

Aus der Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
em. Direktor: Prof. Dr. H.-D. Röher

**Analyse der differentiellen Genexpression papillärer und follikulärer
Schilddrüsenkarzinome in Bezug auf das Metastasierungsverhalten
mittels Differential Display**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Friederike Buchbender

(2005)

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referent: Priv.-Doz. Dr. Schulte
Korreferent: Prof. Dr. Böcking

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	5
1.1.	Anatomie der Schilddrüse und Einteilung der Schilddrüsenerkrankungen	5
1.1.1.	Anatomie und Aufbau der Schilddrüse	5
1.1.2.	Übersicht der Schilddrüsenerkrankungen	6
1.1.3.	Tumoren der Schilddrüse	6
1.1.3.1.	Follikuläre und papilläre Schilddrüsenkarzinome	7
1.2.	Metastasierung und Angiogenese	10
1.2.1.	Antiangiogenetische Therapieansätze	13
1.3.	Metastasierung und Lymphangiogenese	14
1.4.	Ziele dieser Arbeit und Verfahren	16
2.	Material und Methoden	17
2.1.	Material	17
2.1.1.	Chemikalien	17
2.1.2.	Restriktionsendonukleasen	18
2.1.3.	DNA-modifizierende Enzyme	18
2.1.4.	Reagenzienansätze-„Kits“	18
2.1.5.	Sonstige Enzyme	19
2.1.6.	Gewebeproben und Zellreihen	19
2.1.7.	Fotochemikalien und Filtermembranen	20
2.2.	Methoden	20
2.2.1.	Zellkultur	20
2.2.2.	RNA-Isolierung aus Schilddrüsenzellen	20
2.2.3.	RNA-Isolierung aus Schilddrüsengewebe	21
2.2.4.	Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese	21
2.2.5.	Reverse Transkription der RNA	22
2.2.6.	Amplifikation der cDNA	23
2.2.7.	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	24
2.2.8.	Silberfärbung und Analyse der Banden	25
2.2.9.	Reamplifikation der DNA-Fragmente	26
2.2.10.	Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Transformation in E-coli	26
2.2.11.	Plasmid-DNA-Präparation und Verdau	27
2.2.12.	Plasmid-Gel-Extraktion	28

2.2.13.	DNA-Sequenzierung	28
2.2.14.	Homologiesuche mit BLAST ^R	29
2.2.15.	Northern-Blot-Hybridisierung	30
2.2.15.1.	Formaldehyd-Gel-Elektrophorese	30
2.2.15.2.	Transfer der RNA auf immobilisierende Nylonmembran	30
2.2.15.3.	Markierung von DNA-Sonden mittels PCR	31
2.2.15.4.	Hybridisierung mit bekannten DNA-Sonden	32
3.	Ergebnisse	34
3.1.	RNA-Isolierung aus den Gewebeproben	34
3.2.	cDNA-Synthese	35
3.3.	PCR und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	36
3.4.	Reamplifikation, Klonierung und Plasmid DNA-Präparation	41
3.5.	Homologiesuche mit BLAST ^R	42
3.5.1.	Ergebnisse mit Entsprechungen auf mRNA-Ebene	42
3.5.2.	Ergebnisse mit Entsprechungen auf DNA-Ebene	46
3.6.	Northern-Blot-Hybridisierung	56
4.	Diskussion	57
5.	Verzeichnis der Abkürzungen	63
6.	Literaturverzeichnis	64
7.	Lebenslauf	71
8.	Danksagung	72
	Zusammenfassung	73

1. Einleitung

1.1. Anatomie der Schilddrüse und Einteilung der Schilddrüsenerkrankungen

1.1.1. Anatomie und Aufbau der Schilddrüse

Die Schilddrüse ist ein U-förmiges Organ, bestehend aus zwei ovalen scheibenförmigen Drüsenlappen, Lobus dexter und sinister, und dem quergestellten im Wachstum zurückgebliebenen Isthmus, der sie miteinander verbindet. Vom Isthmus verläuft häufig ein schmaler Fortsatz, der Lobus pyramidalis, ein Rest des Ductus thyreoglossus, nach kranial. Am Hals unterhalb des Kehlkopfes liegend beträgt das Gesamtgewicht der rotbraunen, adulten Drüse im Durchschnitt 20-25g. Die doppelte Organkapsel besteht aus der Capsula interna und der äußeren Capsula fibrosa. Die äußere Kapsel ist fest mit Trachea und Kehlkopf verbunden, mit dem übrigen umgebenden Gewebe steht sie in lockerer Verbindung. Innerhalb der äußeren Kapsel liegen die vier Epithelkörperchen (Schiebler/Schmidt/Zilles, 1999).

Als endokrines Organ greift die Schilddrüse mit ihren Hormonen weitreichend in den Stoffwechsel ein und übernimmt dabei eine entscheidende Rolle für Differenzierung, Wachstum und Metabolismus (Yen PM, 2001).

Die Schilddrüsenfollikel bilden die Funktionseinheiten der Schilddrüse (Nilsson M, 2001). Sie bestehen aus einem einschichtigen lysosomenreichen Epithel, das je nach Funktionszustand der Epithelzellen, der Follikelzellen, als plattes Epithel im inaktiven, sowie als kubisches bis zylindrisches Epithel im resorbierenden oder sezernierenden Zustand auftritt. Das Epithel ist mit einem dichten Mikrovillibesatz versehen und liegt einer Basalmembran auf. Nach innen umgrenzt das Epithel einen mit Kolloid gefüllten Raum, in dem Thyreoglobulin, ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 660000 Dalton, gespeichert wird. Die jodhaltigen Hormone der Schilddrüse, Thyroxin und Trijodthyronin, sind an das Thyreoglobulin gebunden (Böcker/Denk/Heitz, 2001).

1.1.2. Übersicht der Schilddrüsenerkrankungen

Die Erkrankungen der Schilddrüse lassen sich grob in Entzündungen, Funktionsstörungen und Tumoren unterteilen (Böcker/Denk/Heitz, 2001).

1.1.3. Tumoren der Schilddrüse

Die Tumoren der Schilddrüse unterteilen sich in benigne und maligne Formen (Onoda N, 1998).

Als malignomverdächtig müssen bei der Untersuchung alle echoarmen oder echoinhomogenen Areale in der Sonografie und jeder kalte Knoten in der Szintigrafie gelten. (Erbar P, 2001).

Wegen der unspezifischen bildgebenden Diagnostik gilt die Feinnadelpunktion als Methode der Wahl, um eine Unterscheidung zwischen malignen und benignen Neoplasien vornehmen zu können (Charib H, 1994).

Zu den benignen Formen werden uni- und multifokale Autonomien gezählt, zu denen follikuläre und hyalinisierend trabekuläre Adenome, Adenolipome, Teratome, Fibrome, Hämangiome und Granulosazelltumoren zählen (Böcker/Denk/Heitz, 2001).

Schilddrüsenkarzinome gehören mit insgesamt ca. 1% der Malignome zu den selteneren Tumoren, stellen allerdings gleichzeitig die häufigsten endokrinen Neoplasien mit einer Inzidenz von 20 Fällen/Mio./Jahr dar. Histologisch werden sie in papilläre, follikuläre, medulläre und anaplastische Typen unterteilt (Böcker/Denk/Heitz, 2001).

Im Kindesalter ist das Schilddrüsenkarzinom mit 5 bis 10 Fällen/Mio./Jahr eine Rarität, allerdings steigt die Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter. Sie liegt für Männer unter 65 Jahren bei 20/Mio./Jahr, bei Männern über 65 bei 71/Mio./Jahr. Die entsprechenden Daten für Frauen geben 60/Mio./Jahr für unter 65 Jährige an, für Frauen über 65 Jahren 94/Mio./Jahr (Reiners C, 1999). Die Mortalität des Schilddrüsenkarzinoms sinkt in den letzten Jahrzehnten und liegt bei Männern zwischen 2 und 12, bei Frauen zwischen 4 und 28/Mio./Jahr (Franceschi S. 1993).

Schilddrüsenneoplasien zeigen zu Beginn der Erkrankung oft nur wenige Symptome. Zu den Frühsymptomen können Knotenneubildungen innerhalb bestehender Strumen, Wachstum bekannter Knoten oder Lymphknotenschwellungen im Kopf-Hals-Bereich zählen. Symptome wie Schmerzen, obere Einfluß-Stauungen, Ulzerationen nach außen, Rekurrenzpareesen, Horner-Syndrom und Manifestationen von Fernmetastasen kennzeichnen demgegenüber meist ein weit fortgeschrittenes Tumorwachstum. Die Stoffwechsellaage bleibt während der Erkrankung meist euthyreot, erst im fortgeschrittenen Stadium werden vereinzelt Hyperthyreosen manifest (Papke K, 1999).

Als gesicherte Risikofaktoren für die Entwicklung von malignen Neoplasien der Schilddrüse gelten Bestrahlungen im Hals- und Nackenbereich. Die Latenz zwischen Exposition und Diagnose des Schilddrüsenkarzinoms liegt zwischen 5 und 30 Jahren (Reiners C, et al. 2000). Zusätzlich wird eine chronische TSH-Stimulierung als Risikofaktor für die Entwicklung des Schilddrüsenkarzinoms diskutiert (Memon A, 2002).

Die Iodversorgung der Bevölkerung steht grundsätzlich in keiner Beziehung zur Inzidenz der Schilddrüsenkarzinome, jedoch beeinflusst die Jodaufnahme die histologische Verteilung der Schilddrüsenneoplasien. Mit zunehmender Jodaufnahme überwiegen die papillären die etwas aggressiveren follikulären Karzinome bei gleichzeitigem Rückgang der anaplastischen Karzinome (Feldt-Rasmussen U, 2001).

1.1.3.1.Follikuläre und papilläre Schilddrüsenkarzinome

Unter den differenzierten Karzinomen der Schilddrüse faßt man die von den Follikelzellen ausgehenden papillären und follikulären Karzinome zusammen, die insgesamt eine sehr gute Prognose haben (Schlumberger MJ, 1998).

Das papilläre Karzinom ist das häufigste Malignom der Schilddrüse, mit einem Anteil von insgesamt 85% (Farid NR, 1994). Es läßt sich histologisch in einen gekapselten, einen grob invasiven und einen multifokal wachsenden Tumor unterteilen. Der Altersgipfel der Erstdiagnose liegt zwischen dem 35. und 60. Lebensjahr, die 10-Jahres-Überlebensrate ist mit 85-90% außerordentlich günstig. Neben den oben genannten Risikofaktoren wird für das papilläre Karzinom auch eine familiäre Komponente diskutiert, die für bis zu 6% der Fälle verantwortlich sein könnte (Austoni M, 1998). Papilläre Karzinome metastasieren

vorwiegend lymphogen, wobei die Mortalitätsrate nicht wesentlich negativ von einem Lymphknotenbefall beeinflusst wird. Prognostisch ungünstig ist ein Lymphknotenbefall in Bezug auf eine Fernmetastasierung der papillären Schilddrüsenkarzinome im Stadium pT4. Lymphknotenmetastasen finden sich bei papillären Karzinomen der Stadien pT1 bis pT3 in rund 11% und des Stadiums pT4 in rund 50% der Fälle. Sie sind bei Patienten unter 40 Jahren (23%) deutlich häufiger als bei Patienten, die das 40. Lebensjahr überschritten haben (13%) (Farahati J, et al. 2000). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose haben bereits 28% der Patienten Fernmetastasen, wobei diese vor allem in Lunge und Skelett lokalisiert sind.

Das follikuläre Karzinom ist mit 15% das zweithäufigste Schilddrüsenmalignom, das vor allem zwischen dem 40. und 50. Lebensjahr diagnostiziert wird. Es imponiert klinisch häufig als solider, bindegewebig gekapselter Tumor, der sich weiter in hoch-, mittel- und gering differenzierte Tumoren unterteilen lässt. Die Überlebensrate ist mit 75-80% etwas schlechter als beim papillären Karzinom. Die Metastasierung der follikulären Schilddrüsenkarzinome erfolgt hauptsächlich hämatogen in Lunge und Skelett, in ca. 30% der Fälle sind bei Erstdiagnose bereits Fernmetastasen vorhanden (Reiners C, 2003).

Ein wichtiger prognostischer Parameter des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms ist das Alter der Patienten bei Diagnosestellung. Das Risiko für ein Rezidiv und tumorbedingte Mortalität steigt mit dem Lebensalter des Patienten. So haben Patienten mit einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom im Alter von 40 bis 60 Jahren eine kumulative 10-Jahres-Überlebensrate von ca. 92%, Patienten ab 60 Jahren hingegen eine kumulative 10-Jahres-Überlebensrate von 82%.

Die unterschiedliche Prognose in Abhängigkeit vom histologischen Typ wurde oben bereits erläutert.

Weitere entscheidende prognostische Faktoren stellen die Größe des Primärtumors und das Wachstumsverhalten beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom dar. Bei Mikrokarzinomen (pT₁N₀M₀) mit einem Durchmesser von weniger als 1 cm haben die Patienten eine 10 Jahres-Überlebensrate von annähernd 100%, wobei die 10-Jahres-Überlebensrate von Patienten im pT4-Stadium mit organüberschreitendem Wachstum bei 60-80% liegt. Multifokale Karzinome sind häufiger mit regionalen Lymphknotenmetastasen assoziiert.

Einen ungünstigen Verlauf zeigen Patienten mit Fernmetastasierungen zum Diagnosezeitpunkt. Bei Patienten im M1-Stadium liegt die kumulative 10-Jahres-Überlebensrate bei knapp 70%, bei Patienten im M0-Stadium bei über 95%. Patienten mit

Lungenmetastasen weisen in der Regel günstigere Verläufe auf als Patienten mit Knochenmetastasen (Reiners C, 2003).

