bei 37°C für 1h gestartet. Um zu vermeiden, daß die Proteine und das Enzym eine anschließende Polymerasekettenreaktion beeinflussen wurde anschließend zur Proteindenaturierung für 5 min auf 75°C erhitzt. Die cDNA wurde danach bei -20°Ceingefroren.

2.2.3 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurden im Mastercycler 5330 (Fa. Eppendorf) und im DNA Thermal cycler 480 (Fa.Perkin Elmer) durchgeführt.

Verwendete Oligonukleotide (Primer)

GAPDH₃₀₆

| Sense Primer(Vorwärts Primer): | CGG AGT CAA CGG ATT TGG TAT |
|--------------------------------------|---------------------------------|
| Antisense Primer (Rüchwärts Primer): | AGC CTT CTG CAT GGT GGT GAA GAC |
| | |

Das cDNA Amplimer unter Verwendung dieser Primer ist 306 bp lang.

HNIS_{B7G}

| Sense Primer: CGA GGA AGC CGC TAT ACA TTO | ense Primer: | CGA GGA AGC CGC TAT ACA TTC |
|---|--------------|-----------------------------|
|---|--------------|-----------------------------|

Antisense Primer: TAC TGG TCT GGG GCA GAG ATG CGC

Das cDNA Amplimer unter Verwendung dieser Primer ist 259 bp lang.

Die Oligonukleotidsynthese der Sense Primer erfolgte durch die Firma Pharmacia, die Antisense Primer wurden von der Firma Gibco BRL geliefert.

PCR Bedingungen

für GAPDH₃₀₆

| Denaturierung | 94°C | 5 Min. | |
|---------------|------|---------|-------------|
| Denaturierung | 94°C | 45 Sek | ٦ |
| Annealing | 55°C | 45 Sek. | > 30 Zyklen |
| Synthese | 72°C | 1 Min. | J |
| Extension | 72°C | 10 Min. | |

für HNIS_{B7G}

| Denaturierung | 94°C | 5 Min. | |
|---------------|------|---------|-------------|
| Denaturierung | 94°C | 30 Sek | ٦ |
| Annealing | 60°C | 30 Sek. | > 35 Zyklen |
| Synthese | 72°C | 45 Sek | J |
| Extension | 72°C | 10 Min. | |

Die Reaktionsprodukte wurden nach Abschluß der Reaktion bei 4°C gelagert.

PCR-Ansatz

Jeder PCR-Ansatz wurde in einem Gesammtvolumen von 50µl durchgeführt. Dieser enthielt folgende Reagenzien:

48µl Ansatz:

| 35,75µl | nukleasefreies Wasser (Fa.Promega) |
|---------------|---|
| 5µl | 10 x PCR Puffer (Fa. Perkin Elmer) 15mM MgC |
| 5µl | 2mM dNTP (Fa. Promega) |
| 1µl | Sense Primer (50pmol/l) |
| 1µl | Antisense Primer (50 pmol/l) |
| <u>0,25µ1</u> | Taq Polymerase (250u/µl) (Fa. Perkin Elmer) |

<u>2µl DNA</u>

50µl Reaktionsvolumen

Zum Ansatz wurden autoklavierte 500µl Eppendorf-Röhrchen (Fa. Perkin Elmer) und nukleasefreie Pipettenspitzen (Fa. Biozym) verwendet. Für alle Proben, die miteinander verglichen wurden, wurde ein gemeinsamer Mastermix angesetzt und anschließend jeweils 48µl auf die einzelnen Eppendorfgefäße verteilt. Nur die cDNA und die MIMIC DNA wurden individuell zugegeben. Zuvor wurde die cDNA mit nukleasefreiem Wasser, die MIMIC-DNA in 1x TE-Puffer (Fa. Serva) individuell verdünnt. Um ein Verdunsten des Reaktionsgemisches zu vermeiden, erfolgte die Überschichtung mit je 2 Tropfen Mineralöl (Fa. Sigma).

2.2.4 Die kompetetive PCR

Mittels RT-PCR können geringe mRNA-Mengen aus sehr kleinvolumigen Untersuchungsproben nachgewiesen werden. Aufgrund der exponentiellen Reaktionsnatur der PCR resultieren jedoch kleine Variationen in der Amplifikationsphase in großen Konzentrationsschwankungen im Reaktionsprodukt, so daß quantitative Aussagen nur schwer möglich sind (Siebert et al., 1992). Um dennoch quantitative mRNA Bestimmungen mittels PCR durchzuführen, wurde in dieser Arbeit die Methode der kompetetiven PCR (nach Gililand und Becker-Andre et al.) der Fa. Clontech Laboratories, Inc. angewendet. Grundprinzip der kompetitiven PCR ist ein interner Standard innerhalb des Reaktionsgefäßes, der während der exponentiellen Amplifikationsphase der Reaktion unter identischen Bedingungen mit der cDNA des zu untersuchenden Gens reagiert.

Als ein interner Standard wird ein synthetisiertes DNA Fragment verwendet (die MIMIC-DNA), an welches die Primersequenz des zu untersuchenden Gens angehängt ist. Die MIMIC-DNA und die cDNA des Zielgens besitzen somit identische Primerbindungsstellen. In der Reaktion konkurrieren beide DNA um die Primer. Die Reaktion findet in einem und beide Fragmente werden gleichzeitig unter Röhrchen statt identischen Reaktionsbedingungen exponentiell amplifiziert. Somit wirkt sich ein eventueller Tube-Effekt identisch auf beide DNA aus. Im Reaktionsprodukt ist das Verhältnis von MIMIC-DNA zur cDNA des Zielgens identisch zum Verhältnis der beiden Ausgangs DNA im Reaktionsansatz. Somit läßt sich durch die bekannte Menge der MIMIC-DNA im Ausgangsreagenz die Menge der cDNA bestimmen.

Synthese des PCR-MIMIC

Verwendet wird das 574 bp lange BamH I/EcoR I Fragment des V-erbB Gens (MIMIC DNA Fragment). Aus diesem wird ein Fragment amplifiziert, welches sich in seiner Länge nicht mehr als 100 bp von dem Zielgen unterscheiden soll. Einerseits ist durch den nicht zu großen Längenunterschied gewährleistet, daß sich die beiden Fragmente in ihrer Reaktionskinetik gleichen, andererseits lassen sie sich in der Gelelektrophorese ausreichend weit zur densitometrischen Auswertung voneinander auftrennen.

In einer ersten PCR wird ein sogenannter composite Primer verwendet, bei dem an eine ca 20 bp lange Sequenz für das V-erB-Gen die Primersequenz des zu untersuchenden Gens (Ziel-Gen) angehängt ist. Das synthtetisierte Amplimer (PCR MIMIC) besitzt nun die Sequenz des Ziel-Gens. In einer zweiten PCR mit dem Ziel-Primer wird PCR MIMIC vervielfältigt und anschließend mit Hilfe des DNA-Purification Kitt (Fa. Qiagen) aus dem PCR-Ansatz isoliert. Die DNA Konzentration wird photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt.

Zur Reinheitskontrolle der isolierten DNA wird das Verhältnis der photometrischen Absorption von 260 nm (DNA) zu 280 nm (Protein) bestimmt. Die Ratio sollte idealerweise >1,5 sein.



Abb.: Prinzip der MIMIC-DNA Synthese

Verwendete Oligonukleotide zur Synthese des PCR-MIMIC

Composite Primer für GAPDH

| Sense Primer: | CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT CAA GTT |
|--------------------|---|
| | TCG TGA GCT GAT TG |
| Antisense Primer : | AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC GGG |
| | ACA AGA TAC TCA TCT GG |

Composite Primer für HNIS_{B7G}:

| Sense Primer: | CGA GGA GCC GCT ATA CAT TCC GCA AGT GAA |
|---------------|---|
| | ATC TCC TCC G |
| | |

Antisense Primer : TAC TGG TCT GGG GCA GAG ATG CGC TCT GTC AAT GCA GTT TGT AG

Ansatz der ersten PCR

<u>98µl Ansatz:</u>

| 74,5µ1 | nukleasefreies Wasser |
|--------------|---|
| 10µ1 | 10 x PCR Puffer (Fa. Perkin Elmer) |
| 10µ1 | 2mM dNTP |
| 2µl | Sense composite Primer (50 pmol/l) |
| 2µl | Antisense composite Primer (50 pmol/l) |
| <u>0,5µl</u> | Taq Polymerase (250u/µl) (Fa. Perkin Elmer) |

+1µl V-erbB DNA 100µl Reaktionsvolumen

Ansatz der zweiten PCR

197µl Ansatz:

| 148µl | nukleasefreies Wasser |
|------------|---|
| 20µ1 | 10 x PCR-Puffer |
| 20µ1 | 2mM dNTP |
| 4µl | Sense Primer (50 pmol/l) |
| 4µl | Antisense Primer (50 pmol/l) |
| <u>1µ1</u> | Taq Polymerase (250u/µl) (Fa. Perkin Elmer) |

3μl aus dem PCR Produkt der ersten PCR 200μl Reaktionsvolumen

PCR Bedingungen s.o.

PCR-MIMIC-DNA-Isolierung aus dem PCR-Ansatz

Verwendet wurde das PCR Purification Kit (Fa.Qiagen).

Verwendete Reagenzien

Puffer PB (Fa. Qiagen) Puffer PE (konzentriert) (Fa.Qiagen) 1x TE-Puffer pH 7,4 (Fa. ?)