Die Therapie der Wahl bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist die Thyreoidektomie mit systematischer Ausräumung des zentralen Lymphknotenkompartiments. Postoperativ kann eine Radiojodtherapie sowie eine lebenslange Suppressionstherapie mit Schilddrüsenhormonen erforderlich sein (Mann K, 2002).

Die Einteilung maligner Schilddrüsentumoren nach der 6.Auflage der TNM-Klassifikation der International Union against Cancer; Stand 2002:

T	Primärtumor
T0	Kein nachweisbarer Primärtumor
T1	Tumor ≤ 2 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse
T2	Tumor >2 cm und ≤ 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse
T3	Tumor > 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse oder Tumor mit minimaler extrathyreoidaler Ausbreitung
T4a	Tumor mit Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel und Invasion einer oder mehrerer der folgenden Strukturen: subkutanes Weichgewebe, Larynx, Trachea, Ösophagus, N. recurrens
T4b	Tumor infiltriert prävertebrale Faszie, mediastinale Gefäße oder umschließt die A. carotis
m	Multifokale Tumoren, gleich welcher Histologie, sollen mit (m) gekennzeichnet werden, wobei die höchste T-Kategorie die Klassifikation bestimmt
N	Regionäre Lymphknoten
NX	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
N1a	Metastasen in Lymphknoten des Level VI (prätracheal, paratracheal, eingeschlossen prälaryngeale und Delphi-Lymphknoten)
N1b	Metastasen in anderen unilateralen, bilateralen oder kontralateralen zervikalen oder oberen mediastinalen Lymphknoten
M	Fernmetastasen
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Regionäre Lymphknoten der Schilddrüse sind die zervikalen und oberen mediastinalen Lymphknoten. Der Status pN0 bezieht eine histologische Untersuchung von mindestens 6 Lymphknoten eines selektiven Neck-dissection-Präparates mit ein (Reiners C, 2003).

1.2. Metastasierung und Angiogenese

Metastasierung (griech. „metastasis“ = Wegzug) beschreibt die Verschleppung neoplastischer Zellen auf dem Blut- und Lymphweg durch den Körper mit der Ausbildung eines oder mehrerer neuer vom Primärtumor entfernter Herde (Erbar P, 2001).

Die Metastasierung eines Tumors in benachbarte oder entfernte Organe besteht aus einer Kaskade mehrerer Schritte, die Tumorzellen erfolgreich absolvieren müssen (Fidler IJ, 1982; Zetter BR, 1990). Zu Beginn müssen sich einzelne Tumorzellen vom Primärtumor trennen und in das Blut- oder Lymphgefäßsystem eindringen. Bei der dann folgenden Verschleppung über die Gefäße ist die Resistenz der Tumorzellen gegenüber immunologischen Übergriffen von entscheidender Bedeutung. Die Bildung eines vom Primärtumor entfernten metastatischen Herdes erfolgt schließlich nach der Einnistung und Vermehrung der verschleppten Zellen in einem entfernten Gewebe (Yen PM, 2001).

Experimentelle Daten, die in Tierversuchen oder auch in vitro erhoben worden sind, haben gezeigt, daß sowohl der oben skizzierte Metastasierungsprozeß als auch ein Wachstum des Primärtumors ohne Neovaskularisation nicht möglich ist (Bunone G, 1999). Die Neubildung von Gefäßen innerhalb des Tumors und in dem ihn umgebenden Gewebe wird durch bioaktive Substanzen angeregt, die vom Tumor selbst produziert werden. Die Mehrzahl dieser Stoffe sind Proteine, insbesondere Wachstumsfaktoren, die ihre Wirkung über die Induktion der Proliferation in den Endothelzellen entfalten (Ishiwata I, 1999).

Die Angiogenese ist in physiologischen Bereichen ein elementarer Prozeß, der für die Heilung von Wunden, bei Entzündungen, Regeneration, Entwicklung und Embryogenese notwendig ist. Dabei beruhen diese Vorgänge auf dem Vermögen, daß das Wachstum von Blutgefäßen innerhalb kürzester Zeit induziert oder beendet werden kann (Folkman J, 1995).

Der Prozeß der Angiogenese setzt sich aus mehreren Schritten zusammen. Der Ablauf beginnt mit dem Zusammenfall der endothelialen Matrix der Blutgefäße, der Vermehrung der Endothelzellen und der Migration der Endothelzellen. Der Wiederaufbau der extrazellulären Basis mit nachfolgender Proliferation, die Bildung tubulärer Strukturen der Endothelzellen,

sowie eine Rekrutierung umgebender Strukturen ist anschließend notwendig, um die neuen Gefäße erhalten zu können. Zur Etablierung eines funktionierenden Netzwerkes bedarf es schließlich noch der Anastomosierung mit bereits vorhandenen oder ebenfalls neugebildeten Gefäßen und dem Aufbau einer Basalmembran (Ishiwata T, 1998; Ramsden JD, 2000).

Erst im Stadium des unkontrollierten Wachstums von Blutgefäßen erreicht die Angiogenese ein pathologisches Stadium, in dem auch neoplastische oder nicht-neoplastische Veränderungen im Körper in ihrer Ausbreitung unterstützt werden. Diese Beobachtung stützt das Konzept, das die Metastasierung als Folge einer über das physiologische Maß hinaus gesteigerten Angiogenese versteht. Diesem Prozeß liegt eine Aktivierung der ruhenden Endothelzellen durch chemische Signale der Tumorzellen zugrunde (Folkman J, 1971).

Für den Wechsel der Endothelzellen von einem ruhenden in einen hoch aktivierten Zustand bedarf es der Veränderung des lokalen Gleichgewichts zwischen positiven und negativen Regulatoren der Angiogenese (Dameron KM, 1994).

Für die Verschiebung dieses Gleichgewichts kommen mehrere Mechanismen in Frage. Tumorzellen können zum einen positive Regulatoren der Angiogenese überexprimieren, angiogenetische Proteine aus dem Extrazellulärraum mobilisieren oder sie können Makrophagen rekrutieren, die ihre eigenen angiogenetischen Proteine produzieren. Auch die Veränderung des Gleichgewichts durch eine Kombination dieser Mechanismen wird beobachtet (Dameron KM, 1994).

Bisher sind 12 Proteine bekannt, die die Angiogenese stimulieren. Zu diesen angiogenetischen Proteinen zählen Vascular Endothelial Growth Factor, Fibroblast Growth Factor, Angiopoietin-1 und -2, Angiogenin, Hepatocyte Growth Factor, Nitric Oxide, Interleukin-8, Platelet Derived Growth Factor, Placental Growth Factor, Proliferin und Endothelin (Ramsden JD, 2000).

Der derzeitige Forschungsstand mißt dabei dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und dem Fibroblast Growth Factor (FGF) die größte Bedeutung für Tumorwachstum und Metastasierung bei. Für den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), der von Endothelzellen gebildet in vivo die Angiogenese vorantreibt und für eine erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit sorgt (Ferrara N, 1992), ist nachgewiesen worden, daß er eine wichtige Rolle bei Schilddrüsenneoplasien spielt (Soh E, 1997). So wird bei kultivierten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien mehr VEGF abgegeben, als dies bei normalen Schilddrüsenzellen gemessen werden konnte. Diese in vitro gemessene Expression von VEGF korreliert darüber hinaus mit der Aggressivität der Tumoren in vivo, so zeigten die hochmalignen

anaplastischen Schilddrüsenkarzinome die höchste Expression von VEGF (Viglietto G, 1995).

Der Fibroblast Growth Factor ist ebenfalls ein potenter Stimulator der Angiogenese, der von Endothelzellen gebildet wird (Ramsden JD, 2000).

Die Überexpression eines angiogenetischen Faktors, wie vorausgehend dargestellt, ist dabei allein nicht ausreichend, um eine pathologisch erhöhte Gefäßneubildung zu erreichen, genauso wichtig ist dabei die verminderte Expression von den Faktoren, die die Angiogenese inhibieren (Dameron KM, 1994). Die Gruppe der Inhibitoren, zu denen Thrombospondin-1, Angiostatin und Endostatin gehören, hat im physiologischen Rahmen die Aufgabe, das Gefäßendothel vor mitotischen Stimuli zu schützen (Ramsden JD, 2000).

Thrombospondin-1 ist ein Inhibitor des endothelialen Zellwachstums, der im Schilddrüsenstroma zu finden ist und von den follikulären Zellen exprimiert wird (Prabakaran D, 1993). Bei Neoplasien der Schilddrüse wird eine Reduktion der mRNA von Thrombospondin und von dem Protein selbst beobachtet, die bei follikulären und undifferenzierten Tumoren am signifikantesten ist (Bunone G, 1999).

Endostatin ist ein 20 kDa Fragment des Kollagens XVIII, von dem experimentell nachgewiesen werden konnte, daß es die Proliferation von Endothelzellen und die Tumor-Angiogenese hemmt (Jin X, 2001).

Angiostatin, ein Fragment des Plasminogens, ist ein stark inhibitorisch wirkender Regulator, der die Neubildung von Blutgefäßen und damit auch von Tumoren und Metastasen hemmt (Sim K, 1997).

Vom klinischen Standpunkt her ist die Neovaskularisation die Basis für jeden Tumor, mittels der Wachstum über eine Größe von 2 mm Durchmesser (Folkman, 1971) und Metastasierung überhaupt ermöglicht wird (Risau W, 1995).

Die gesamten Kenntnisse über den Zusammenhang von Metastasierung und Angiogenese ermöglichen die Entwicklung von besseren diagnostischen Verfahren und Therapien für die Behandlung von Neoplasien. So kann anhand einer Biopsie das Stadium der Angiogenese begutachtet und daraus das Risiko eines Wiederauftretens oder einer erneuten Metastasierung besser abgeschätzt werden. Die positive Korrelation zwischen tumor-bedingter Neovaskularisation und dem Risiko von Metastasierung, einem Tumorrezidiv und Tumormortalität gibt einer aus einer Biopsie gefällten Prognose hohe Aussagekraft (Folkman J, 1995; Bunone G, 1999).

1.2.1. Antiangiogenetische Therapieansätze

Eine Antiangiogenetische Therapie beruht vor allem auf der Grundlage, daß die Hemmung der Angiogenese Tumorwachstum und Metastasierung verhindern kann. Angriffspunkte dieser Therapie bilden dabei die aktivierten und proliferierenden Endothelzellen (Folkman J, 1995).

Hervorzuheben an diesem neuen Therapieansatz ist vor allem die geringe Rate an zu erwartenden Nebenwirkungen. Der Grund hierfür liegt besonders darin, daß die Angiogenese eines gesunden Erwachsenen nur in geringem Maße abläuft, so daß ein Eingreifen in diesen Regelkreis ohne größere Auswirkungen auf den Organismus bleibt (Ramsden JD, 2000).

Die Behandlungsdauer einer Antiangiogenetischen Therapie beträgt mehrere Monate bis hin zu Jahren. Die deutlich längere Therapiedauer im Vergleich zu einer zytotoxischen Therapie, bei der die Zellen abgetötet werden, beruht auf dem antiangiogenetischen Wirkprinzip. Dabei wird die Neubildung von Gefäßen gehemmt, indem Proliferation und Migration von Endothelzellen inhibiert werden.

Resistenzen gegen die Inhibitoren der Angiogenese konnten bisher auch bei Langzeitanwendungen nicht beobachtet werden (Folkman J, 1995).

Zur Zeit werden in der Tumorthherapie neun Inhibitoren der Angiogenese erprobt. Geplant ist, sie für die Behandlung eines breiten Spektrums von soliden Tumoren, unter anderem Brust- und Prostatakarzinomen, einzusetzen (Folkman J, 1995).

Zu diesen inhibitorischen Medikamenten zählt das TNP-470, ein synthetisches Analog zu Fumagillin Plättchenfaktor 4 (Kahn J, 1993), Carboxyaminotrimazol (Kohn EC, 1994), BB-94 und BB-2516, Metalloproteinase-Inhibitoren, Sulfated Polysaccharide Teocogalan (DS-4152), Thalidomid, Interleukin-12, Linomid (Heinzerling LM, 2001).

1.3. Metastasierung und Lymphangiogenese

Das Lymph- und Blutgefäßsystem, die in ihrer Struktur zwei unterschiedliche Systeme darstellen, arbeiten bei der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase als Einheit zusammen. Das Lymphgefäßsystem reguliert dabei den Flüssigkeitsanteil des Gewebes, fördert den interstitiellen Proteintransport und unterstützt immunologische Funktionen.

Neben seinen physiologischen Funktionen dient das Lymphsystem auch als primärer Metastasierungsweg vieler Arten von Karzinomen. Dabei ist das Ausmaß der Streuung über die Lymphgefäße zu regionalen Lymphknoten ein Hauptkriterium für die Aggressivität der meisten malignen Tumoren des Menschen (Swartz MA, 2001).

Bevor ein Tumor über das Lymphgefäßsystem metastasieren kann, müssen sich einzelne maligne Zellen aus dem Zellverband lösen und in die Lymphbahn eindringen. Dabei war lange nicht klar, ob bereits bestehende Lymphgefäße in den Tumor einwachsen und so eine Metastasierung möglich machen, oder innerhalb des Tumors selbst eine Neubildung von Lymphgefäßen stattfindet (Nigel JP, 2002). Diesen Prozeß im Detail zu verstehen und die ihn induzierenden und beschleunigenden Moleküle zu kennen, bildet die zentrale Grundlage für die Entwicklung neuer effizienterer Therapien (Stacker SA, 2001). Grundsätzlich besteht noch großer Forschungsbedarf, um die Interaktionen von Tumorzellen und Lymphsystem so zu klären, daß ein Grundmuster für die Metastasierung via des Lymphsystems entwickelt werden kann, ähnlich wie dies bei der hämatogenen Metastasierung bereits gelungen ist (Swartz MA, 2001).

Das bisherige Interesse fokussiert sich vor allem auf zwei Glykoproteine, die beiden Wachstumsfaktoren VEGF-C und VEGF-D. Der Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) war der erste Wachstumsfaktor, für den nachgewiesen werden konnte, daß er neben der Angiogenese auch die Lymphangiogenese stimuliert. Die Stimulation erfolgt über die Aktivierung von VEGFR-3, einem Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der bei Erwachsenen hauptsächlich in lymphatischem Gewebe ausgebildet wird (Stacker SA, 2001).

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit ist besonders interessant, daß für das überwiegend lymphogen metastasierende papilläre Schilddrüsenkarzinom eine signifikant erhöhte Gen-Expression für VEGF-C im Vergleich zum follikulären Schilddrüsenkarzinom gezeigt werden konnte. Dabei war die Expression der VEGF-C mRNA sowohl im karzinomatös veränderten, als auch im normalen Schilddrüsenewebe der Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinom deutlich erhöht. Diese Beobachtungen weisen besonders für

das papilläre Karzinom auf eine durch den Wachstumsfaktor VEGF-C induzierte Proliferation lymphatischer Endothelzellen mit nachfolgender lymphogener Metastasierung hin (Fellmer PT, 1999).

Die Bedeutung von VEGF-C für eine extensive Tumor-Lymphangiogenese und eine Metastasierung in die regionalen Lymphknoten konnte inzwischen auch für Brust-, Lungen-, Magen- und weitere Karzinome gezeigt werden. Im Falle von Brust-, Kolorektal-, Magen-, Schilddrüsen-, Lungen- und Prostatakarzinom konnte zudem eine Korrelation zwischen der Expression von VEGF-C und dem Ausmaß der Lymphknotenaffektion nachgewiesen werden (Swartz MA, 2001; Nigel JP, 2002).

VEGF-D, ein weiteres Glykoprotein der VEGF-Familie, wird auch als c-fos Induced Growth Factor (FIGF) bezeichnet. Es aktiviert ebenfalls den Rezeptor VEGFR-3, von dem angenommen wird, daß er die Lymphangiogenese induziert. An Mäusen konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression von VEGF-D, das in seiner Struktur VEGF-C sehr ähnlich ist, in endothelialen Tumoren zur Neubildung von intratumoralen Lymphgefäßen führt und dadurch wiederum Metastasierungsprozesse in regionale Lymphknoten unterstützt werden.

Wichtig im Hinblick auf verbesserte Therapiemöglichkeiten von metastasierenden Tumorerkrankungen ist in diesem Zusammenhang die Entdeckung, daß die Anzahl von Lymphknotenmetastasen in VEGF-D-produzierenden Tumoren durch neutralisierende Antikörper, anti-VEGF-D, gesenkt werden konnte (Stacker SA, 2001). Darüber hinaus konnte im Tierversuch eine effiziente Blockade der Signale von VEGF-C und VEGF-D durch eine lösliche Form von VEGFR-3 erreicht werden. Die so behandelten Mäuse zeigten nicht nur eine Blockade der Neubildung von Lymphgefäßen, sondern auch eine Rückbildung bereits vorhandener Lymphbahnen. An den Blutgefäßen zeigten die Versuchstiere keine Veränderungen (Mäkinen T, 2001).

VEGF-C und VEGF-D sind somit nicht nur regulierende Proteine für das Wachstum von Lymphgefäßen, sondern in Abhängigkeit ihrer Expression auch verantwortlich für das Ausmaß der lymphogenen Metastasierung maligner Tumoren, die die Prognose vieler maligner Erkrankungen entscheidend beeinflusst. Die Weiterentwicklung einer Blockade der Tumor-Lymphangiogenese und der intralymphatischen Invasion könnte somit die therapeutischen Bedingungen, vor allem auch für das papilläre Schilddrüsenkarzinom, verbessern (Nigel JP, 2002).

1.4. Ziele dieser Arbeit und Verfahren

Das Ziel dieser Arbeit ist es, unter Anwendung der Methode des Differential Displays, die bekannten unterschiedlichen Metastasierungswege der follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinome, vorwiegend hämatogen bzw. lymphogen, hinsichtlich ihrer Genexpression zu untersuchen.

Dabei sollen die Genprodukte identifiziert werden, die mit dem Tumorverhalten korrelieren. Prinzipiell werden drei Ergebnisgruppen erwartet. Aufgrund der bereits erfolgten Forschungsarbeiten werden voraussichtlich zu einem großen Teil bereits bekannte Gene gefunden, die sich mithilfe der entsprechenden Literatur genauen Tumorcharakteristika zuordnen lassen. Eine weitere Gruppe von Genen werden erwartungsgemäß bereits bekannt sein, sich bisher jedoch keiner speziellen Funktion zuordnen lassen. Darüber hinaus gilt das Interesse aber vor allem den Genen, die bisher unbekannt sind. Diese sollen dann in ihrem Expressionsverhalten und durch Sequenzierung charakterisiert werden. Hierbei wird erwartet, daß unter den bisher unbekannt Genen zumindest einige einen Rückschluß auf die Unterschiede der follikulären und papillären Metastasierungswege zulassen. In letzter Konsequenz steht das Ziel, durch ein besseres Verständnis der den follikulären und papillären Metastasierungswegen zugrunde liegenden Prozesse eine frühere Diagnosemöglichkeit, eine effektivere Behandlung und eine bessere Überlebensrate erreichen zu können.

Der Vergleich der Genexpression von pathologisch veränderten Zellen, die Metastasierungsprozesse erst ermöglichen, bildet die entscheidende Grundlage, um den Prozeß der Metastasierung zu verstehen (Zhang M, 1998). Für dieses Anliegen ist die Methode des Differential Display, die 1992 von Liang und Pardee (Liang P, Pardee AB, 1992) entwickelt wurde, zentrales Untersuchungsverfahren dieser Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Fa. Sigma (München):

Ammoniumpersulfat (A-9164), Ampicillin (A-0166), Ethidium Bromid 10mg/ml (E-1510), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (E-5134), Lysozym (L-7651), Gel-Loading-Solution (G-2526), Glycerin (G-0750), Glycerol (G-8778), Hydrochlorid (Trizma) (T-0944), Mineral Oil (M-8662), MOPS(3-[N-Morpholino]propanschwefelsäure) (M-9381), Trichloressigsäure (T-6399), Triton-x-100 (T-8787)

Fa. Serva (Heidelberg):

Agarose (Elektrophorese Grad) (11404.04), Bromophenolblau (1537502), Coomassie Blau R250 (17525.01), Formamid (21710.01), SDS 10%Lösung (20766.02), Trizma-Base{Tris(Hydroxymethyl)aminomethan] (37186.02)

Fa. Roth (Karlsruhe):

Maleinsäure (3538.1), Natriumhydrogencarbonat (6885.1), 1xTBE (3061.2), tri-Natriumcitrat-Dihydrat (3580.1)

Fa. Merck (Darmstadt):

Magermilchpulver, Natriumacetat (10.628.100), NaCl (6406)

Fa. Biorad (Richmond, CA, USA): 40% Acrylamid/Bis-Acrylamid Solution 19:1 ratio (161-0144), Tetramethylethylendiamin (TEMED) (161-0800)

Fa. Qiagen (Hilden):

Taq-DNA-Polymerase-Puffer 10x (Tris-Cl, KCl, (NH₄)₂SO₄, 15mM MgCl₂; pH8,7) (201203)

Fa. Promega (Heidelberg):

dATP 100mM (U1205), dTTP 100mM (U1235), dUTP 100mM (U1191), dGTP 100mM (U1215)

Fa. Invitrogen (San Diego, USA):

5x First-Strand-Buffer (250mM Tris-HCl (pH 8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,1M DTT) (11146-024)

Fa.Boehringer (Mannheim):

Puffer H (50mM Tris-HCl, 29mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM Dithiothreitol (DTT)) (1417991), x-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Beta-D-galacto-pyranoside) (0703729)

Fa. Stratagene (Heidelberg):

kb-DNA-Ladder (201115)

Fa. Gibco (Karlsruhe):

DMEM (8079), PBS 1x w/o (8067), Trypsin 0,25% (8060)

Fa. Seromed/Biochrom (Berlin):

Fötales Kälberserum (S-0115)

2.1.2. Restriktionsendonukleasen

Fa. Boehringer (Mannheim):

EcoR1 10U/μl (0703737), BamHI 10U/μl (0567604), HindIII 10U/μl (0656313), XbaI 10U/μl (0674257)

2.1.3. DNA-modifizierende Enzyme

Fa. Sigma (München): Taq-DNA-Polymerase 5U/μl (D1806)

2.1.4. Reagenzienansätze-,Kits“

Fa. Qiagen (Hilden): Qiagen RNeasy Mini Kit (74104), Qiaquick Gel Extraction Kit (28704)

Fa. Stratagene (Heidelberg): RAP-PCR-Kit

Fa. Pharmacia (Uppsala, Schweden): PlusOne-DNA-Silver-Staining-Kit (17-6000-30)

Fa. Invitrogen (San Diego, USA): TOPO TA Cloning Kit (K4500-40)

2.1.5. Sonstige Enzyme

Fa. Sigma (München): Lysozym (s.o.), M-MLV Reverse Transkriptase 200U/μl (M-1302)

Fa. Qiagen (Hilden): RNase DNasefree (79254)

Fa. Amersham (Braunschweig): Primer:

M13(-20)-FOR (5'-GTAAAACGACGGCCAG), 0,5 μM;

M13-REV (5'-CAGGAAACAGCTATGAC), 0,5 μM;

RAP A₁ (5'-AATCTAGAGCTCCTCCTC), 0,25 μM;

RAP A₂ (5'-AATCTAGAGCTCCAGCAG), 0,25 μM;

RAP A₃ (5'-AATCTAGAGCTCTCCTGG), 0,25 μM;

RAP A₄ (5'-AATCTAGAGCTCTCCAGC), 0,25 μM;

2.1.6. Gewebeproben und Zellreihen

Von der Abteilung für Allgemein- und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf, em. Klinikdirektor Prof. Dr. Röher, wurden vier Proben von follikulärem Schilddrüsen-Karzinomgewebe und fünf Gewebeproben von Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinomen zur Verfügung gestellt, sowie eine papilläre (PTC 238-27) und eine follikuläre (FTC 133-7) Schilddrüsenkarzinomzelllinie. Die Gewebeproben wurde aus makroskopisch identifizierten Tumorarealen entnommen, die histologische Untersuchung bestätigte jeweils die Diagnose.

Die Einwilligung der Patienten für die weitere Verwendung des ihnen entnommenen Gewebes zu Forschungszwecken liegt vor.

2.1.7. Fotochemikalien und Filtermembranen

Fa. Sigma (München): Quickdraw Blotting Papier (P9039)

Fa. Amersham (Braunschweig): Hybond-N+-Membran (RPN 308B)

Fa. Polaroid (Offenbach): SW-Trennbildfilme Typ 572

Fa. Kodak (Stuttgart): Entwicklerlösung, Fixierlösung, Röntgenfilm X-OMAT (4508)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Für die sterile Kultivierung der Schilddrüsenkarzinomzelllinien (PTC 238-27, FTC 133-7) war es notwendig, sämtliche Arbeiten unter einer Sterilbank durchzuführen. Die Arbeitsplatte und alle Werkzeuge wurden zuvor mit 70% EtOH gereinigt, bzw. Glaswaren zuvor autoklaviert, um eventuellen Kontaminationen vorzubeugen.

Die Zelllinien wurden in DMEM mit 10% Zusatz vom fötalem Kälberserum bei 5% CO₂ in gesättigter Wasserdampfatmosphäre bei 37°C im Brutschrank kultiviert.

2.2.2. RNA-Isolierung aus Schilddrüsenzellen

Die konfluente Zellflasche wurde zuerst mit 1xPBS gewaschen, anschließend ca. 1ml Trypsin auf die Zellen getropft und die Zellflasche einige Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich der größte Teil der Zellen vom Boden gelöst hatte. Die gelösten Zellen wurden dann in 5 ml vorgewärmten Medium suspendiert.

Die Isolierung der RNA wurde mit Hilfe des Qiagen RNeasy Mini Kits durchgeführt (s. 2.2.3.).

2.2.3. RNA-Isolierung aus Schilddrüsengewebe

Die Isolierung der RNA aus den Gewebeproben wurde mithilfe des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen und nach dessen Anleitung vorgenommen.

Bei diesem Verfahren wurden die Gewebeproben zuerst in Anwesenheit eines denaturierenden Guanidin-Isothiocyanathaltigen Puffers, der eine sofortige Inaktivierung von RNasen bewirkt und somit die Isolierung intakter RNA gewährleistet, lysiert und homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte durch Zerkleinerung des Gewebes mittels Skalpell, Zufügen des oben genannten Puffers und anschließend mehrmaligen Aufziehen der erhaltenen Zellsuspension durch eine 23 Gauge-Kanüle. Daraufhin wurde das Zellysat auf eine auf Silika-Gel basierende Membran gegeben, die in Anwesenheit von Ethanol (70%) Gesamt-RNA bindet. Diese wurde in drei folgenden Waschschritten von Kontaminationen gereinigt und in 50µl Wasser eluiert. Die RNA-Konzentration wurde aus einer Verdünnung der jeweiligen Probe im Photometer bei 260 und 280nm bestimmt.