Dem 200µl Reaktionsansatz wurde durch Absaugen mit einer Pipette das Mineralöl entfernt und 1000µl PB-Puffer hinzugegeben. Nach mehrmaligen Durchmischen wurden nacheinander jeweils 600µl der Suspension in eine Filtersäule (QIAspin column) übertragen und 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert; das Fltrat wurde verworfen. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer in die Filtersäule pipettiert und wie oben zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut verworfen. Die in der Filtermembran fixierte DNA wurde mit 50 μ l 1x TE-Puffer durch einminütiges Zentrifugieren bei 15.000 rpm ausgewaschen und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen.

Die Reinheit der isolierten DNA wurde durch Auftragen von 2µl Probenvolumen auf ein 8% Polyacrylamidgel kontrolliert.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch bei 260 nm gemessen.

Zur Lagerung wurde die Probe bei –20° C eingefroren.

Die MIMIC-DNA Fragmente

Das PCR-MIMIC für GAPDH ist 228 bp lang

Die Größe des PCR-MIMIC für HNIS beträgt 400 bp.

2.2.5 Durchführung der kompetitiven PCR

Idealerweise liegt im Ausgangsreagenz und somit auch im PCR-Produkt eine identische Konzentration an DNA des Zielgens und MIMIC-DNA vor, so daß man aus Konzentration der MIMIC-DNA die Zielgen-DNA (cDNA) bestimmen kann.

Da die Menge der zu messenden DNA im Ausgangsreagenz jedoch unbekannt ist, wurde eine Verdünnungsreihe der MIMIC-DNA in absteigender Konzentration angelegt. In einem PCR-Ansatz reagierten mindestens vier verschiedene Konzentrationen an MIMIC-DNA mit einer konstanten Menge an cDNA. Aufgrund der großen Verdünnungsschritte der MIMIC-DNA wurde der äquimolare Bereich jedoch nur zufällig getroffen. Deshalb wurden die Verdünnungsschritte so gewählt, daß die erwartete cDNA Menge zwischen der höchsten und niedrigsten MIMIC-DNA Konzentration liegt.

Nach Abschluss der Reaktion wurden die beiden Amplimere der PCR-Produkte durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt, so daß jedes Amplimer im Gel als einzelne Bande vorliegt. Die einzelnen Banden wurden mittels Densitometrie quantifiziert. Durch verrechnen der dabei erhaltenen Rohdaten läßt sich die Menge der in die PCR eingebrachte cDNA bestimmen.

2.2.6 Die Polyacrylamidgelelektrophorese

Verwendet wurde ein System der Fa. Biorad

| Pufferkammer : | Bio Rad |
|-----------------|---|
| Gelplatten : | Bio Rad Mini Protean II Cell; Dicke 1 mm |
| Abstandhalter : | Bio Rad Mini Protean II Spacer; Dicke 1mmm |
| Kamm : | Bio Rad Mini Protean II ; Dicke 1mm ; Vertiefungen 10 |

Als Laufpuffer wurde 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer verwendet, der durch eine Verdünnung von 200ml 5 x TBE (Fa. Sigma) mit 800ml destilliertem Wasser hergestellt wurde.

Als Ladepuffer zum Probenauftrag wurde eine Gel loading solution der Fa. SIGMA benutzt. Von dieser wurde ein Tropfen mit 10 ml des PCR-Reaktionsproduktes vermischt und in die Ladetaschen eingefüllt.

Die Elektrophorese wurde bei 150V für ca. 45min durchgeführt. Als Spannungsquelle diente das Elektrophoresegerät Biometra Minicell Power Pack P20.

Vorbereitung der Glasplatten

Bevor die Glasplatten zusammengebaut wurden, erfolgte eine Reinigung der Glasplatten, Abstandhalter und Kämme mit Wasser und Behandlung mit einer Silikonlösung (Fa.SERVA).

Ansatz einer Acrylamid/Bisacrylamid Stammlösung 30:0.5 v/v

In einen 1 Liter Meßzylinder wurden 300g Acrylamid (Fa. SIGMA), 5g Bisacrylamid (Fa. SIGMA) und 4g Amberlite (Fa. SERVA) eingewogen. Nach Zugabe von 11 destilliertem Wasser wurde der Ansatz für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Magnetrührer belassen. Nach Filtrierung der Lösung über einen Schleicher-und Schüllfilter folgte unter Lichtabschluß die Lagerung bei 4°C.

Ansatz einer 8% v/v Polyacrylamidstammlösung

Folgende Reagenzien wurden für eine 89 ml Stammlösung gemischt:

| Acrylamid/Bisacrylamid 30:0.5 v/v | 24ml |
|-----------------------------------|--------|
| 5 x Tris-Borate-EDTA | 18ml |
| Glycerol 40% v/v (Fa. SIGMA) | 4,5ml |
| Aqua bidestillata | 42,5ml |

Herstellung eines 8% Polyacrylamidgels

Benötigte Reagenzien:

8% PAA-Stammlösung10% Ammoniumpersulfat (APS), (Fa. SIGMA)N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamid (TEMED), (Fa. SIGMA)

Zu 10 ml 8% PAA-Stammlösung wurden 40µl 10 % Amoniumpersulfat und 25µl TEMED hinzugegeben und durch Schütteln gemischt. Ca. 10 Minuten nach dem Eingießen zwischen die Glasplatten und Einschieben des Kammes war das Gel polymerisiert.

Ansatz einer Ethidiumbromidfärbelösung

Zur Färbung des Polyacrylamidgels wurden 30µl Ethidiumbromid (Fa. Sigma,10mg/ml) mit 200ml Aqua bidest verdünnt.

Färbung des Gels

Nach entfernen der Glasplatten und der Abstandhalter wurde das Gel für 7min in der Färbelösung auf einem Schüttler geschwenk und anschließend in zwei 5minütigen Waschgängen in destilliertem Wasser entfärbt.

2.2.7 Photodokumentation

Die bildliche Darstellung des gefärbten Polyacrylamidgels erfolgte unter UV-Licht (8mv/cm²) mit einer Belichtungszeit von 1 Sekunde bei einer Blendeneinstellung von 4,5.

2.2.8 Die Quantifikation mittels Geldensitometrie

Die beiden Amplimere der Amplifikationsprodukte wurden durch Polyacrylamidelektrophorese getrennt und durch Ethidiumbromid gefärbt. Dabei wurde Sorge getragen, daß die aufgetragene Produktmenge sich unter dem Bereich der optischen Sättigung bei der nachfolgenden Photodokumentation und densitometrischen Analyse befand.

Zur densitometrischen Ausmessung wurde ein Dokumentationssystem der Firma Biorad verwendet. Die Rohdaten wurden erzeugt, indem die sichtbaren Banden mittels eines Standardkästchens umfahren und die Leuchtdichte der Banden nach Abzug des Hintergrundes ermittelt wurden. Der Leuchtdichtewert wird von der Software des Systems (Fa. Biorad) in Volumenprozent angegeben und entspricht der Bandenintensität. Die Bandenintensität ist zur DNA-Menge im Polyacrylamidgel und somit zur DNA-Konzentration im PCR-Produkt direkt proportional.



Foto: Foto einer Polyacryamidgelelektrophorese eines normalen SD-Gewebes Die oberen Banden entsprechen den cDNA Amplimeren, die unteren Banden zeigen MIMIC-DNA in von links nach rechts absteigender Konzentration

2.3 Auswerten der Leuchtdichtewerte

Aus den Leuchtdichtewerten der MIMIC-Bande und der cDNA Bande, die vom Densitometer in Volumenprozent angegeben werden, wurde ein Quotient gebildet.

$Q_1 = N_1 : N_2$

N₁ = Leuchtdichtewert der MIMIC-DNA Bande, N₂= Leuchtdichtewert der cDNA Bande

Von diesem Quotient wurde der Logarithmus berechnet.

LogQ₁

Um die weiteren Berechnungen zu vereinfachen wurde von dem Verdünnungsfaktor der MIMIC-DNA ebenfalls der Logarithmus berechnet.

| Vol%MIM | <u>Vol%cDNA</u> | MIMIC/cDNA | LogMIMIC/cDNA | LogMIMIC- Verdünnung |
|---------|-----------------|------------|---------------|-------------------------|
| 19,37 | 0,98 | 19,77 | 1,30 | -5 |
| 21,96 | 3,02 | 7,27 | 0,86 | -5,7 |
| 11,83 | 3,59 | 3,30 | 0,52 | -6,4 |
| 4,08 | 10,18 | 0,40 | -0,40 | -7,1 |

Tabelle : Auswertung der Leuchtdichtewerte einer GAPDH ₃₀₆ - PCR eines follikulären SD-Ca

In einem Koordinatensystem wurden die Werte von $LogQ_1$ gegen den Logarithmus der MIMIC-DNA-Verdünnung aufgetragen.



Abb.: Im Koordinatensystem sind die Werte aus der oben dargestellten Tabelle aufgetragen.

X-Achse:=Logarithmus der MIMIC-DNA – Verdünnung, Y-Achse:=Logarithmus von Q₁ Das blaue Kreuz markiert den Schnittpunkt der Trendlinie mit der X-Achse mit dem zugehörigen Wert des Logarithmus der MIMIC-DNA –Verdünnung. Bei diesem Wert ist das Verhältnis von cDNA zu MIMIC-DNA gleich 1. Durch die einzelnen Punkte im Koordinatensystem wird vom Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft Excel) eine Mittelwertlinie (Trendlinie) gezogen.

Der Schnittpunkt dieser Linie mit der X-Achse zeigt den Logarithmus der MIMIC-DNA-Verdünnung bei $LogQ_1 = 0$ an. Definitionsgemäß entspricht Log 0 = 1. Das bedeutet, daß hier der Quotient aus cDNA zu MIMIC-DNA gleich 1 ist, die Menge der cDNA also der MIMIC-DNA Konzentration im PCR-Produkt entspricht. An diesem Punkt läßt sich somit indirekt über die MIMIC-DNA Menge auf die cDNA Menge schließen.

Der im Koordinatensystem angegebene Schnittpunkt liegt als Logarrithmus vor. Dieser Wert wird exponiert und man erhält die Menge der cDNA als semiquantitiven Wert.

Für die PCR wurde jede cDNA individuell mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Diese Verdünnung wurde bei der Berechnung der Leuchtdichtewerte durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor mit berücksichtigt.

Mit jeder cDNA wurden mindestens drei PCR durchgeführt. Aus den einzelnen Werten jeder PCR Auswertung wurde ein Mittelwert n bestimmt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben der Schilddrüsentumore und Normalgewebe lagen nur in sehr geringer Menge vor. Um die isolierte mRNA zu messen, wurde zunächst mittels RT-PCR eine komplementäre cDNA synthetisiert. Da die cDNA-Synthese bei den jeweiligen Proben mit unterschiedlicher Effizienz reagiert, ist die RNA-Konzentration im verschiedenen Reaktionsprodukten variabel.

Durch quantitative Messung des ubiquitär vorhandenden und konstant exprimierten housekeeping Gens GAPDH₃₀₆ mittels kompetetiver PCR wurde die Effizienz der cDNA-Synthese ermittelt. Die Expression des HNIS-Gens wird bestimmt aus dem Verhältnis der HNIS_{B7G} Menge zur GAPDH₃₀₆ Menge in der cDNA. Somit dient das housekeeping Gen als interner Standard innerhalb der cDNA-Synthese. Je höher der Anteil der HNIS-Menge an der GAPDH₃₀₆-Menge einer cDNA ist, desto höher ist auch seine Expression.

Dementsprechend wurde für jede Probe aus den semiquantitaven Werten für HNIS und $GAPDH_{306}$ ein Quotient Q₂ bestimmt.

Q₂ =HNIS : GAPDH

Q₂ ist der semiquantitative Wert für die Expression von HNIS in den untersuchten Geweben.

Unter der Annahme von äußeren, nicht zu kontrollierenden Einflußfaktoren auf die PCR (sogenannter Tube-Effekt) wurden nur die Proben untereinander verglichen, welche zusammen in einem Mastermix und gleichzeitig in einem Reaktionsgerät reagierten.. So wurde sichergestellt, daß die eventuell vorhandenen Einflußfaktoren sich in gleicher Weise auf alle Proben eines Reaktionsansatzes auswirken. Der Mastermix wurde auf die einzelnen Reaktionsröhrchen verteilt und anschließend die jeweilige individuelle Menge an cDNA und MIMIC-DNA hinzupipettiert Wegen begrenzter Kapazität der PCR-Reaktionsgeräte konnten jedoch nicht alle Gewebe in einem Ansatz untersucht werden. Deshalb wurden zwei unabhängige Untersuchungsreihen jeweils für GAPDH₃₀₆ und HNIS_{B7G} durchgeführt. Dabei werden nur die Ergebnisse einer Untersuchungsreihe untereinander verglichen, es können jedoch nicht die Ergebnisse der beiden Untersuchungsreihen miteinander verglichen werden.

2.4 Retinoidtherapie

Die Behandlung der Patienten A, B und C erfolgte mit 13-cis-Retinsäure (Roaccutan^R) in einer Dosierung von 1,5 mg/kg Körpergewicht pro Tag über 5 Wochen. Parallel hierzu wurde Trijothyronin T3 (Thybon^R) verabreicht, welches 2 Wochen vor Beendigung der Retinoidtherapie abgesetzt wurde.

2.4.1 Prä- und posttherapeutische Diagnostik

Zur Dokumentation der Effekte der Retinsäuretherapie wurden als Zielgrößen der Thyreoglobulinspiegel im Plasma, die Radiojodaufnahme in der Szintigraphie, Größe des Tumors in bildgebenden Verfahren und fakultativ der Glucosemetabolismus in der 18-FDG-Positronenemissionstomographie gewählt.

Vor Beginn der Therapie wurde ein diagnostisches Ganzkörper-Radiojodszintigrsmm mit 75-100 MBq zum Ausschluß der Radiojodspeicherung durchgeführt. Nach Abschluß der Retinoidtherapie erfolgte eine Radiojodtherapie mit 1-3 GBq. Eine Jodkontamination wurde durch Jodmessung im Urin ausgeschlossen. Vor Radiojodtherapie wurde die Schilddrüsenhormontherapie fristgerecht abgesetzt. Serum-Thyreoglobulin (TG) wurde im und posttherapeutisch bestimmt. Die Tumorgröße Verlauf präwurde mittels Computertomographie vor und frühestens 6 Monate nach Retinoidtherapie gemessen. Die Positronenemissionstomographie (PET) mit markierten FDG zur Messung der Glukoseaufnahme des Tumors war eine fakultative Untersuchung.

3 Ergebnisse

3.1 Die Expression von HNIS

In allen untersuchten Geweben wurde die Expression von HNIS quantitativ mittels kompetetiver PCR untersucht. Unter der Annahme von äußeren Einflußfaktoren (sogenannter Tube-Effekt) auf die jeweiligen Reaktionen wurde die Expression nur zwischen den Proben verglichen, die innerhalb eines Reaktionsansatzes miteinander reagierten. Aufgrund begrenzter Kapazität der Reaktionsgeräte konnten jedoch nicht alle Proben gleichzeitig untersucht werden.. Daher wurden zwei unabhängige Versuchsreihen angelegt. Die unterschiedliche HNIS-Expression der Gewebe darf nicht zwischen den Untersuchungen verglichen werden.

erste cDNA Untersuchungsreihe



In einer ersten Untersuchungsreihe wurde 1 normales Gewebe (Nr.4), 2 papilläre SD-Karzinome (Nr. 6 u. 7) und 2 follikuläre SD-Karzinome (Nr. 10 u. 11) miteinander verglichen.

Die Gewebe Nr.12 und 13, sowie 14 und 15 stammen von denselben, an follikulären Schilddrüsenkarzinom erkrankten Patienten. Die Gewebe Nr. 12 und 14 sind in Operationen vor einer Retinsäurebehandlung (prä-Gewebe), die Gewebe Nr.13 und 15 in Operationen nach Abschluß der Retinsäurebehandlung (post-Gewebe) gewonnen worden.

Bei den beiden follikulären SD-Karzinomen der Nr. 8 und der Nr. 9 konnte bei starker GAPDH-Expression das HNIS-Gen nicht amplifizert werden, so daß hier eine fehlende HNIS-Expression angenommen werden kann. Diese beiden Gewebe sind deshalb in diesem Diagramm nicht aufgeführt.

Die beiden papillären Karzinome zeigen eine um den Faktor 5 erhöhte HNIS-Expression im Vergleich zum normalen SD-Gewebe.

Bei Patient A ist die HNIS-Expression im post-Gewebe um den Faktor 5 höher als im prä-Gewebe. Bei Patient B liegt im post-Gewebe eine um den Faktor 21 erhöhte HNIS-Expression als im prä-Gewebe vor.

Beide Patienten A und B sind an follikulären SD-Karzinomen erkrankt. Die Gewebe dieser Patienten zeigen eine zweifach höhere HNIS-Expression als das normale SD-Gewebe.



zweite cDNA Untersuchungsreihe

In einer zweiten Versuchsreihe wurden 5 verschiedene normale SD-Gewebe (Nr.1-5), 1 papilläres SD-Karzinom (Nr. 6), 2 follikuläre SD-Karzinome (Nr.8 und 9) und das prä und post Gewebe von Patient C (Nr.16 und 17) miteinander untersucht. Von dem Gewebe Nr. 1 wurden zwei verschiedene RNA A und B isoliert und dementsprechend zwei verschiedene cDNA untersucht.

Der Mittelwert n der Expression aller normalen SD-Gewebe beträgt n =0,65

Das papilläre SD-Karzinom zeigt eine um den Faktor 3,4 erhöhte HNIS-Expression als der Mittelwert der Expression der normalen SD-Karzinome.

Beide follikuläre SD-Karzinome exprimieren eine 11fach geringere Menge HNIS als der Mittelwert der normalen SD-Gewebe.

Bei Patient C ist im post-Gewebe die Expression des HNIS-Gens um den Faktor 50 geringer als im prä-Gewebe. Im Vergleich mit dem normalen SD-Gewebe zeigt sich im prä-Gewebe eine 4fach niedrigere HNIS-Expression.

Vergleich beider cDNA-Untersuchungsreihen

In beiden Untersuchungsreihen ist die HNIS-Expression der papillären Karzinome höher als die der normalen Schilddrüsengewebe.

In der ersten Untersuchungsreihe ist die Expression in den follikulären Karzinomen höher, in der zweiten Untersuchungsreihe niedriger als in den Normalgeweben.