2.2.4. Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese

Zur Bestimmung der Qualität der gewonnenen RNA wurde eine Formaldehyd-Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dafür wurden alle erforderlichen Glasgefäße zur Vermeidung von Kontaminationen eine Stunde mit 0,1% DEPC-Lösung inkubiert und anschließend, wie die verwendeten Lösungen, autoklaviert. Gel-Apparaturen, Polymerisierungsschalen und ähnliches wurden mit 0,2 N NaOH für 15 Minuten inkubiert und vor Gebrauch mit 0,1% autoclaviertem DEPC-Wasser abgespült.

Von den RNA-Proben wurden jeweils 5-10 µg Gesamt-RNA enthaltende Anteile entnommen. Nach der Zugabe von 5x-RNA-Lade-Puffer (s.u.) im Verhältnis 1:4 wurden die Proben bei 65°C für 5 Minuten denaturiert. Bevor die Proben dann für ca. 3 Stunden bei einer Spannung von 5-7 V/cm im elektrischen Feld aufgetrennt wurden, mußte das 1,2% Formaldehyd-Agarose-Gel (s.u.) für eine halbe Stunde im 1x-Formaldehyd-Lauf-Puffer (s.u.) äquilibriert werden.

10x-Formaldehyd-Agarose-Gel-Puffer (pH=7,0):

0,2 M MOPS, 80mM Natriumacetat, 10mM EDTA

1x-Formaldehyd-Laufpuffer:

88% (w/v) 0,1% DEPC Wasser (autoklaviert), 2% (w/v) 12,3 M Formaldehyd,
10% (w/v) 10x-Formaldehyd-Agarose-Gel-Puffer

5x-RNA-Lade-Puffer:

1x-Formaldehyd-Gel-Puffer, 50% deionisiertes Formamid, 5,6% Formaldehyd,
10% Glycerol, 0,1% Bromophenolblau

1,2% -Formaldehyd-Gel-Lösung:

1,2% Agarose, 1% 10x-Formaldehyd-Agarose-Gel-Puffer, auffüllen mit DEPC-
Wasser bis 100ml, 1,8 ml 12,3M Formaldehyd, 3µl Ethidiumbromid

2.2.5. Reverse Transkription der RNA

Die reverse Transkription (RT) der RNA mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion stellt einen entscheidenden Schritt für die Methode des Differential Displays dar. Für die RT-Reaktion wurden die speziellen 18-basigen-Random Arbitrary Primer (RAP) eingesetzt, RAP A₁ (5'-AATCTAGAGCTCCTCCTC), RAP A₂ (5'-AATCTAGAGCTCCAGCAG), RAP A₃ (5'-AATCTAGAGCTCTCCTGG), RAP A₄ (5'-AATCTAGAGCTCTCCAGC).

Ein µg Gesamt-RNA wurde mit H₂O auf ein Volumen von 14,5µl gebracht, mit 1µl des 25µM RAP-Primer Stocks versetzt und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Für die eigentliche Transkription wurde dann ein RT-Cocktail (s.u.) hinzugefügt, der die Reverse-Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus nutzte und 1µl eines RNase-Inhibitors enthielt, der die RNA vor Degradation schützte. Nach einer 10 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur lief die Reaktion für 60 Minuten bei 37°C ab.

Jeweils 3µl der Produkte dieser Reaktion wurden für die folgende RAP-PCR eingesetzt, die verbleibende cDNA wurde bei -20°C für weitere Arbeitsschritte aufbewahrt.

RT-Ansatz zur Reversen-Transkription:

2µl 10x-First-Strand-Buffer

1µl RNase-Block-Ribonuklease-Inhibitor (40U/µl)

1µl dNTP (25mM dATP, 25mM dGTP, 25mM dTTP, 25mM dUTP)

0,5µl MMLV-RT (50U/µl)

2.2.6. Amplifikation der cDNA

Parallel zur cDNA-Synthese wurde auch bei der Amplifikation mit den vier verschiedenen RAP-Primern (s. 2.2.3.) gearbeitet.

Die Polymerase-Kettenreaktion schreitet kraft des Einbau der RAP-Primer innerhalb beider Enden der PCR voran, um die cDNA zu vermehren. Die unterschiedliche Anzahl der Vorlagen, und damit auch die Unterschiede in der Expression, bestimmt, welche PCR-Produkte letztendlich dominieren.

Um Fehler in der Versuchsanordnung zu vermeiden, wurde bei der Zusammenstellung der PCR-Reaktion zuerst ein Reaktionscocktail hergestellt, und dann jeweils 3µl cDNA hinzugefügt.

Neben dem Gebrauch des RAP-Primers ist die Verwendung der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase, die Temperaturen bis 95°C nahezu unbeschadet übersteht und eine genaue Kopie des durch den Primer flankierten Bereichs herstellt, eine wichtige Reaktionsvoraussetzung. An dieser Stelle entsteht ein Doppelstrang, der im folgenden durch Denaturierung wieder getrennt wird und nun selbst als Vorlage für eine neue Kopie dient.

PCR-Ansatz: 5µl 10x-Taq-Reaction-Buffer

3µl 25mM MgCl₂ (3mM Endkonzentration)

35,7 µl dd H₂O

0,1µl dNTP-Mix (25mM je NTP)

0,2µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)

2µl des jeweiligen 25µM RAP-PCR Primer Stammlösung

3µl cDNA

Dieser Reaktionsansatz wurde noch mit ca. 15µl steril-filtrierte Mineralöl überschichtet, um eine Verdunstung zu verhindern.

Die PCR-Reaktion lief unter folgenden Bedingungen ab:

1 Zyklus	1 Minute	94°C
	5 Minuten	36°C
	5 Minuten	72°C
40 Zyklen	1 Minuten	94°C
	2 Minuten	50°C
	2 Minuten	72°C
1 Zyklus	10 Minuten	72°C

Bis zur weiteren Analyse wurden die PCR-Produkte im Tiefkühlfach aufbewahrt.

2.2.7. Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden diese auf ein 5%-Acrylamid-Bis-Acrylamid-Gel (s.u.), von 38x50cm Größe und einer Stärke von 0,75mm (Maniatis T, 1982) aufgetragen und in einer Gel-Sequenzierkammer der Firma Biorad elektrophoretisch aufgetrennt. Hierbei wurden jeweils die folliculären und papillären PCR-Produkte nebeneinander aufgetragen, um sie anschließend besser analysieren zu können. Vor dem Auftragen wurden jeweils 5µl des jeweiligen PCR-Produkts mit 5µl des Stop-Puffers (s.u.) vermischt und für 2 Minuten bei 80°C erhitzt, um eine Denaturierung sicherzustellen. Das Gemisch wurde dann in die Taschen des Gels gefüllt und bei 400 Volt für ca. 10 Stunden, bis das Xylencyanol des Stop-Puffers eine Laufstrecke von nahezu 50 cm überwunden hatte und das Bromphenolblau in den Puffer übergetreten war, elektrophoretisch aufgetrennt.

5%- Acrylamid-Gel

40% Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (19:1) 12,7%

H ₂ O bidest.	66,6%
5xTBE	20%
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	0,7%
+ 150µl TEMED	

Stop-Puffer

80% deionisiertes Formamid
50mM Tris-HCl (pH=8,3)
1mM EDTA (pH=8,0)
0,1% (w/v) Xylencyanol
0,1% (w/v) Bromphenolblau

2.2.8. Silberfärbung und Analyse der Banden

Nachdem der Stop-Puffer nach 50 cm Laufstrecke am Fuße des Gels angekommen und das Bromphenol in den Puffer übergetreten war, wurde das 0,75mm starke Gel mithilfe von Filterpapier von den Glasplatten gelöst und in eine genügend große Schale überführt, in der dann die Färbung vorgenommen werden konnte. Hierzu wurde der PlusOneTMDNA-Silver-Staining-Kit der Firma Pharmacia Biotech verwendet und nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dieser besitzt eine Sensitivität zur Detektion von Nukleinsäuren von 20-50pg DNA/Bande. Nach einer Gesamtfärbezeit von 90 Minuten konnten die Banden hinsichtlich der gesuchten Unterschiede beurteilt werden.

Für die weitere Analyse der einzelnen Banden wurden diejenigen, die Unterschiede in der Genexpression zwischen papillären und follikulären Karzinomzellen vermuten ließen mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Röhrchen überführt. Jedes Gelstück wurde mit 100 µl TE-Puffer bedeckt, für eine Stunde bei 60°C im Wasserbad und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch dieses Verfahren wurde die DNA aus dem Polyacrylamid-Gel herausgelöst und einer weiteren Bearbeitung zugänglich gemacht. Nach kurzem Sammelzentrifugieren wurde der Überstand bei 4°C aufbewahrt.

2.2.9. Reamplifikation der DNA-Fragmente

Jeweils 1-2µl des Eluats wurde dann genau den gleichen PCR-Bedingungen wie zuvor zugeführt. Dabei wurden für die 40 Zyklen hochstringenter PCR dieselben spezifischen Ankerprimer verwendet. Teils wurde eine Wiederholung dieser Reamplifizierung nötig, um ein gutes Ergebnis zu erlangen.

Die Überprüfung der Reinheit der Produkte erfolgte über Größen-Analyse auf einem 2%igem Agarosegel.

2.2.10. Klonierung von PCR-Produkten und DNA-Transformation in E-coli

Für den weiteren Versuchsablauf war es notwendig, das PCR-Produkt in einer größeren Menge zur Verfügung zu haben, um Sequenzierung und nachfolgende Herstellung von DNA-Sonden zu ermöglichen. Hierzu wurde das vom Gel ausgeschnittene und mittels PCR reamplifizierte doppelsträngige DNA-Fragment in ein zuvor linearisiertes Bakterien-Plasmid eingebaut, das eine Ampicillin-Resistenz ausbildet und als Vektor wieder in ein zirkuläres Plasmid überführt wurde. Die Klonierung wurde mithilfe des TOPO TACloning^R-Kits und nach dessen Anleitung durchgeführt.

Dieses zirkuläre Plasmid konnte durch Transformation in Bakterien eingeschleust werden. Der verwendete Kit machte sich hierfür das Verfahren der „Heat-Shock-Transformation“ zu Nutze. Dabei wurde das Plasmid mit E.coli-Bakterien vermischt, 30 Minuten auf Eis inkubiert, exakt 30 Sekunden bei 42°C schockerhitzt und vor Zufügen eines Nährmediums wieder auf Eis inkubiert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C für eine Stunde bei 250rpm im Schüttler. Die Bakterien wurden zur Selektion auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin aufgetragen, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.11. Plasmid-DNA-Präparation und Verdau

Nach der Methode der Kochpräparation (Boiling-Prep) wurde eine Bakterienkultur von den über Nacht inkubierten LB-Agar-Platten entnommen und in einem ml LB-Medium mit 50µl/ml Ampicillin über Nacht unter ständigem Rütteln mit 250 rpm bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien bei 2000g für 30 Sekunden bei 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 350µl STET-Puffer (s.u.) resuspendiert und mit 25µl 10mg/ml Lysozymbelösung versetzt. Der Ansatz wurde kurz vermischt und dann für 40 Sekunden bei 96°C „gekocht“. Danach wurde für 10 Minuten bei 12000rpm und 21°C zentrifugiert, das Zentrifugat verworfen und der Überstand mit 40µl 2,5M Natrium-Acetat (pH=5,2) und 420µl Isopropanol präzipitiert. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugieren wurde das Zentrifugat mit 70% Ethanol gewaschen und sorgfältig getrocknet bis keine Rückstände des Ethanols mehr übrig waren. Das Zentrifugat wurde dann in 50µl TE-Puffer (pH=8,0) resuspendiert.

Zur Überprüfung des gewonnenen Plasmids schloß sich ein Verdau durch Restriktionsenzyme an. Der von der Firma „Invitrogen“ benutzte Vektor enthielt an beiden Seiten der Klonierungsstellen EcoRI-Verdaustellen.

Ansatz zum Schneiden der Plasmide mittels Restriktionsenzym:

Plasmid	26µl
Restriktionsenzym EcoRI (10U/µl)	1µl
Puffer H 10x	3µl

STET-Puffer: 0,1M NaCl
 10mM Tris-Cl (pH=8,0)
 1mM EDTA (pH=8,0)
 Triton X-100-Lösung 5%(v/v)

Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Durch den Verdau des zirkulären Plasmids mit dem Restriktionsenzym EcoRI konnte das PCR-Produkt wieder herausgeschnitten werden und auf einem 2%igen Agarosegel analysiert werden. Dem Laufpuffer wurde RNase (20µg/ml) zugegeben, um nicht entfernte RNA zu degradieren.

2.2.12. Plasmid Gel-Extraktion

Nachdem das durch den Verdau aus dem Plasmid herausgetrennte PCR-Produkt auf einem 2%igen Agarose-Gel überprüft worden war, mußte es zur weiteren Bearbeitung aus dem Gel wieder herausgetrennt werden. Dazu wurde der Qiaquick-Gel-Extraction-Kit von Qiagen nach der beiliegenden Anleitung verwendet. Anfangs wurden hierzu die einzelnen Banden aus dem Agarosegel herausgeschnitten und dann über mehrere Arbeitsschritte hinweg die reine DNA in TE (pH8,0) gewonnen.

2.2.13. DNA-Sequenzierung

Zur Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung wurde eine PCR mit den Primern M-13(-20)FOR und M13-REV durchgeführt.

PCR-Cocktail:	5µl	10x-PCR-Puffer
	5µl	10x-dNTP
	1µl	M13(-20)FOR
	1µl	M13-REV
	0,25µl	Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)
	38,75µl	Nuclease-freies Wasser

Dieser Reaktionsansatz wurde noch mit ca. 15µl steril-filtrierte DNA-freiem Mineralöl überschichtet, um eine Verdunstung zu verhindern.

Die PCR lief nach folgenden Bedingungen ab:

1	Denaturierung	3 Minuten	94°C
30	Zyklen	30 Sekunden	94°C
		30 Sekunden	55°C
		1 Minute	72°C
1	Elongation	10 Minuten	72°C

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte auf einem 2%igen Agarose-Gel über eine Laufstrecke von 15 cm. Als Molekulargewichtsmarker diente die kb-DNA-Ladder der Firma Stratagene. Die anschließende Sequenzierung der gewonnenen DNA wurde durch die Firma Qiagen nach der Methode der enzymatischen Sequenzierung, auch nach ihren Entdeckern Sanger und Coulson benannt, durchgeführt.

2.2.14. Homologiesuche mit BLAST^R

Nachdem die Sequenz der DNA der ausgeschnittenen Banden bekannt war, mußte die Bedeutung bzw. die Funktion dieser geklärt werden. Dazu erfolgte mit Hilfe von BLAST^R eine Recherche in den verfügbaren Internetdatenbanken. BLAST^R (Basic Local Alignment Search Tool; www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) ist ein Programm zur Homologiesuche, entwickelt um alle verfügbaren Datensätze zu bekannten oder unbekanntem Sequenzen zu finden. Das Programm ist vor allem für eine schnelle Suche konzipiert worden, was allerdings nur mit geringen Einbußen gegenüber der Sensitivität einhergeht (Altschul, 1990).

2.2.15. Northern-Blot-Hybridisierung

Zur Überprüfung der Methode wurde anfangs eine Hybridisierung der Zellreihen nach dem unten beschriebenen Protokoll mit GPDH (Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) durchgeführt.

2.2.15.1. Formaldehyd-Gel-Elektrophorese

Die Northern-Blot-Hybridisierung wurde vorgenommen, um die im Gel der RAP-PCR entdeckten Unterschiede in der Expression der mRNA zu verifizieren und damit falsch-positive Ergebnisse auszuschließen. Während beim Differential Display Gewebeproben von Tumorpatienten als Ausgangsmaterial gedient hatten, wurden für die Northern-Blot-Hybridisierung eine papilläre (PTC 238-27) und eine follikuläre (FTC 133-7) Schilddrüsenkarzinomzelllinie verwendet.

Bei der anfangs notwendigen Formaldehydgelelektrophorese wurde wie in 2.2.2. vorgegangen, wobei größte Sorgfalt auf die Inaktivierung der RNasen verwendet wurde.

2.2.15.2. Transfer der RNA auf immobilisierende Nylonmembran

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die RNA auf eine Nylonmembran nach der Methode von Southern (Maniatis T, 1982) transferiert, an der sie gebunden und somit immobilisiert wurde. Die RNA wurde hierbei über Nacht von der durch Kapillarkräfte aufsteigenden 20x-SSC-Lösung (s.u.) aus dem Gel eluiert und an die Membran gebunden. Die vollständige Übertragung der RNA wurde am nächsten Morgen mittels Beleuchtung mit einer UV-Lampe (320nm) überprüft. Zur Fixierung wurde die Membran für zwei Stunden bei 80°C „gebacken“, nachdem sie kurz in 50mM NaOH und 2xSSC gewaschen worden war.

20x-SSC (pH=7,5;eingestellt mit HCl und NaOH):

3,0M NaCl

0,3M Natriumcitrat

aufgelöst in 850 ml DEPC-Wasser

2.2.15.3. Markierung von DNA-Sonden mittels PCR

Die Markierung von DNA-Sonden mittels PCR eignet sich zur Herstellung hoch spezifischer Proben (Sambrook J, 2001).

Als DNA-Sonden wurden die klonierten Sequenzen aus den Plasmid-Klonen eingesetzt.

Die Herstellung der Sonden erfolgte durch Polymerase-Kettenreaktion unter Verwendung der Plasmid-DNA und Einbau Digoxigenin-markierter Nukleotide.

Die Markierung und die nachfolgende Hybridisierung wurden unter Verwendung des "DIG DNA Labeling and Detection Kits Nonradioactive" der Firma Boehringer Mannheim durchgeführt.

Herstellung eines DIG-dNTP-Gemisches:

230µl Nuklease-freies Wasser

5µl dATP

5µl dCTP

5µl dGTP

3,25µl dTTP

1,75µl DIG-dUTP

Ansatz zur PCR: 30µl 10x-PCR-Puffer

30µl DIG-dNTP-Gemisch

2µl RAP-Primer

1,5µl Taq-Polymerase (Qiagen, 5U/µl)

2µl DNA

234,5µl Nuklease-freies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde noch mit ca. 15µl steril-filtrierte Mineralöl überschichtet, um eine Verdunstung zu verhindern.

Die PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

1 Denaturierung	4	Minuten	93°C
40 Zyklen	45	Sekunden	94°C
	30	Sekunden	56°C
	30	Sekunden	72°C
1 Elongation	10	Minuten	72°C

2.2.15.4. Hybridisierung mit bekannten DNA-Sonden

Durch die Hybridisierung der transferierten RNA mit einer komplementären, markierten DNA-Sonde können die Transkripte als Banden sichtbar gemacht werden.

Um unspezifische Bindungen abzusättigen wurde die fixierte Membran zunächst für zwei Stunden mit 2ml Prähybridisierungslösung (s.u.) bei 49,5°C in einem Plastikbeutel inkubiert. Mit 2ml der Hybridisierungslösung, die die markierte DNA-Sonde in einer Konzentration von 25 ng/ml enthielt, wurde die Membran anschließend über Nacht bei 49,5°C inkubiert.

Nach dieser mindestens zwölfstündigen Inkubation wurde die Membran 2x 5 Minuten in 2x-SSC/0,1% SDS, 2x 15 Minuten in 0,5x-SSC/0,1%SDS und 1x 5 Minuten in einem Maleinsäure-Waschpuffer (s.u.) gewaschen. Nach der Reinigung wurde die Membran für 30 Minuten in 100ml Block-Lösung auf dem Schüttler inkubiert, bevor sie für 30 Minuten in 20ml Antikörper-Lösung gegeben wurde. Zwei weitere Reinigungsschritte von je 15 Minuten in 100ml Maleinsäure-Waschpuffer schlossen sich an. Die gereinigte Membran wurde dann für 2-5 Minuten in 20ml Detektionspuffer äquilibriert, ehe sie mit einer Detektionslösung 5 Minuten bei Raumtemperatur und nach Entfernung der Lösung 10 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert wurde.

Die nicht speziell gekennzeichneten Lösungen waren Bestandteile des “DIG DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive“ der Firma Boehringer Mannheim.

Für die Auswertung der Hybridisierung wurde die Membran 90 Minuten auf einen X-OMAT Röntgenfilm der Firma Kodak exponiert.

Anhand der detektierten Banden wurde es dann möglich zu klären, ob es sich bei den in der Gelelektrophorese des Differential-Display beobachteten Unterschieden in der Genexpression um falsch positive Ergebnisse gehandelt hatte.

Prähybridisierungslösung:

0,5M	Natriumhydrogenphosphat (pH 7,2)
1mM (w/v)	EDTA (pH 7,0)
7% (w/v)	SDS

Maleinsäure-Waschpuffer:

0,1M	Maleinsäure
0,15M	NaCl (pH 7,5)
0,3% (w/v)	Tween 20

3. Ergebnisse

3.1. RNA-Isolierung aus den Gewebeproben

Neun Gewebeproben wurden für die vorliegende Arbeit untersucht, fünf Proben von Patienten mit papillären Schilddrüsenkarzinomen (A-E) und vier Proben follikulären Schilddrüsen-Karzinomgewebes (F-I).

Die Messung der Konzentration der isolierten RNA ergab folgende Werte:

Probe	Ratio A260/A280	Konzentration
A	1,9055	65,02 µg/ml
B	2,4312	149,64 µg/ml
C	2,1624	229,1 µg/ml
D	2,3457	148,1 µg/ml
E	1,9897	163,13 µg/ml
F	1,7488	22,6 µg/ml
G	2,0960	60,94 µg/ml
H	2,0049	152,1 µg/ml
I	2,1091	256,6 µg/ml

3.2. cDNA-Synthese

Für die Untersuchungen standen vier RAP-PCR-Primer (A₁-A₄) zur Verfügung. Da jedoch für jede Transkription mindestens 1µg totale RNA benötigt wurde, konnte nicht jede Gewebeprobe mit allen vier Primern untersucht werden. Ein Schema der je Probe zur Herstellung der cDNA eingesetzten Primern findet sich in folgender Tabelle:

Proben	Primer A ₁	Primer A ₂	Primer A ₃	Primer A ₄
A	X	X	-	-
B	X	X	X	X
C	X	X	X	-
D	X	X	X	-
E	X	X	X	-
F	X	X	-	-
G	X	X	-	-
H	X	X	X	-
I	-	X	X	X

Nach der reversen Transkription wurde zur Kontrolle der hergestellten cDNA (Primer A₂) eine GPDH-PCR zu folgenden Bedingungen gefahren:

Denaturierung	10 Minuten 45 Sekunden	95°C
35 Zyklen	1 Minute	95°C
	30 Sekunden	55°C
	30 Sekunden	72°C
Elongation	10 Minuten	72°C

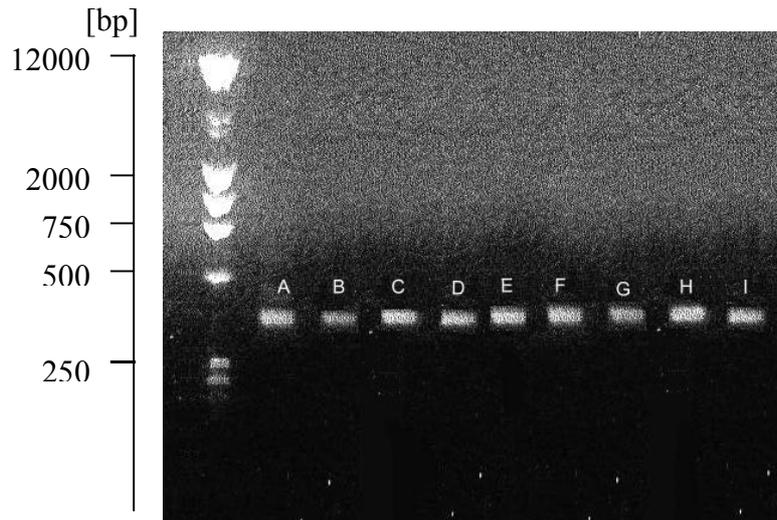


Abbildung 1: GPDH-PCR aller neun Gewebeproben. Als Molekulargewichtsmarker wurde die kb-DNA-Ladder der Firma Stratagene verwendet. Aufgetragen wurde 1 μ l des Molekulargewichtsmarkers und je 5 μ l der cDNA, vermischt jeweils mit 5 μ l der Gel-Loading-Solution (Sigma). Das Ergebnis dieser Gelelektrophorese zeigte eine für die weiteren Untersuchungsschritte ausreichende Qualität der cDNA.

3.3. PCR und Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Die Gelelektrophorese der GPDH-PCR zeigte, daß das Ausgangsmaterial für die weiteren Versuchsschritte geeignet war, so daß mit der RAP-PCR fortgefahren werden konnte. Die RAP-PCR lief mit je 3 μ g der hergestellten cDNA nach dem oben beschriebenen Schema ab. Nach der Amplifikation wurden jeweils 5 μ l der RAP-PCR-Produkte mit 5 μ l Stop-Puffer vermengt, zwei Minuten bei 80°C erhitzt und nach Primern sortiert auf 38x50cm große Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 400 Volt für etwa 10 Stunden.

Zur Auswertung wurden die Gele mit dem PlusOneTMDNA-Silver-Staining-Kit der Firma Pharmacia Biotech gefärbt und hinsichtlich der Unterschiede in der genetischen Expression untersucht. Die Ergebnisse der Gelelektrophorese sind im folgenden dargestellt:

Abbildung 2: Elektrophorese mit Gewebeproben A,B,C,D,E,F,G,H mit Primer A₁
Aufgetragen wurde 1 µl des Molekulargewichtsmarkers (MGM) und je 10µl der c-DNA
vermischt jeweils mit 5µl der Gel-Loading-Solution (Sigma).