Die Patienten A und B zeigen einen Anstieg der HNIS-Expression in den posttherapeutischen Geweben. Bei Patient C ist im posttherapeutischen Gewebe die HNIS-Expression kaum noch messbar.

3.2 Klinische Daten der mit Retinsäure therapierten Patienten

| Patient Geschlecht Histologie | | Histologie | TNM | TG | | RI-SCAN | | | FDG-PET | | TU- Größe | |
|-------------------------------|---|------------|--------------|-------|-------|---------|-----|------|---------|-----|--------------|---------------|
| | | | | Prä | post | fup | prä | post | fup | prä | post | |
| Α | М | FTC | PTxNx1pM0 | 2067 | 4290 | - | (+) | (+) | n.d. | + | + | € |
| В | W | FTC | PT1N1M1(pul) | 128 | 3,8 | 64 | - | ? | (+) | + | - | \Rightarrow |
| С | М | FTC | PTxNxM1(pul) | 218.8 | 793.9 | 476.6 | - | (+) | - | n.d | n.d. | \Rightarrow |

Tabelle: TG= Thyreoglobulin (ng/ml), prä/post/f.-up= vor, nach Retinsäuretherapie; follow-

up, RI-SCAN= Jodaufnahme in der Radiojodszintigraphie; FDG—PET= Glukoseaufnahme des Tumors in der Positronenemissionstomographie, TU-Größe= Progreß im CT oder MRT; $\uparrow/\downarrow/\Rightarrow$ = Zunahme/ Abnahme/ gleichbleibend

+= positiv, (+)= schwach positiv, -= negativ, n.d. = nicht dokumentiert

3.3 Vergleich der experimentellen Ergebnisse mit klinischen Ergebnissen

Bei Patient A zeigt sich im post-Gewebe ein 4 facher Anstieg der HNIS-Expression. In der Auswertung der klinischen Untersuchungen zeigen sich ein Anstieg des TG-Spiegels, eine unverändert schwache Jodaufnahme, eine ebenfalls unverändert starker Glukoseverbrauch des Tumors und eine Zunahme der Tumorgröße in bildgebenden Verfahren.

Patient B zeigt im post-Gewebe eine 21fach höhere HNIS Expression als im prä-Gewebe. Klinisch zeigt sich ein vorübergehender Abfall des TG-Spiegels und eine erneute Aufnahme von Radiojod im follow-up, nachdem diese in der Untersuchung vor Therapiebeginn nicht nachzuweisen war. Ebenfalls ist der Glukosemetabolismus in der posttherapeutischen Untersuchung abgefallen und der Tumor zeigt in den bildgebenden Verfahren keine Größenprogredienz.

Im post-Gewebe von Patient C läßt sich nur noch eine sehr geringe HNIS-Expression nachweisen, die weit unter der Expression im prä-Gewebe liegt. In den klinischen Untersuchungen findet sich eine Zunahme des TG-Spiegels und eine geringe Zunahme der Jodaufnahme in der posttherapeutischen Untersuchung, die jedoch in der follow-up Untersuchung nicht mehr nachweisbar ist. In den bildgebenden Verfahren findet sich eine gleichbleibende Größe des Tumors; der Glukosemetabolismus im FDG-PET wurde nicht bestimmt.

4 Diskussion

4.1 Die quantitative PCR

In dieser Arbeit wurde die Expression des HNIS-Gens in Schilddrüsengeweben durch ein quantitatives Verfahren der RT-PCR. untersucht Die Anwendung der RT-PCR in Expressionsstudien ist als schnelles und sensitives Verfahren etabliert. Allerdings ist die Quantifizierung mittels PCR sehr anfällig, da durch die exponentielle Reaktionskinetik kleine Variationen in der Amplifikationseffizienz zu großen Konzentrationsschwankungen in der Reaktionsproduktmenge führen. Daher muß ein interner Reaktionsstandard verwendet werden, der unter identischen Bedingungen wie die zu untersuchende DNA reagiert.

In dieser Arbeit wurde die kompetitive PCR mit einem Reaktionskitt der Fa. Clontech Laboratories, Inc. nach der Methode von Giliand und Becker-Andre angewendet, bei der die zu untersuchende DNA mit einem zweiten DNA-Fragment (die MIMIC-DNA) um das selbe Primerpaar konkurriert und dieses somit als interner Reaktionsstandard dient.

Ein weiteres etabliertes Verfahren zur quantitativen Messung von RNA in Expressionsstudien ist die Methode des Northern-Blotting. Nachteil dieser Methode ist der Bedarf an großen Mengen des zu untersuchenden Gewebes (Chung et al., 2001). Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebe wurden jedoch aus den für die histopathologische Untersuchung bestimmten Operationspräparaten entnommen und hatten die Masse von nur wenigen Milligramm.

Durch die RT-PCR kann im Vergleich zum Northern-Blotting mRNA in sehr kleinen Gewebemengen bestimmt werden; eine um den Faktor 1000-10.000 höhere Sensitivität ist beschrieben (Mocharla et al., 1990; Wang et al., 1989). Somit konnte in dieser Arbeit nur diese Methode als adäquates Verfahren verwendet werden.

Eine alternative quantitative RT-PCR Methode ist die Multiplex-PCR, in der zwei verschiedene Primerpaare reagieren. Als interner Standard dient hier das zweite Primerpaar, welches neben dem Primer des Zielgens ein konstant exprimiertes Housekeeping-Gen synthetisiert. Die Expression des Zielgens wird aus dem Quotient Zielgen zu Housekeeping-Gen ermittelt.

Jedoch müssen diese Daten während der exponentiellen Phase der PCR erhoben werden. Häufig hat die Reaktion jedoch schon die Plateauphase erreicht, wenn PCR-Produkte in den nötigen Mengen vorliegen, um sie auf einem Ethidiumbromid-Gel nachzuweisen. Daher müssen sensitivere und aufwendigere Nachweismethoden, wie zum Beispiel radioactivelabelled Nucleotide, verwendet werden.

Weiterhin ist die gegenseitige Behinderung mehrerer Primerpaare während der Amplifikationsphase mit Einfluß auf Konzentrationen im PCR-Produkt beschrieben (Siebert et al., 1992; Clontech Laboratories Handbuch).

Grundprinzip der kompetetiven PCR ist die Verwendung eines internen Standard, der die selben Primerbindungssequenzen und eine ähnliche Länge wie das Zielgen hat. Damit sind die Voraussetzung für eine annähernd identische Reaktionskinetik beider Amplimere erfüllt und die Amplifikation des Standards und des Zielgens ist über den gesamten Verlauf der Reaktion einheitlich (Chung et al.; Porcher et al.; Pannetier et al.). Es leitet sich ab, daß das Konzentrationsverhältnis beider Amplimere im Reaktionsprodukt gleich zu dem im Ausgangsreagenz ist. Somit kann bei bekannter Menge des Standards die Menge des Zielgens errechnet werden.

Während der Etablierung der PCR-Bedingungen und der Austestung der verschiedenen Konzentrationsverhältnisse von cDNA zu MIMIC-DNA stellte sich heraus, daß die hoch verdünnten MIMIC-DNA Lösungen sehr instabil waren und nicht eingefroren werden konnten und somit nicht für mehrere Reaktionsansätze geeignet waren. Daher wurde für jede Reaktion eine neue Verdünnungsreihe angelegt. So wurde nach dem Protokoll der Arbeitsgruppe von Ryu et al. (1999) verfahren, die ebenfalls Expressionsstudien mit kompetetiver PCR durchführte und von der gleichen Problematik berichtete.

Um die einzelnen Proben quantitativ untersuchen zu können, wurden zwei Versuchsreihen angelegt, in denen die einzelnen Proben in demselben Mastermix und derselben MIMIC-DNA-Verdünnungsreihe als Meßstandard reagieren. Für jede Reaktion wurden jeweils eine neue Verdünnungsreihe und ein neuer Mastermix erstellt. Da so die einzelnen Proben unter möglichst identischen Bedingungen reagierten, können die Ergebnisse innerhalb einer Versuchsreihe aufeinander bezogen werden. Ebenfalls konnte so sichergestellt werden, daß eventuell vorhandene äußerliche Einflußfaktoren sich in gleicher Weise auf allen Proben auswirken.

4.2 Die HNIS-Expression in menschlichen Schilddrüsenkarzinomgeweben

In dieser Arbeit wurden 5 normale Gewebe, 2 papilläre und 7 follikuläre Karzinomgewebe quantitativ auf ihre Expression von HNIS-RNA untersucht.

In einer ersten Untersuchungsreihe waren bei zwei follikulären Karzinomen bei voller Expression des Housekeeping Gens GAPDH eine HNIS Expression nicht nachweisbar. Die zwei follikulären Karzinome der retinsäuretherapierten Patienten zeigen eine zweifach höhere Expression als das Normalgewebe.

Beide papillären Karzinome zeigen eine fünffach höhere HNIS-Expression als das Normalgewebe.

In der zweiten Versuchsreihe zeigen die fünf Normalgewebe Schwankungen in ihrer HNIS-Expression. Beide follikulären Karzinome exprimieren eine 11fach geringere Menge HNIS als der Mittelwert der Expression der Normalgewebe. Das follikuläre Karzinom des retinsäuretherapierten Patienten zeigt eine 4fach geringere Expression.

In dem papillären Karzinom ist eine 3,4fach höhere Menge an HNIS-RNA als in den Normalgeweben meßbar.

In beiden Versuchsreihen zusammengefaßt beobachten wir eine generell geringere HNIS-Expression in den follikulären Karzinomen und eine höhere Expression in den papillären Karzinomen im Vergleich zum Normalgewebe.

Der Verlust und die Verminderung der HNIS-Expression in den follikulären Karzinomen entspricht der Vorstellung, daß im Rahmen der malignen Entartung und der Entdifferenzierung die spezifische Fähigkeit des Thyreozyten, den Natrium-Jod-Symporter zu bilden, verloren geht (Filleti et al., 1999). Mehrere Arbeitsgruppen zeigten in ihren Arbeiten ebenfalls eine Verminderung der HNIS-Expression in maligne entarteten Geweben und Zellkulturen (Smanik et al., 1996 u. 1997; Arturi et al., 1998; Caillou et al., 1998; Jhiang et al., 1998; Laazar et al., 1999; Liou et al., 2000; Lin et al., 2000). In diesen Arbeiten wurden neben quantitativen RT-PCR Methoden auch Northern-Blotting, nicht quantitative PCR und Immunfärbungen angewendet.

Bei genauerer Durchsicht der Arbeiten der Gruppen, die PCR-Methoden anwendeten (Arturi et al., 1998; Laazar et al., 1999; Liou et al., 2000) zeigten sich unterschiedliche Ausprägungen der HNIS-Expression, so daß einige Gewebe ein starkes HNIS-Signal aufwiesen. In der Arbeit von Venkataraman et al. zeigten beide follikulären Karzinomgewebe sogar eine dem Normalgewebe ähnlich starke Expression. Diese unterschiedlichen Ausprägungen der HNIS-Expression beobachten wir auch in unseren Geweben.

Eine Erklärung für diese Variabilität könnte der komplexe Regulationsmechanismus der HNIS-Genexpression sein. So wird die Bildung von HNIS-RNA, HNIS-Protein und dessen Funktion durch TSH stimuliert (Carrasco et al., 1993; Saito et al., 1997; Schmutzler et al.,1998; Spitzweg et al., 1999; Dohan et al., 2000). Die Expression ist somit stark Abhängig von Serum-TSH-Spiegeln und vom TSH-Rezeptorstatus, dessen Häufigkeit und TSH-Affinität in Karzinomen herabgesetzt ist. Hemmend auf die Genexpression wirken Cytokine wie TNF, IFN und TGF, deren Expression in malignen Prozessen deutlich verändert ist (Schmutzler et al., 1998; Ajjan et al., 1998). Venkataraman beschreibt die Methylierung der Promotorregion und eine hieraus resultierende verminderte Transkription des HNIS-Gens in follikulären und papillären Karzinomen. Inwieweit diese Faktoren sich auf die von uns untersuchten Gewebe auswirken, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Ebenso ist die genaue Regulation der HNIS-Expression in gesunden und deren Dysfunktion in benignen und malignen Erkrankungen unbekannt und bedarf noch weiterer Klärung.

Die in dieser Arbeit gefundene im Vergleich zum Normalgewebe erhöhte Expression von HNIS-RNA in den papillären Karzinomen ist unerwartet, da auch hier eine Entdifferenzierung der Thyreozyten vorliegt. Neben den oben genannten Arbeitsgruppen untersuchten mehrere Gruppen nur papilläre Karzinome (Ryu et al., 1999; Arturi et al., 2000; Park et al., 2000) und fanden herabgesetzte oder fehlende HNIS-Expression. Jedoch waren auch in diesen Untersuchungen papilläre Karzinomgewebe, die in nicht-quantitativen eine deutliche Expression und in quantitativen Verfahren eine stärkere Expression als die Normalgewebe zeigten.

Unsere Ergebnisse stimmen auch mit den Ergebnissen von Saito et al. überein, die in einer Northern-Blotting Analyse eine um den Faktor 2,8 höhere HNIS Expression in den papillären Karzinomen als in den normalen Referenzgeweben fand.

Immunoblot Analysen und immunhistochemische Färbungen zeigten ebenfalls höhere Level von HNIS-Protein in Karzinomen.

Ein Grund für diese erhöhte Expression könnte neben den oben genannten Mechanismen eine erhöhte basale Aktivität der Adenylatcyclase in Schilddrüsenkarzinomen sein. Die HNIS-RNA und das HNIS-Protein werden über den TSH-Adenylatcyclase-Messenger stimuliert ((Saito et al., 1997)).

Zu bedenken ist auch, daß die als Referenzgewebe verwendeten Normalgewebe aus Operationspräparaten von benignen Schilddrüsenerkrankungen, zum Beispiel einer Struma nodosa, entnommen wurden. Diese Schilddrüsenerkrankungen werden häufig durch eine Suppressiontherapie mittels Schiddrüsenhormonpräparaten anbehandelt, so daß die TSH-Spiegel im Serum wesentlich niedriger als bei Schilddrüsen-Gesunden sind. Allerdings stehen als menschliche Referenzgewebe keine Gewebe von Gesunden zu Verfügung.

Weiterhin könnte eine vermehrte HNIS-Expression in den papillären Karzinomen durch gewünschte erhöhte TSH-Serumwerte, wie zum Beispiel vor Radiojodtherapie, bedingt sein.

Des Weiteren zeigt sich, daß vorhandene oder erhöhte RNA-Level in Thyreozyten nicht unbedingt in einer vermehrten HNIS-Protein Expression mit konsekutiv gesteigerter Jodaufnahme resultieren. In mehreren Studien wurde eine fehlende Korrelation von RNAund Proteinexpression zur Jodaufnahme gezeigt (Saito et al., 1998; Arturi et al., 1998; Ajjan et al., 1998; Venkataraman et al., 1999; Park et al., 2000). Vielmehr spielt auch die Verteilung des Proteins und dessen Ausrichtung in der Zelle und in den Geweben, dessen Aktivierungsstatus und die Zellformation im Gewebe (Kogai et al., 2000) neben anderen unbekannten Faktoren eine entscheidende Rolle für die Jodaufnahme (Arturi et al., 1998; Caillou et al., 1998; Jhiang et al., 1998, Castro et al., 1999; Park et al., 2000).

Daher liegt die Begründung für die verminderte Jodaufnahme in Schilddrüsenkarzinomen nicht alleine in der reduzierten HNIS-Expression, sondern in der komplexen Kombination von post-transkriptionellen Faktoren, Protein-targeting, unbekannten Aktivierungsfaktoren und Kofaktoren.

Die Dedifferenzierung bei erhöhter RNA-Expression in den von uns untersuchten papillären Karzinomen könnte auf der Basis einer dieser gestörten Mechanismen stattfinden.

4.3 Redifferenzierungstherapie bei drei Patienten mit follikulären Schilddrüsenkarzinomen

Bei einem Drittel der Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen findet eine Dedifferenzierung im Tumorgewebe statt (Goretzki et al., 1993). Dieses manifestiert sich in einem aggressiveren Tumorwachstum, einem Verlust der TSH-Rezeptoren und in einem gestörten Jod-Metabolismus mit Verlust der Jodaufnahmefähigkeit. Chirurgische Therapie, welche die technische Operabilität von Tumorrezidiven voraussetzt und bei diffuser Metastasierung onkologisch nicht sinnvoll ist, kann als standardisierte Behandlungsmethode nicht mehr angewendet werden. Ebenfalls entfällt die Option der Radiojodtherapie, für die eine effiziente Jodaufnahme der Thyreozyten obligat ist. Daher besteht ein Bedarf an Therapiealternativen für Patienten mit entdifferenzierten und inoperablen Tumoren.

Retinsäurederivate modulieren Proliferation und Differenzierung von malignen Geweben. Sie werden daher erfolgreich in der Therapie von Malignomen eingesetzt. Als Modell für die Redifferenzierungstherapie gilt die akute Promyelozytenleukämie, bei der eine vollständige Remission erreicht wird (Castaigne et al., 1990; Chomienne et al., 1996). Auch an soliden Tumoren der Haut, der Brust, der Lunge und des Magen-Darm Traktes sind redifferenzierende Effekte beschrieben (Hong et al., 1994; Love et al., 1994; Napoli et al., 1999).

Mehrere Beobachtungen an Schilddrüsenzellkulturen und Geweben zeigten redifferenzierende Effekte mit Wiederaufnahme des Jod-uptake (van Herle et al., 1990), gesteigerte Expression des Differenzierungsmarkers 5'-Deiodinase (Schreck et al., 1994), verminderte Expression von Dedifferenzierungsmarkern CD97 (Huang-Vu et al., 1999), positive Effekte auf die Zelladhäsion, Cytokinbildung und Extarzellulärmatrix (Havekes et al., 1999; Bassi et al., 1995; Kurebayashi et al., 2000).

Drei Patienten A, В und C, die im Rahmen einer Pilotstudie an einer Redifferenzierungstherapie mit Retinsäure teilnahmen, wurden nach Therapieende an Rezidiven operiert, so daß in diesen Geweben die HNIS-RNA Expression experimentell bestimmt werden konnte und mit prätherapeutisch entnommenen Geweben verglichen werden konnte. Die experimentellen Ergebnisse wurden mit den Daten der präund posttherapeutischen klinischen Untersuchungen verglichen.