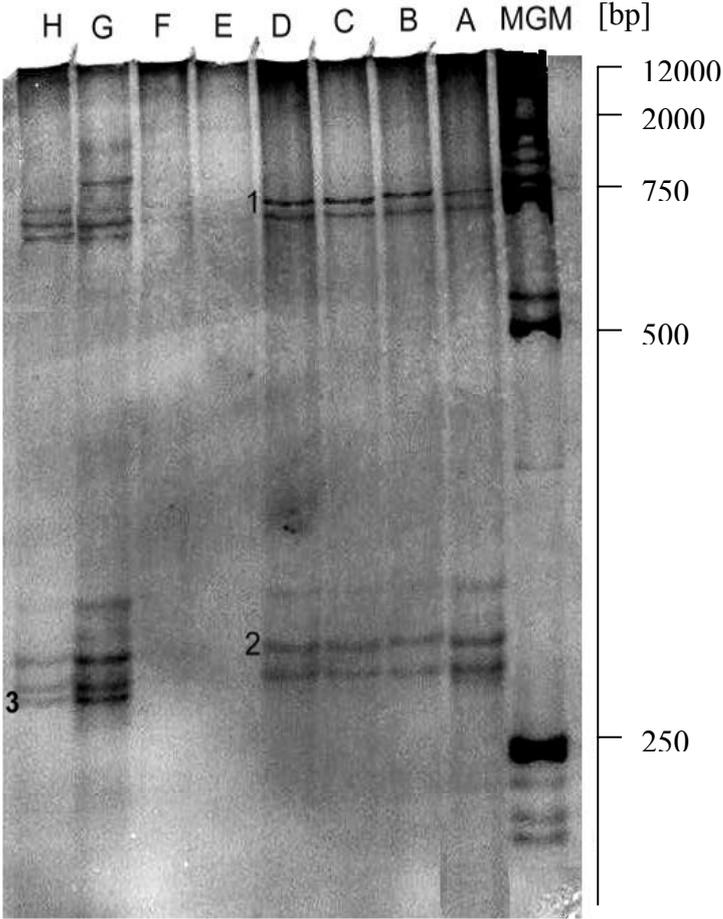
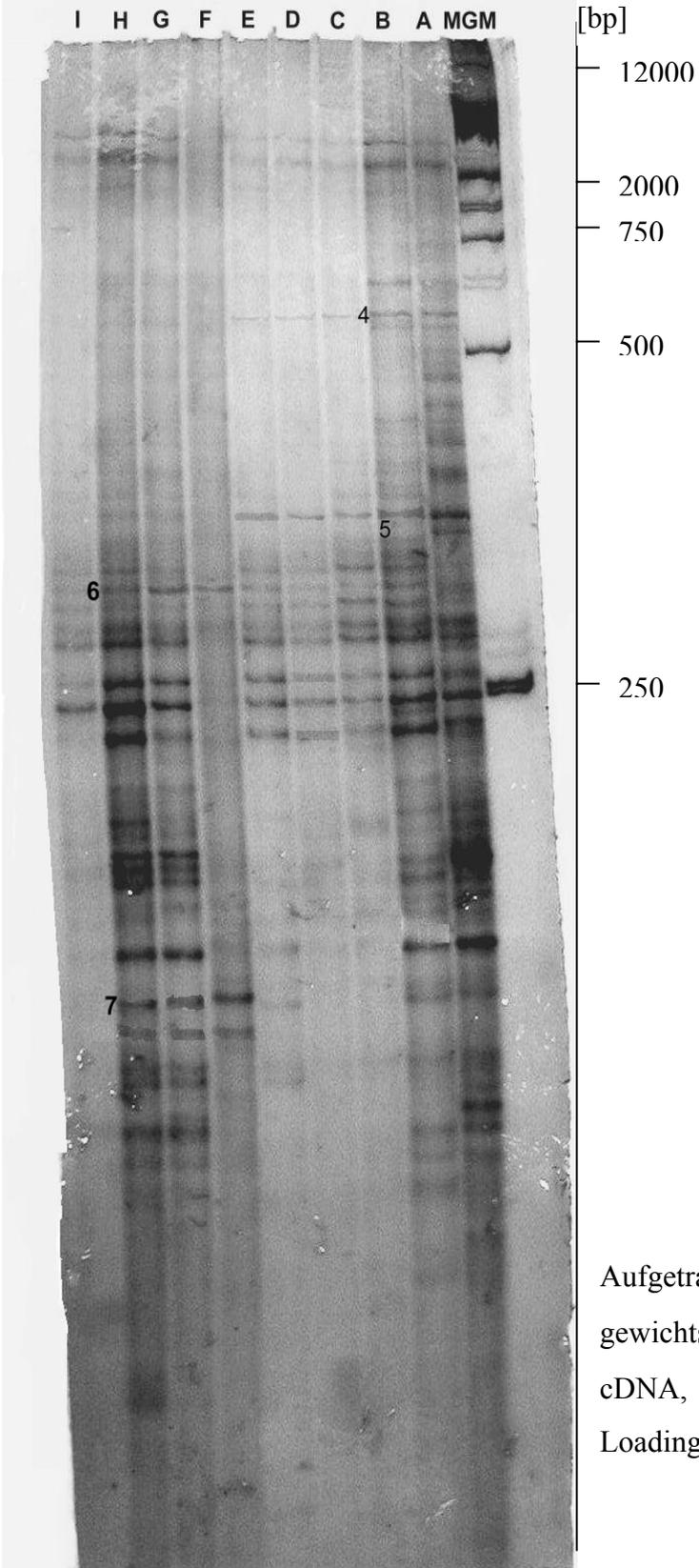
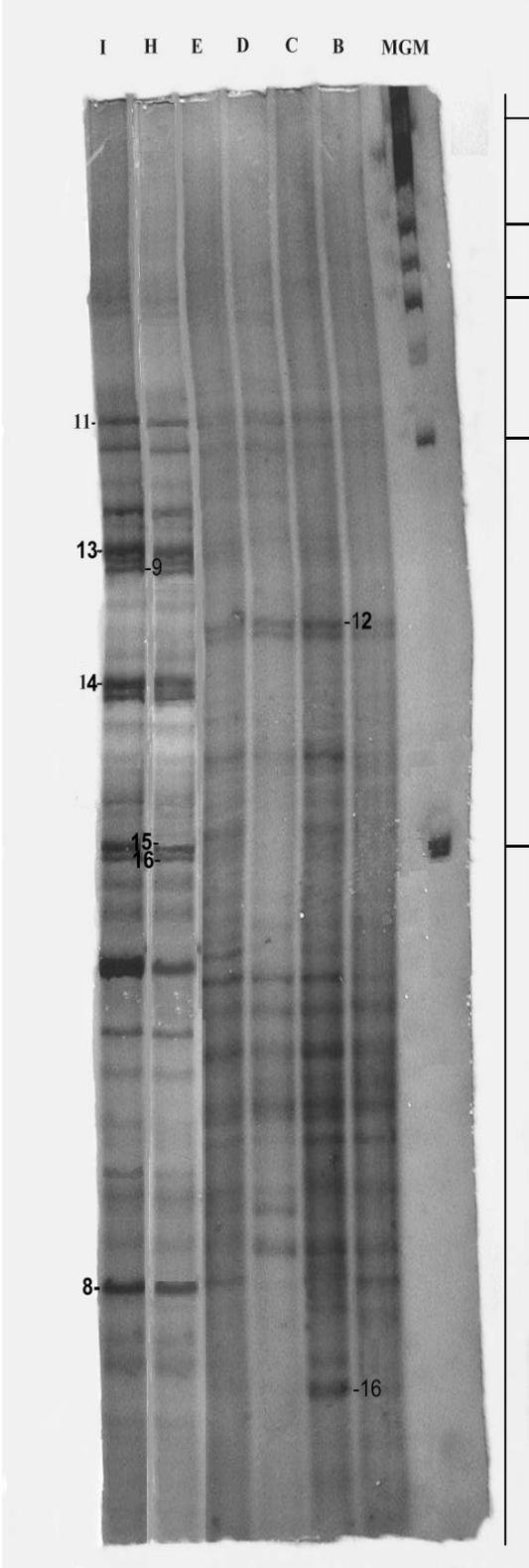


Abbildung 3: Elektrophorese mit Gewebeprobe A,B,C,D,E,F,G,H,I mit Primer A₂



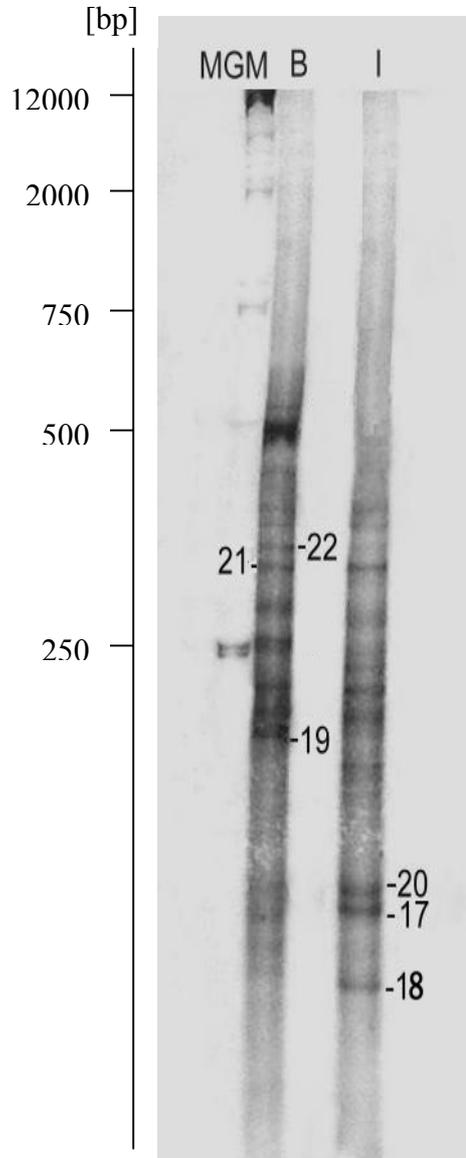
Aufgetragen wurde 1µl des Molekulargewichtsmarkers (MGM) und je 10µl der cDNA, vermischt jeweils mit 5µl der Gel-Loading-Solution (Sigma).

Abbildung 4: Elektrophorese mit Gewebeprobe B,C,D,E,H,I mit Primer A₃



Aufgetragen wurde 1µl des Molekulargewichts-
markers (MGM) und je 10µl der cDNA, vermischt
jeweils mit 5µl der Gel-Loading-Solution (Sigma).

Abbildung 5: Elektrophorese mit Gewebeproben B und I mit Primer A₄



Aufgetragen wurde 1 μ l des Molekulargewichtsmarkers (MGM) und je 10 μ l der cDNA, vermischt jeweils mit 5 μ l der Gel-Loading-Solution (Sigma).

Bei allen hier gezeigten Fotos wurden mit den Buchstaben A-I, wie im gesamten Text, die Gewebeproben bezeichnet. Mit den Ziffern 1-22 wurden die Banden markiert, die im Vergleich der mRNA follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinomgewebes interessant waren.

Die in der Gelelektrophorese beobachteten Unterschiede in der Expression der beiden zu untersuchenden Schilddrüsenkarzinomarten mußten im weiteren auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können. Dazu wurden die interessanten Banden ausgeschnitten, die DNA nach dem oben beschriebenen Verfahren aus den Polyacrylamidgelen herausgelöst und in 50µl TE-Puffer suspendiert.

3.4. Reamplifikation, Klonierung und Plasmid DNA-Präparation

Die aus den Polyacrylamidgelen gelöste DNA der 22 Proben wurde erneut einer RAP-PCR zugeführt und die Produkte zur Überprüfung auf ein 2%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Auswertung des Agarose Gels zeigte ausschließlich scharf abgrenzbare Banden, was darauf schließen ließ, daß jeweils nur genau ein Produkt isoliert worden war. Nach der Überprüfung der PCR-Produkte wurden diese kloniert und wie beschrieben in kompetente E.coli-Bakterien transformiert. Nach einer etwa zehnstündigen Kultivierung der Bakterien im Brutschrank bei 37°C wurde am nächsten Tag die DNA-Präparation nach der Methode des “Boiling-Preps“ durchgeführt und die Plasmide verdaut. Die verdauten Plasmide wurden auf einem 2%igem Agarose-Gel überprüft und mit Hilfe der M-13-PCR für die Sequenzierung vorbereitet. Die Ergebnisse der M13-PCR zeigt die Abbildung 6.

Abbildung 6: Die 22 Proben nach der M13-PCR



Aufgetragen wurde 1µl des Molekulargewichtsmarkers und je 5µl der PCR-Produkte, vermischt jeweils mit 5µl der Gel-Loading-Solution (Sigma).

Alle 22 Proben wurden zur Sequenzierung an die Firma Qiagen gegeben.