Die Korrelation von experimentell bestimmter HNIS-Expression und den klinischen Parametern ist sehr unterschiedlich.

Patient A zeigt im posttherapeutischen Gewebe einen 4fachen Anstieg der HNIS-Expression im Vergleich zum prätherapeutischen Gewebe.

Bei diesem Patienten ist zu bedenken, daß das untersuchte posttherapeutische Gewebe durch eine Operation während laufender Retinsäuretherapie gewonnen wurde. Die gesteigerte HNIS-Expression könnte hier ein frühzeitiger Effekt der Retinsäure sein. In Experimenten mit Zellkulturen von Mamma-Karzinomen konnte eine zunehmende retinsäureinduzierte HNIS-Expressionssteigerung schon nach wenigen Stunden gezeigt werden (Kogai et al., 2000). Ein Anstieg innerhalb von Tagen des Differenzierungsmarkers 5'-Deiodinase in retinsäurestimulierten Zelllinen von Schilddrüsenkarzinomen wurde von Schreck et al. (1994) beobachtet. Ein kurzzeitiger Wirkungseintritt auf zellulärer Ebene ist also anzunehmen. Der langfristige Verlauf der HNIS-Expression wurde jedoch bisher weder in vitro noch in vivo untersucht.

Die klinischen Parameter wurden hier ebenfalls unter Therapie erhoben. In der Radiojodszintigraphie zeigt sich eine unverändert schwache Jodaufnahme. In den bildgebenden Verfahren stellt sich eine Zunahme der Tumorgröße dar. Insgesamt kommt es bei diesem Patienten zu einer Tumorprogression unter Retinsäuretherapie, ein frühzeitiger klinischer Effekt lässt sich hier nicht nachweisen. Da eine follow-up Untersuchung nicht durchgeführt wurde, ist unbekannt, ob es im weiteren Verlauf zu einer klinischen Wirkung als lang oder mittelfristigen Effekt gekommen ist.

Der Anstieg der HNIS-Expression brachte hier keine Verbesserung der klinischen Parameter. Ursächlich könnten hier durch eine Dedifferenzierung bedingte Störungen von posttranslationellen und posttransskriptionellen Faktoren, Symporteraktivität, TSH-Rezeptorstatus und anderen unbekannten Aktivierungs und Kofaktoren sein.

Retinsäure könnte hier auch einen Selektionsdruck auf therapieresistente Tumoranteile im Sinne einer klonalen Tumorselektion ausgeübt haben, so daß HNIS-RNA exprimierende Zellen eines Tumors unter weiterer Entdifferenzierung zu einer Tumorprogression führen. Tumoranteile mit einem anderen Differenzierungsgrad, die auf Retinsäuretherapie ansprechen, könnten somit nicht mehr klinisch apparent erscheinen. Ein variabler Retinsäurerezeptorstatus sowie unterschiedliche Effekte der Retinsäure an Geweben und Zellkulturen verschiedener Differenzierungsstadien konnte experimentell bereits gezeigt werden (Schmutzler et al., 1998; Schreck et al., 1994, Havekes et al., 2000). Da Retinsäure zur Redifferenzierung von Schilddrüsenkarzinomen erstmals in einer Pilotstudie eingesetzt wurde, liegen dementsprechende klinische Erfahrungen jedoch noch nicht vor. Eine Tumorselektion bei der Behandlung der akuten Promyelozytenleukämie und von Tumoren der Haut, des Halsbereichs und der Lunge, bei denen Retinsäuretherapie therapeutisch eingesetzt werden, ist bisher nicht beschrieben.

Patient B zeigt im posttherapeutischen Gewebe ein 21 fach höhere HNIS-Expression als im prätherapeutischen Gewebe. Ebenfalls findet sich eine erneute Aufnahme von Radiojod in der follow-up Untersuchung, nachdem diese in der Untersuchung vor Therapiebeginn nicht nachzuweisen war. Der Glukosemetabolismus ist in der posttherapeutischen Untersuchung abgefallen und der Tumor zeigt in den bildgebenden Verfahren keine Größenprogredienz.

Neben dem deutlichen Anstieg der HNIS-RNA ist hier posttherapeutisch eine erneute Jodaufnahme aufgetreten, eine Fähigkeit des differenzierten Schilddrüsengewebes. Hier hat also ein redifferenzierender Prozeß stattgefunden.

Zusätzlich ist es zum Stillstand der Größenprogredienz des Tumors gekommen, was als antiproliferative Wirkung der Retinsäure gewertet werden kann. Die posttherapeutische Operation sowie die follow-up Untersuchung sind 14 Monate nach Therapieende durchgeführt worden, hier kann also ein langfristiger Effekt der Redifferenzierungstherapie dokumentiert werden.

Die Erklärung für das positive Ansprechen auf die Therapie könnte in dem signifikant erhöhten Anstieg der HNIS-Expression liegen, der neben dem Einfluß auf den Glukosemetabolismus eine gute Korrelation mit dem klinischen Verlauf aufweist.

Im posttherapeutischen Gewebe von Patient C läßt sich eine wesentlich geringere HNIS-Expression als im prätherapeutischen Gewebe nachweisen. In der posttherapeutischen Untersuchung ist eine vorübergehend geringe Zunahme der Jodaufnahme festzustellen, die jedoch in der follow-up Untersuchung nicht mehr nachweisbar ist. In der Bildgebung ist eine gleichbleibende Größe des Tumors zu dokumentieren.

Hier wurden die klinische posttherapeutische Untersuchung während Therapie und die follow-up Untersuchung zwei Jahre nach Therapieende durchgeführt, das untersuchte Gewebe wurde vier Monate nach Therapieende gewonnen. Zu diesem Zeitpunkt ist ein HNIS-expressionssteigernder Effekt nicht darstellbar. Es kann vermutet werden, daß es ähnlich wie bei Patient A zu einer kurzfristigen HNIS-Expressionssteigerung gekommen ist, diese aber schon abgeklungen ist. Die Steigerung der Jodaufnahme als kurzzeitiger rediffernenzierender Effekt ist zumindest vorübergehend darstellbar.

Basierend auf der Hypothese einer kurzzeitigen Wirkung der Retinsäure wurde bei einigen Studienpatienten eine Langzeittherapie durchgeführt und hierunter persistierende redifferenzierende Effekte beobachtet (bisher unveröffentlichte Daten).

Welche Faktoren die Effektivität und Wirkungsdauer der Retinsäure beeinflussen, sind bisher unbekannt. Ebenfalls ist die genaue Wirkung der durch Retinsäurerezeptoren gesteuerten Transkriptionsfaktoren auf die Expression des HNIS-Gens nicht untersucht. Will man die Kinetik der retinsäureinduzierten HNIS-Expressionssteigerung untersuchen,

sind mit der Retinsäureapplikation zeitlich enger korrelierte RNA-Messungen notwendig.

In Summa können wir beobachten, daß es in einem Fall zu einem klinisch redifferenzierenden Effekt der Retinsäure auf den Tumor mit deutlicher Zunahme der RNA-Expression und den schilddrüsenspezifischen Eigenschaften gekommen ist. In einem zweiten Fall kommt es zu einem Anstieg der HNIS-Expression, jedoch ohne Wirkung auf den Tumorprogreß. In einem dritten Fall kommt es zu einem entgegengesetzten Verhalten von Expression und Jod-uptake, jedoch nicht zu einem redifferenzierenden Effekt im Tumor.

In die Pilotstudie wurden 50 Patienten eingeschlossen, von denen nur die hier untersuchten drei Patienten posttherapeutisch operiert werden mußten. Von den übrigen Patienten liegen dementsprechend keine Gewebe vor, so daß eine HNIS-Bestimmung nicht durchgeführt werden konnte. Aus den unterschiedlichen Verläufen der untersuchten Patienten lassen sich keine Aussagen über einen Zusammenhang von HNIS-Expression und der Wirksamkeit der Retinsäuretherapie schließen. Das bei den übrigen Patienten nach Therapie kein Operationsbedarf bestand, könnte allerdings Ausdruck eines Therapiebenefits sein.

4.4 Korrelation von experimentellen Parametern und klinischen Verlauf

Diese Arbeit zeigt, daß Retinsäuretherapie durch die Expressionsteigerung von HNIS-RNA eine Wirkung auf zellulärer Ebene in Geweben von Schilddrüsenkarzinomen haben kann.

Inwieweit die vermehrte Bildung von HNIS-RNA jedoch in Zusammenhang mit dem Joduptake steht, ist unklar. So zeigt Patient A, daß trotz vermehrter HNIS-RNA Bildung keine Änderung der Jodaufnahme resultiert. Dies wurde auch von Schmutzler et al.(1998) an stimulierten Zellkulturen beobachtet.

Wie zuvor schon beschrieben, bedeutet eine RNA Zunahme nicht immer eine vermehrte HNIS-Protein Expression. Ebenfalls bedingt eine hohe Proteinexpression nicht unbedingt eine hohe Jodaufnahme, da der Symporter in verschieden Aktivitätsformen vorliegen kann. Hierbei ist zu beachten, daß die Aktivität des Symporters vom TSH-Spiegel und dem TSH-Rezeptorstatus abhängig ist. Dessen erniedrigte Expression in Karzinomgeweben wurde bereits gezeigt (Brabant et al., 1991; Huang-Vu et al., 1992). Die Aktivität des Symporters wird auch durch dessen Ausrichtung in der Zelle und durch die Zellformation im Gewebe beeinflußt (Kogai et al. 2000). Die gestörte Gewebsmorphologie in entdifferenzierten Tumoren kann somit auch unabhängig von der Transskription und Translation die Jodaufnahme beeinflußsen.