3.5. Homologiesuche mit BLAST^R

Die Homologiesuche mit BLAST^R ergab zwei Gruppen von Ergebnissen, zum einen diejenigen, denen eine entsprechende Sequenz auf mRNA- und denen eine Sequenz auf DNA-Ebene zugeordnet werden konnten. Die Ergebnisse sind hier nach dieser Einteilung wiedergegeben. In Klammern ist jeweils vermerkt, ob es sich um Sequenzen aus follikulärem oder papillärem Schilddrüsenkarzinomgewebe handelt:

3.5.1. Ergebnisse mit Entsprechungen auf mRNA-Ebene

M6 (follikulär)

Homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3),
mRNA
Length = 3895

Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
Identities = 134/137 (97%)
Strand = Plus / Plus

```
Query: 9  gctccagcagctaagaacggccatgcaccaccacccacggaatcgagaaagagctatcaa
          |||||  ||  |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 524 gctccaccaactaagaacggccatgcaccaccacccacggaatcgagaaagagctatcaa
```

```
Query: 69  tctgtcaatcctgtccgtgtccgggcccgggtgaggtttcccgtggtgggtcaaattaagc
          |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 584 tctgtcaatcctgtccgtgtccgggcccgggtgaggtttcccgtggtgagtcaaattaagc
```

```
Query: 129 cgcaggctccactcctg 145
          |||||||||||||||
Sbjct: 644 cgcaggctccactcctg 660
```

M7 (follikulär)

Homo sapiens serine/threonine protein kinase Kp78 splice variant
CTAK75a mRNA, complete cds
Length = 3895

Score = 248 bits (125), Expect = 2e-63
Identities = 134/137 (97%)
Strand = Plus / Plus

Query: 9 gctccagcagctaagaacggccatgcaccaccacccacggaatcgagaaagagctatcaa
||||| || |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 524 gctccaccaactaagaacggccatgcaccaccacccacggaatcgagaaagagctatcaa

Query: 69 tctgtcaatcctgtccgtgtccgggcccgggtgaggtttcccgtgttggtcaaattaagc
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||
Sbjct: 584 tctgtcaatcctgtccgtgtccgggcccgggtgaggtttcccgtgttgagtcaaattaagc

Query: 129 cgcaggctccactcctg 145
|||||||||||||||||||
Sbjct: 644 cgcaggctccactcctg 660

M4 (papillär)

Homo sapiens hypothetical gene supported by AK090401 (LOC283721),
mRNA
Length = 5506

Score = 307 bits (155), Expect = 3e-81
Identities = 172/178 (96%)
Strand = Plus / Plus

Query: 12 ccagcagtcctccacaaatcttaagaattaccctctattgccccttgggccccctgtccc
|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 5127 ccagcagtcctccacaaatcttaagaattaccctctattgccccttgggccccctgtccc
5186

Query: 72 cagaagcctgggtcagccaagactcacatccctaggtggctggcaaccaccagaagtggct
131
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct: 5187 cagaagcctgggtcagccaagactcacatccccaggtggctggcaaccaccggaagtggct
5246

Query: 132 ttctcaggganactgccatttgtttctctgttctctgctcctgctggagctctag
||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||| |||||
Sbjct: 5247 gtctcagggatactgccatttgtttctctgttctctgctcactcctgctggaactctag 5304

M5 (papillär)

Homo sapiens hypothetical protein FLJ12439 (FLJ12439), mRNA
Length = 1614

Score = 301 bits (152), Expect = 1e-79
Identities = 152/152 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 9 gctccagcaggttgaccttcaagggctgcatcagtcttcagaaacaggagctgccagcct
|||||
Sbjct: 833 gctccagcaggttgaccttcaagggctgcatcagtcttcagaaacaggagctgccagcct

Query: 69 caagcagtttgctgctgggagggaggggtggaccacattacccaaatgtaagggttgga
|||||
Sbjct: 773 caagcagtttgctgctgggagggaggggtggaccacattacccaaatgtaagggttgga

Query: 129 cacctttctgctgcttctctgtgtagctgctgg 160
|||||
Sbjct: 713 cacctttctgctgcttctctgtgtagctgctgg 682

M11 (follikulär)

Homo sapiens hypothetical gene supported by AK095249 (LOC284844),
mRNA
Length = 2857

Score = 430 bits (217), Expect = e-118
Identities = 217/217 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 7 gagctctcctggagattctcacactgggtccagggggtcttcagttaactgacacctttg
|||||
Sbjct: 1660 gagctctcctggagattctcacactgggtccagggggtcttcagttaactgacacctttg
1719

Query: 67 ttgagcacctacttaccacataagccattgacgagattgtgctggaaacatgcaactatg
126 |||||
Sbjct: 1720 ttgagcacctacttaccacataagccattgacgagattgtgctggaaacatgcaactatg
1779

Query: 127 ctaaaaacaaagactgtcacctgccctttcagagctacgcagagcagcctgagactcaca
186 |||||
Sbjct: 1780 ctaaaaacaaagactgtcacctgccctttcagagctacgcagagcagcctgagactcaca
1839

Query: 187 gcgaaacagcttttgtctctgggcagttgcagagcag 223
|||||
Sbjct: 1840 gcgaaacagcttttgtctctgggcagttgcagagcag 1876

M17 (follikulär)

Homo sapiens cDNA FLJ25150 fis, clone CBR07695, highly similar to
Homo sapiens BNPI mRNA for brain-specific Na-dependent
inorganic phosphate cotransporter
Length = 1887

Score = 321 bits (162), Expect = 2e-85
Identities = 165/166 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 19 tcaccaagcgttggattgttcaccactaatagggaaacgtgagctgggtagaccgtcg
|||||
Sbjct: 1358 tcaccaagcgttggattgttcaccactaatagggaaacgtgagctgggtagaccgtcg
1417

Query: 79 tgagactggtagttttaccctactgatgatgtggttgccatggtaatcctgctcagt
138 |||||
Sbjct: 1418 tgagacaggtagttttaccctactgatgatgtggttgccatggtaatcctgctcagt
1477

Query: 139 acgagaggaaccgcaggttcagacatttggtgtatgtgcttgctg 184
|||||
Sbjct: 1478 acgagaggaaccgcaggttcagacatttggtgtatgtgcttgctg 1523

Query: 189 tgccgcagatcaggggagctgcttgtgatgatttaaagggtttgtttctccccaggaga
247 |
Sbjct: 30806 tgccgcagatcaggggagctgcttgtgatgatttaaagggtttgtttctccccaggaga
30748

M13 (follikulär)

Human DNA sequence from clone RP11-7K24 on chromosome 6, complete
sequence [Homo sapiens]
Length = 79319

Score = 432 bits (218), Expect = e-119
Identities = 232/239 (97%)
Strand = Plus / Minus

Query: 9 gctctcctggtgaccgatctccttggggagcacttggcagcttagggcaaagtctcacia
68 |
Sbjct: 30986 gctctcctggtgaccgatctccttggggagcacttggcagcttagggcaaagtctcacia
30927

Query: 69 ttctctagaatgtatctggcctgaggaacgtagggtgnnnnnnccgctttgctcattct
128 |
Sbjct: 30926 ttctctagaatgtatctggcctgaggaacgtagggtgaaaaaacgctttgctcattct
30867

Query: 129 atttggattgtcaggagaggggtggtggaagagggggcagcttctggcattggagaggggg
188 |
Sbjct: 30866 atttggattgtcaggagaggggtggtggaagagggggcagcttctggcattggagaggggg
30807

Query: 189 tgccgcagatcaggggagctgcttgtgatgatttaaagggtttgtttctccccaggaga
247 |
Sbjct: 30806 tgccgcagatcaggggagctgcttgtgatgatttaaagggtttgtttctccccaggaga
30748

M14 (follikulär)

Human DNA sequence from clone RP11-462G8 on chromosome 10, complete
sequence [Homo sapiens]
Length = 150622

Score = 363 bits (183), Expect = 5e-98
Identities = 186/187 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 12 ctctctggggagcactagatgccttcactcctggggagctctggaagcccttactcttggg
71 |
Sbjct: 39717 ctctctggggagcactagatgccttcactcctggggagctctggaagcccttactcttggg
39776

Query: 72 gagcaccaaagccctcctggggagcactagatgccttcactcctggggagcgctggaagc
131 |
Sbjct: 39777 gagcaccaaagccctcctggggagcactagatgccttcactcctggggagcgctggaagc
39836

Query: 132 cctcactcctggggagcaccacaaagccctcctggggagtagtggatgcctttactccagga
191 |
Sbjct: 39837 cctcactcctggggagcaccacaaagccctcctggggagtagtggatgcctttactcctgga
39896

Query: 192 gagctct 198
 |
Sbjct: 39897 gagctct 39903

M16 (papillär)

Human DNA sequence from clone RP11-525G13 on chromosome 1, complete
sequence [Homo sapiens]
Length = 99866

Score = 212 bits (107), Expect = 7e-53
Identities = 107/107 (100%)
Strand = Plus / Plus

Query: 7 gagctctgtctgtggaggggtagtagtttccgcttcctggagggttgagtgaggtgagg
66 |
Sbjct: 75589 gagctctgtctgtggaggggtagtagtttccgcttcctggagggttgagtgaggtgagg
75648

Query: 67 agagtaactttgggtcagggattctcactagcagcgatcatggccagga 113
 |
Sbjct: 75649 agagtaactttgggtcagggattctcactagcagcgatcatggccagga 75695

M20 (follikulär)

Human DNA sequence from clone RP11-384P3 on chromosome 10, complete
sequence [Homo sapiens]
Length = 119526

Score = 301 bits (152), Expect = 2e-79
Identities = 183/198 (92%)

Strand = Plus / Minus

Query: 12 ctccagcccgaagaacttacgcnnnnnnngattcatcatgcattttcatccctcttaann
71 |
Sbjct: 95746 ctccagcccgaagaacttacgcTTTTTTTgattcatcatgcattttcatccctcttaatt
95687

Query: 72 nnnncactcattcttctactttactgtaagttctctttcctctcctacttatctctcca
131 |
Sbjct: 95686 tttttgactcattcttctactttactgtaagttctctttcctctcctacttatctctcca
95627

Query: 132 ggctgggctgctaaccacttctttggctaacaatgcttcttctcctgtaagttgaaat
191 |
Sbjct: 95626 ggctgggctgctaaccacttctttggctaacaatgcttcttctcctgtaagttgaaat
95567

Query: 192 tccaggggtgtgctggag 209
|
Sbjct: 95566 tccaggggtgtgctggag 95549

M10 (follikulär)

Homo sapiens chromosome 17, clone RP11-343K8, complete sequence
Length = 191957

Score = 240 bits (121), Expect = 3e-61
Identities = 121/121 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 9 gctctcctgggagagagcttcaattctcaacctactaagttgaaggtgatgggtctatat
68 |
Sbjct: 73176 gctctcctgggagagagcttcaattctcaacctactaagttgaaggtgatgggtctatat
73117

Query: 69 ctaagtggcagacagagataagggataggtgtctacaggggcaagatttggagccaggag
128 |
Sbjct: 73116 ctaagtggcagacagagataagggataggtgtctacaggggcaagatttggagccaggag
73057

Query: 129 a 129
|
Sbjct: 73056 a 73056

M12 (papillär)

Homo sapiens chromosome 14 clone CTD-2207P18 map 14q24.3, complete
sequence
Length = 111234

Score = 454 bits (229), Expect = e-125
Identities = 229/229 (100%)
Strand = Plus / Minus

```
Query: 8      agctctcctggggagaggaattcagggctggaggtccagttacttccaagcaagaaaaat
67          |||
Sbjct: 105193 agctctcctggggagaggaattcagggctggaggtccagttacttccaagcaagaaaaat
105134
```

```
Query: 68      ccctggaattctttcaggagtctgggtctcagcaaagggggccgaaatgtggccttggt
127          |||
Sbjct: 105133 ccctggaattctttcaggagtctgggtctcagcaaagggggccgaaatgtggccttggt
105074
```

```
Query: 128     tttggtccttattttaccaaattagctcaggttctggtagacctctggctgccaacattat
187          |||
Sbjct: 105073 tttggtccttattttaccaaattagctcaggttctggtagacctctggctgccaacattat
105014
```

```
Query: 188     tccagtgagacatggaaaagcagtgagtttgcctgggagtcaggaga 236
|||
Sbjct: 105013 tccagtgagacatggaaaagcagtgagtttgcctgggagtcaggaga 104965
```

M15 (follikulär)

Homo sapiens chromosome 17, clone RP11-343K8, complete sequence
Length = 191957

Score = 240 bits (121), Expect = 3e-61
Identities = 121/121 (100%)
Strand = Plus / Minus

```
Query: 9      gctctcctgggagagagcttcaattctcaacctactaagttgaaggtgatggtgctatat
68          |||
Sbjct: 73176  gctctcctgggagagagcttcaattctcaacctactaagttgaaggtgatggtgctatat
73117
```

Query: 69 ctaagtggcagacagagataagggataggtgtctacaggggcaagatttggagccaggag
128 |||||
Sbjct: 73116
ctaagtggcagacagagataagggataggtgtctacaggggcaagatttggagccaggag73057

Query: 129 a 129
|
Sbjct: 73056 a 73056

Mus musculus villin (Vil), mRNA
Length = 3051

Score = 38.2 bits (19), Expect = 2.4
Identities = 19/19 (100%)
Strand = Plus / Minus

Query: 20 agagagcttcaattctcaa 38
|||
Sbjct: 2543 agagagcttcaattctcaa 2525

M19 (papillär)

Homo sapiens chromosome 14 clone CTD-2207P18 map 14q24.3, complete
sequence
Length = 111234

Score = 375 bits (189), Expect = e-101
Identities = 219/230 (95%), Gaps = 1/230 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 8 agctctcctggggagaggaattcagggctggaggtccagttacttccaagcaagaaaaat
67 |||||
Sbjct: 105193 agctctcctggggagaggaattcagggctggaggtccagttacttccaagcaagaaaaat
105134

Query: 68 ccntggaattctntcagcaggtctgggtctcagcaaagggggccnaaatgtggcccttggt
127 || ||||| ||| |||||
Sbjct: 105133 ccctggaattctttcagcaggtctgggtctcagcaaagggggccgaaatgtggcccttggt
105074

Query: 128 tttggtccttattnaccaaattaactcaggttctggtaacnacctctggntgccaacatta
187 ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Sbjct: 105073 tttggtccttatttaccaaattagctcaggttctggta-gacctctggctgccaacatta
105015

Query: 188 ttccagtgagacatggaaaagcagtgagtggtgcctgggagtnccaggaga 237
|||
Sbjct: 105014 ttccagtgagacatggaaaagcagtgagttgctgcctgggagtnccaggaga 104965

M1 (papillär)

Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome

Length = 16567

Score = 880 bits (444), Expect = 0.0

Identities = 444/444 (100%)