Umgekehrt kann bei erniedrigter RNA-Expression klinisch ein Jod-Uptake imponieren (Patient C). So konnten Lin et al. (2000) in Geweben szintigraphisch diagnostizierter Metastasen, also Gewebe mit aktiver Jodaufnahme in vivo, eine HNIS-RNA Expression nicht nachweisen. Lazar et al. (1999) demostrierten eine verminderte HNIS-RNA Expression in jodaufnehmenden Tumorgeweben. Ursachen für dieses Phänomen sind bisher nicht bekannt. Aus einer weiteren Diskrepanz von RNA-Level und klinischen Jod-uptake in Metastasen, wie von einer weiteren Arbeitsgruppe (Park et al., 2000) dokumentiert, wurde gefolgert, daß HNIS-Level in Geweben nicht die therapeutische Ansprechbarkeit einer Radiojodtherapie vorhersagen können.

Auch an den Drei in dieser Arbeit untersuchten Patienten deutet sich an, daß bei unterschiedlichem Verhalten von HNIS-Expression zu klinisch messbaren Parametern HNIS-RNA-Messungen als Effizienzparameter einer Retinsäretherapie ungeeignet sind.

Wirkungen von Retinsäure auf andere Differenzierungsmarker wurden jedoch bereits beschrieben. Das Enzym 5'Deionidase wurde ebenfalls unter Retinsäurestimulation vermehrt gebildet (Schreck et al. 1994). Weitere Effekte, wie Abnahme von CD97, positive Wirkungen auf die Synthese von Adhäsionsmolekülen (ICAM) und Cytokinen, verminderte Degradierung der Extrazellulärmatrix, bestätigen die Beeinflussung der Tumorbiologie durch Retinsäure.

Ob diese Marker als Alternative zu HNIS die klinische Ansprechbarkeit einer Retinsäuretherapie vorhersagen können, sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Die klinische Wirkung von Retinsäure auf Schilddrüsenkarzinome ist jedoch deutlich. Eine Zunahme der Jodaufnahme beschreibt Grünwald et al. (1998) in 5 von 12 Fällen. In einem Case Report beschreibt er die Abnahme von histopathomorphologische Entdifferenzierungsparamtern in einem Gewebe nach Retinsäuretherapie. Koerber et al. (1999) berichtet über die Wiederaufnahme von Jod in Metastasen nach Retinsäuretherapie eines Patienten mit Redifferenzierungszeichen in der Feinnadelaspirationszytologie.

Im Rahmen der Pilotstudie, in der diese Arbeit durchgeführt wurde, zeigten 42% der Patienten einen Anstieg, und 13% einen deutlichen Anstieg des Jod-uptake in der Szintigraphie. (Simon et al., 2002).

Zur Beurteilung des Therapieeffektes wurden die untersuchten Patienten in drei Gruppen eingeteilt:

1.Responder mit angestiegender Jodaufnahme, abgefallenen TG Serumspiegel oder abnehmender Tumorgröße,

2. Stable disease mit nicht signifikanten Änderungen der Parameter;

3. Progressive disease mit abfallender Jodaufnahme, zunehmendem TG-Spiegel oder Tumorgröße.

Entsprechend dieser Einteilung zeigten sich 20% responder, 18% mit stabilen Verlauf und 62% mit weiterer Tumorprogression.

Neben molekularbiologischen Effekten ist also auch eine klinische Wirkung von Retinsäure auf Schilddrüsenkarzinome festzustellen. Ob ein Benefit für Patienten besteht, wird in einer laufenden follow-up Studie untersucht

Die geringen Nebenwirkungen und gute Tolerabilität der Retinsäuretherapie sowie die positiven Ergebnisse der Pilotstudie rechtfertigen weitere experimentelle Untersuchungen über den Mechanismus von Retinsäuren in Schilddrüsenkarzinomen sowie weitere klinische Studien mit geänderten Einschlusskriterien und könnten die Retinsäuretherapie als Altenative für fortgeschrittene und entdifferenzierte Karzinome attraktiv machen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Natrium-Jod-Symporters (HNIS) in Schilddrüsenkarzinomgeweben quantitativ untersucht. Im Rahmen einer Therapiepilotstudie wurde bei Patienten mit fortgeschrittenen, wenig differenzierten Schilddrüsenkarzinomen eine Redifferenzierungstherapie mit 13-cis-Retinsäure durchgeführt. Bei drei Patienten dieses Kollektives wurde die Expression von HNIS in prä- und posttherapeutischen follikulären Schilddrüsenkarzinomgeweben untersucht.

Die Expressionsanalyse von HNIS-RNA wurde mittels kompetetiver RT-PCR quantitativ durchgeführt, bei der ein zweites primerspezifisches Fragment als reaktionsinterner Standard dient.

Die untersuchten papillären Schilddüsenkarzinome zeigten eine höhere HNIS-Expression als die Referenznormalgewebe. Die HNIS-Expression der follikulären Karzinome war niedriger als in den Normalgeweben.

Bei zwei Studienpatienten zeigt sich ein Anstieg der HNIS-Expression nach Therapie, nur bei einem dieser Patienten findet sich jedoch auch ein positiver Effekt in den klinischen Parametern Jodaufnahme und Größenprogress. Neben einer klinischen Tumorprogression kommt es bei einem Patienten zu einer verminderten posttherapeutischen HNIS-Expression.

Wie andere Analysen über die komplexe Regulationsmechanismen der HNIS-Expression in gesunden und krankhaften Schilddrüsengeweben und Zellkulturen zeigen, sind Rückschlüsse von der RNA-Expression auf Tumorprogression und Jodaufnahme der Schilddrüse nicht zulässig. Jedoch lässt sich hier in zwei Fällen ein deutlicher Effekt der Retinsäure auf die RNA-Expression von HNIS nachweisen.

Die positiven Ergebnisse der Pilotstudie, im Rahmen derer die experimentelle Analyse durchgeführt wurde, rechtfertigen weitere klinische und experimentelle Studien, um die Retinsäuretherapie als Alternative in der Behandlung von fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinomen valide zu überprüfen.

6 Literatur

Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M, Watson PF, Ludgate M, Weetman AP. Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide msymporter gene. Clin Endocrinol 1998; 49:517-523.

Ajjan RA, Watson PF, Findlay C, Metcalfe RA, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP. The sidium iodide symporter gene and ist regulation by cytokines found in autoimmunity. J Endocrinol 1998; 158: 351-358

Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Schlumberger M, du Villard JA, Cailliou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suarez HG, Filetti S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab 1998 Apr 83 (7): 2493-96

Arturi F, Russo D, Giuffrida D, Schlumberger M. Sodium-iodide symporter (NIS) gene expression in lymph-node metastase of papillary thyroid carcinomas. Eur J Endocrinol 2000 Nov; 143(5):623-7.

Bassi V, Vitale NT, Feliciello A, De riu S, Rossi G, Fenzi G. Retinoic acid induces intercellular adhesion molecule-1 hyperexpression in human thyroid carcinoma cell lines. J Clin Endocrinol Metab 1995 80:1129-1135.

Brabant G, Maenhaut C, Kohrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, von zur Muhlen A, Vassart G, Dumont JE. Human thyrotropin receptor gene: expression in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. Mol Cell Endocrinol 1991 Nov;82(1):R7-12

Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. J Clin Endocrinol Metab 1998 Nov; 83 (11): 4102-6

Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. Biochim Biophys Acta 1993 ; 1154: 65-82

Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Roche PC, Ziesmer SC, Jhiang SM, Goellner JM, Morris JC. Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utilitie for immunocytochemistry of thyroid cancer. J Endocinol 1999 Dec; 163(3): 495-504.

Chomienne C, Fenaux P, Degos L. Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. FASEB J 1996 Jul; 10(9):1025-30

Chung HW. Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) and quantitative-competitive PCR (QC-PCR). Exp Mol Med 2001 Apr 21; 33: 85-97

Colle JH, Falanga PB, Singer m, Hevin B, Milon G, Quantitation of messenger RNA by competitive RT-PCR: a simplified read out assay. J Immunol Methods 210 (1997) 9, 175-184

Dohan I, De LA Vieja I, Carrasco I. Molecular study of the Sodium-iodide Symporte (NIS): a new field in Thyroidology. Trends Endocrinol Metab 2000 Apr; 11 (3): 99-105.

Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism.Eur J Endocrinol 1999; 141: 443-457.

Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction. Proc Natl Acad Sci USA Apr 1990, 87(7): 2725-9

Goretzki PE, Simon D, Frilling A, Witte J, Reiners C, Grussendorf M, Horster FA, Röher HD. Surgical reintervention for differentiated thyroid cancer. Br J Surg 1993 aug, 80(8): 1009-10012.

Grünwald F, Pakos E, Bender H, Menzel C, Otte R, Palmedo H, Pfeifer U. Redifferentiation therapy with retinoic acid in follicular thyroid cancer. J Nucl Med 1998, 39: 1903-1906

Grünwald F, Menzel C, Bender H, Palmedo H, Otte R, Fimmers R, Risse J, Biersack HJ. Redifferentiation therapy-induced radioiodine uptake in thyroid cancer. J Nucl Med 1998 Nov; 39 (11): 1903-6 Havekes B, Schroder Van dDer Elst JP, van der Pluijm G, Gosling BM, Romijn JA, Smit JW. Beneficial effects of retinoic acid an extracellular matrix degradation and attachment behavior in follicular thyroid caecinoma cell lines. J Endocrinol 2000 Nov; 167 (2): 229-238.

Hoang-Vu C, Dralle H, Scheumann G, Maenhaut C, Horn R, von zur Muhlen A, Brabant G. Gene expression of differentiation- and dedifferentiation markers in normal and malignant human thyroid tissues. Exp Clin Endocrinol 1992;100(1-2):51-6

Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, Krause G, Schmutzler C, Aust G, Köhrle J, Dralle H. Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma. J Clin Endocrinol. Metab 1999; 84:1104-1109.

Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, Deyoung BR, Smanik PA, McGaughy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL. An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. Endocrinology 1998Vol 139 (10): 4416-19

Köhrle J, Schmutzler c. Wie kommt Jod in die Schilddrüse? Neues zum Natrium-Iodid-Symporter (NIS). Internist 1998; 39: 560-565.

Koerber C, Schmutzler C, Rendl J, Koehle J, Griesser H, Siomin D, Reiners C. Increased I-131 uptake in local recurrence and distant metastases after second treatment with retinoid acid. Clin Nucl Med 1999 Nov; 24(11): 819-51.

Kogai T, Curcio F, Hyman S, Cornford EM, Brent GA, Hershman. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulated iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression. J Endocrinol 2000 Oct; 167 (1): 125-35

Kurebayashi J, Tanaka K, Otsuki T, Moriya T, Kunisue H, Uno M, Sonoo H. All-transretinoid acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1. J Clin Endocrinol Metab 2000 Aug; 85 (8): 2889-96 Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. J Clin Endocrinol Metab 1999 Sep; 84 (9): 3228-34.

Lin JD, Chan EC, Chao EC, Chao TC, Chen KT, Hsueh C, Ho YS, Wenig HF. Expression of sodium iodide symporter in metastatic and follicular human thyroid tissues. Ann Oncol 2000 may; 11(5):625-9

Liou M, Lin J, Chan E, Liu F, Chao T, Wenig h. Detection of mRNA of sodium iodode symporter in benign and malignant human thyroid tissues. Cancer Lett 2000 Nov 10; 160(1): 75-80

Mocharla H, Mocharla R, Hodes ME. Coupled reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) as a sensitive and rapid method for isozyme genotyping. Gene 1990 Sep. 14, 93(2): 271-5

Napoli JL. Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism. Biochem Biophys Acta 1999 Sep 22; 1440 (2-3): 139-62

O'Doherty MJ, Coakley AJ. Drug therapy alternatives in the treatment of thyroid cancer. Drugs 1998 Jun ; 55(6):801-12

Pannetier C, Delassus S, Darche S, Saucier C, Kourilsky P. Quantitative titration of nucleic acids by enzymatic amplification reactions run to saturation. Nucleic Acids Res 1993 Feb 11; 21 (3): 577-83

Park HJ, Kim JY, Park KY, Gong G, Hong SJ, Ahn IM. Expression of human sodium iodide symporter mRNA in primary and metatastatic papillary thyroid carcinomas. Thyroid 2000 Mar; 10(3): 211-7.

Porcher C, Malinge MC, Picat C, Grandchamp B. A simplified method for determination of specific DNA or RNA copy number using quantitative PCR and an automatic DNA sequenzer. Biotechniques 1992 Jul; 13(1): 106-14

Ryu KY, Senokozlieff ME; Smanik PA, Wong MG, Siperstein AE, Duh QY, Mazzaferri EL, Jhiang S. Development of reverse transcriptipn-competitive polymerase chain reaction method to quantitate the expression levels of human sodium iodide symporte. Thyroid 1999 Vol. 9 (4); 405-409.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T. Increased Expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves Thyroid Tissue. J Clin Endocrinol Metab 1997 Vol. 83 (109: 3331-3336).

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A, Onaya T. Increased expression of the sodium/iodide–symporter in papillary thyroid carcinomas. J Clin Invest 1998 Apr 1; 101 (7): 1296-300.

Schmutzler C, Brtko J, Bienert K, Köhrle J. Effects of retinoids and role of retinoic acid receptors in human thyroid carcinomas and cell lines derived therefrom. Exp Clin Endocrinol Diab 1996; 104 (4): 16-29

Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weiggl J, Köhrle J. Retinoid acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and supresses expression of functional symporter in non-transformated FRTL-5 rat thyroid cells. Biochem Biophys Res Commun 1997 240: 832-838

Schmutzler C, Köhrle J. Implications of the molecular characterization of the sodium-iodide symporter (NIS). Exp Clin Endocrinol Diab 1998; 106 (3): 1-10.

Schmutzler C, Brtko J, Winzer R, Jakobs TC, Meissner-Weiggl J, Simon D, Goreztki PE, Köhrle J. Functional retinoid and thyroid hormone rezeptors in human-thyroid –carcinoma cell lines and tissues. Int J Cancer 1998 May 4; 76 (3): 368-76

Schmutzler C, Köhrle J. Retinoic acid redifferentiatio0n therapy for thyroid cancer. Thyroid 2000 May; 10 (5): 393-406.

Schreck R, Schneiders F, Schmutzler C, Köhrle J. Retinoids stimulate type I jodothyronine 5´deiodinase activity in human follicular thyroid cell lines. J Clin Endocrinol Metab 1994 May; 79 (3): 791-798

Siebert PD, Larrick JW. Competitive PCR. Nature. 1992 Oct 8; 359 (6395): 557-8.

Simon D, Köhrle J, Schmutzler C, Mainz K, Reiners C, Röher HD. Redifferentiation therapy of differentiated thyroid carcinoma with retinoic acid: basics and first clinical results. Exp Clin Endocrinol Metab 1996; 104 (4): 13-15.

Simon D, Köhrle J, Reiners C, Boerner AR, Schmutzler C, Mainz K, Goretzki PE, Röher HD. Redifferentiation therapy with retinoids: therapeutic option for advanced follicular and papillary thyroid carcinoma. World J Surg 1998 Jun; 22 (6) :569-74

Simon D, Körber C., Krausch M., Segering J., Groth P., Görges R., Grünwald F., Müller-Gärtner H.W., Schmutzler C., Köhrle J., Röher H.D., Reiners C. Clinical Impact of retinoids therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. Eur. J. of Nucl.Med. Vol.29, No.6, June 2002

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. Biochem Biophys Res Com 1996 Vol. 226 (2): 339-345.

Van Herle AJ, Agatep Ul, Padua DN 3rd, Totanes TL, Canlapan DV, van Herle HML. Juillard GJ. Effects of 13 cis-retinoid acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA RO 82 W-1) in vitro. J Clin Endocrinol Metab 1990 Sep, 71(3): 755—3.

Venkataraman G, Yatin M, Marcinek R, Ain KB. Restoration of iodide uptake in differentiated thyroid carcinoma: relationship to human NA⁺/I⁻ Symporter gene methylation status. J Clin Endocrinol Metab 1999 Mar 84 (7): 2449-57.

Wang AM, Doyle MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction.Proc Natl Acad Sci USA 1989 Dec; 86 (24): 9717-21

Lebenslauf

| Name: | Jörg Segering |
|----------------------|---|
| Geburtsdatum: | 21. Januar 1973 |
| Geburtsort: | Essen |
| Adresse: | Tuchmachersteig 56 |
| | 45239 Essen |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch |
| Konfession: | evangelisch |
| Familienstand: | ledig |
| | |
| 1979-1983 | Grundschule Essen-Fischlaken |
| 1983-1992 | Gymnasium Essen-Werden, Abschluß mit dem Abitur 06/1992 |
| | |
| 09/1992-11/1993 | Ersatzdienst im Pflegedienst der St.Josef-Hospitale Essen-Kupferdreh |
| | |
| 03/1993-03/1994 | Begleitend zum Ersatzdienst Ausbildung zum Krankenpflegehelfer in |
| | der Krankenpflegeschule der St. Josef-Hospitale, Essen-Kupferdreh |
| | |
| 04/1994-11/2000 | Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität |
| | Düsseldorf |
| 01/2001 05/2002 | |
| 01/2001-0//2002 | Arzt im Praktikum und |
| seit 07/2002 | Assistenzarzt in der Klinik für Allgemeine Chirugie, Unfallchirugie und |
| | Gefäßchirurgie, Alfried Krupp von Bohlen und Halbach Krankenhaus, |
| | Essen |

Essen, November 02

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Simon für die Vergabe des Themas sowie seiner konsequenten und professionellen Betreuung, auch unter höchster eigener beruflicher Inanspruchnahme.

Weiterhin gilt mein Dank Frau Dr. Marianne Gyennes für die geduldige und ausführliche Einarbeitung in die experimentellen Arbeitstechniken und Versuchsmethoden im Labor

Ferner möchte ich herzlichst meinem Kommilitonen sowie langjährigen Freund Markus Krausch danken. Durch sein unbeschwertes und humorvolles Wesen wurde die teilweise zähe und frustrierende Arbeit im Labor doch noch jedes Mal zu einem erfreulichen Ereignis.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester, die es mir ermöglicht haben, mein Studium und auch diese Dissertation erfolgreich zu beenden.