Strand = Plus / Minus

Query: 12 ctcctctatataaatgcgtagggggttttagttaaatgtcctttgaagtataacttgaggag

|||||

Sbjct: 1553 ctcctctatataaatgcgtagggggttttagttaaatgtcctttgaagtataacttgaggag

1494

Query: 72 ggtgacgggcggtgtgtacgcgcttcagggccctggtcaactaagcactctactctcagt

131

|||||

Sbjct: 1493 ggtgacgggcggtgtgtacgcgcttcagggccctggtcaactaagcactctactctcagt

1434

Query: 132 ttactgctaaatccaccttgcacccttaagtttcataagggctatcgtagttttctgggg

191

|||||

Sbjct: 1433 ttactgctaaatccaccttgcacccttaagtttcataagggctatcgtagttttctgggg

1374

Query: 192 tagaaaatgtagccatttcttgccacctcatgggctacaccttgacctaacgtctttac

251

|||||

Sbjct: 1373 tagaaaatgtagccatttcttgccacctcatgggctacaccttgacctaacgtctttac

1314

Query: 252 gtgggtacttgcgcttactttgtagccttcacaggggttgctgaagatggcggtatata

311

|||||

Sbjct: 1313 gtgggtacttgcgcttactttgtagccttcacaggggttgctgaagatggcggtatata

1254

Query: 312 ggctgagcaagaggtggtgaggttgatcggggtttatcgattacagaacaggctcctcta

371

|||||

Sbjct: 1253 ggctgagcaagaggtggtgaggttgatcggggtttatcgattacagaacaggctcctcta

1194

Query: 372 gagggatatgaagcaccgccaggctcctttgagttttaagctgtggctcgtaggttctgg

431

|||||

Sbjct: 1193 gagggatatgaagcaccgccaggctcctttgagttttaagctgtggctcgtaggttctgg

1134

Query: 432 cgagcagttttggtgatttaactg 455

|||||

Sbjct: 1133 cgagcagttttggtgatttaactg 1110

M2 (papillär)

Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome
Length = 16567

Score = 476 bits (240), Expect = e-132
Identities = 243/244 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 13 ctcctctagaggggatatgaagcaccgccagggtcctttgagttttaagctgtggctcgtag
|||||
Sbjct: 1201 ctcctctagaggggatatgaagcaccgccagggtcctttgagttttaagctgtggctcgtag
1142

Query: 73 tgttctggcgagcagttttgttgatttaactggtgaggttagggctaagcatagtggg
132
Sbjct: 1141 tgttctggcgagcagttttgttgatttaactggtgaggttagggctaagcatagtggg
1082

Query: 133 tatctaatacccagcttgggtcttagctattgtgtgttcagatatgttaaagccactttcg
192
Sbjct: 1081 tatctaatacccagcttgggtcttagctattgtgtgttcagatatgttaaagccactttcg
1022

Query: 193 tagtctatatttgtgtcaactggagttttttacaactcaggtgagtttagctttattggg
252
Sbjct: 1021 tagtctatatttgtgtcaactggagttttttacaactcaggtgagtttagctttattggg
962

Query: 253 gagg 256
||||
Sbjct: 961 gagg 958

M3 (follikulär)

Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome
Length = 16567

Score = 476 bits (240), Expect = e-132
Identities = 243/244 (99%)
Strand = Plus / Plus

Query: 14 cctccccaataaagctaaaactcacctgagttgtaaaaaactccagttgacacaaaatag
|||||
Sbjct: 958 cctccccaataaagctaaaactcacctgagttgtaaaaaactccagttgacacaaaatag
1017

Query: 74 actacgaaagtggctttaacatatctgaacacacaatagctaagacccaaactgggatta
133 |
Sbjct: 1018 actacgaaagtggctttaacatatctgaacacacaatagctaagacccaaactgggatta
1077

Query: 134 gataccccactatgcttagccctaaacctcaacagttaaatcaacaaaactgctcgccag
193 |
Sbjct: 1078 gataccccactatgcttagccctaaacctcaacagttaaatcaacaaaactgctcgccag
1137

Query: 194 aacactacgagccacagcttaaaaactcaaaggacctggcggtgcttcatgtccctctaga
253 |
Sbjct: 1138 aacactacgagccacagcttaaaaactcaaaggacctggcggtgcttcatatccctctaga
1197

Query: 254 ggag 257
|
Sbjct: 1198 ggag 1201

M21 (papillär)

Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome
Length = 16567

Score = 476 bits (240), Expect = e-132
Identities = 243/244 (99%)
Strand = Plus / Minus

Query: 13 ctctctagagggacatgaagcaccgccaggctcctttgagttttaagctgtggctcgtag
|
Sbjct: 1201 ctctctagagggatgatgaagcaccgccaggctcctttgagttttaagctgtggctcgtag
1142

Query: 73 tgttctggcgagcagttttggtgatttaactggtgaggttagggctaagcatagtggg
132 |
Sbjct: 1141 tgttctggcgagcagttttggtgatttaactggtgaggttagggctaagcatagtggg
1082

Query: 133 tatctaataccagtttgggtcttagctattgtgtgttcagatatgttaaagccactttcg
192 |
Sbjct: 1081 tatctaataccagtttgggtcttagctattgtgtgttcagatatgttaaagccactttcg
1022

Query: 193 tagtctatTTTgtgtcaactggagttttttacaactcaggtgagttttagctttattggg
252 |
Sbjct: 1021 tagtctatTTTgtgtcaactggagttttttacaactcaggtgagttttagctttattggg
962

Query: 253 gagg 256
 |
Sbjct: 961 gagg 958

M22 (papillär)

Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome
 Length = 16567

Score = 323 bits (163), Expect = 6e-86
Identities = 224/246 (91%), Gaps = 2/246 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 13 ctctctagagggacatgaagcaccnncagganccttcgagttntaagctgnggctcgta
 |
Sbjct: 1201 ctctctagagggatgatgaagcaccgccagg-tcctttgagttttaagctgtggctcgta
1143

Query: 73 gtgttctggcgagcagttaatgttgatttaactgttgaggttaagggctaagcatannng
132 |
Sbjct: 1142 gtgttctggcgagcagttt-tgttgatttaactgttgaggtttagggctaagcatagtgg
1084

Query: 133 ggtatctaataccnannttgggtcttaactattgtgtgttcagatgtgtnaaagccacttt
192 |
Sbjct: 1083 ggtatctaatacccagtttgggtcttagctattgtgtgttcagatatgttaaagccacttt
1024

Query: 193 ngtagtctatthttgtgtcaactggagttttttacaactcaggtgagttttagctttattg
252 |
Sbjct: 1023 cgtagtctatthttgtgtcaactggagttttttacaactcaggtgagttttagctttattg
964

Query: 253 gggagg 258
 |
Sbjct: 963 gggagg 958

3.6. Northern-Blot-Hybridisierung

In einem ersten Schritt wurde die Methode mittels Hybridisierung der Zellreihen-mRNA mit GPDH (Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase) überprüft. Die Aktivität der GPDH ist in nahezu jeder menschlichen Zelle nachweisbar, wodurch sich das Transkript dieses Enzym zur Überprüfung des Versuchsaufbaus eignet.

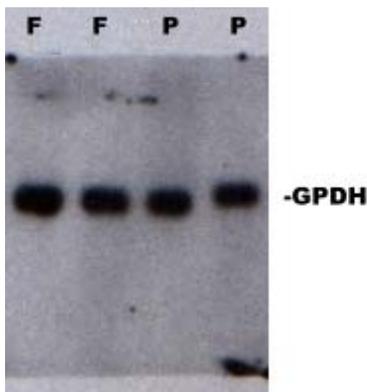


Abbildung 7: Hybridisierung der folliculären Zellreihe (F) und der papillären Zellreihe (P) zur Überprüfung der Methode mit GPDH.

Anschließend wurden die Zellreihen mit den markierten Plasmid-DNA-Sonden hybridisiert. Dabei konnten allerdings nur geringe Unterschiede in der Expressionsstärke festgestellt werden.

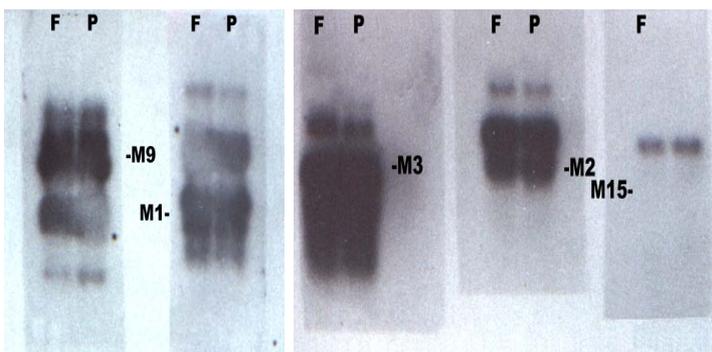


Abbildung 8: Hybridisierung der Zellreihen mit markierten Plasmid-DNA-Sonden. Aufgetragen wurden jeweils 5µg RNA. F kennzeichnet die folliculäre Zellreihe, P die papilläre.

Anhand der Hybridisierung der Zellreihen konnten, wie oben auf den Bildern zu erkennen, die Ergebnisse des Differential Displays mit dem Schilddrüsenkarzinomgewebe nicht eindeutig verifiziert werden.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch den Vergleich der Genexpression papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomgewebes mittels der Methode des Differential Displays mögliche Ursachen für deren unterschiedliche Metastasierungswege zu finden.

Die Methode des Differential Displays wurde 1992 von Liang und Pardee entwickelt. Charakterisiert ist das Differential Display durch die Möglichkeit, schnell nahezu alle in einer Zelle bzw. in einer Gewebeprobe exprimierten mRNA-Moleküle mit denen einer anderen Zelle bzw. Gewebeprobe hinsichtlich ihrer qualitativen und quantitativen Unterschiede zu vergleichen. Grundlage hierfür ist die PCR, durch die alle in einer Zelle exprimierten Gene einer Untersuchung zugänglich gemacht werden können. Damit wird nicht nur die Untersuchung jeglicher Veränderungen der Genexpression im Rahmen zellulärer Prozesse, sondern auch die Identifizierung neuer Gene ermöglicht .

Neben einer eingeschränkten Reproduzierbarkeit ist insbesondere die in Frage gestellte Sensitivität gegenüber in geringeren Mengen vorhandenen mRNAs ein häufiger Kritikpunkt am Differential Display (Lievens S, 2001).

Problematisch gestaltet sich die Erzeugung falsch-positiver Ergebnisse, die zum Teil durch die kompetitive Besetzung der Primer durch verschieden stark exprimierte mRNAs erklärt werden konnte (Panayotis L, 1998). Die überwiegende Anzahl falsch-positiver Ergebnisse gilt als Resultat einer unspezifischen und ineffizienten Amplifikation aufgrund der kombinierten Verwendung kurzer Primer mit niedrigen Annealing-Temperaturen während der PCR (Zhao S, 1995). Ergänzend dazu zeigte eine Untersuchung, daß die Rate falsch-positiver Ergebnisse deutlich gesenkt werden kann, wenn jede Probe mindestens zweimal mittels Differential Display untersucht wird (Stein J, 2002). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich durchgeführt.

Als Konkurrenz zum Differential Display gilt die DNA-Chip-Methode, die auch unter den Bezeichnungen BioChips-, Array- oder GeneChips-Methode, bekannt ist.

Das zugrundeliegende Konzept ist ähnlich dem des Northern oder Southern Blots. Auf dem DNA-Chip sind bis zu 30.000 bekannte cDNA-Sequenzen angeordnet. Eine Probe, meist ein Gemisch von cDNA-Fragmenten, wird dann mittels Hybridisierung mit dem Chip analysiert

und so auf ihre Genexpression untersucht. Diese Methode bietet die Möglichkeit, zeitgleich mehrere tausend Gene vergleichen zu können.

Die Schwäche der Chips, vor allem in Hinblick auf die dieser Arbeit zugrunde liegenden Zielsetzung, besteht darin, daß sie nicht zur Entdeckung neuer Gene geeignet sind. Die Ergebnisse der Experimente sind vielmehr dadurch begrenzt, daß nur bereits bekannte Sequenzen auf den Chips fixiert werden können.

Die DNA-Chip-Technologie gilt als das technisch anspruchvollste und teuerste Verfahren auf dem Gebiet der Genexpressionsanalyse (Kling J, 2002). Eine Mehrfachverwendung der Chips ist möglich, bedeutet allerdings eine erhebliche Sensitivitätseinbuße. Die notwendigen großen Mengen poly-A-RNA sind nicht immer vorhanden und auch dieser methodische Ansatz beinhaltet die Problematik falsch-positiver Ergebnisse.

Trotz aller genannten Einschränkungen bot die Methode des Differential Displays nach ausgiebiger Prüfung die entscheidenden Vorteile für die vorliegende Arbeit.

Grund dafür war zum einen die Begrenzung der zur Verfügung stehenden Mittel. Überdies bestand die Zielsetzung dieser Arbeit nicht nur in einem Vergleich der Genexpression papillärer und follikulärer Zellen, sondern insbesondere in der Identifizierung neuer Gene, die für die Unterschiede im Tumorverhalten der Schilddrüsenkarzinome bedeutsam sein konnten. Letzteres kann mit der Chip-Technologie nicht erreicht werden, da sie durch die Information begrenzt ist, die in Form von cDNAs auf dem Chip vorgehalten werden kann, in diesem Fall ausschließlich bereits bekannte Sequenzen (Stein J, 2002).

Zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse wurde auf niedrige Annealing-Temperaturen während der PCR verzichtet und jede einzelne Probe mehrfach untersucht. Zusätzlich wurden die Ergebnisse, die mit dem Differential Display gefunden wurden, in einem weiteren Schritt im Northern Blot analysiert und verifiziert.

Zur Überprüfung der Ergebnisse im Northern Blot mußte auf follikuläre und papilläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien zurückgegriffen werden, da das Schilddrüsenkarzinomgewebe für einen weiteren Arbeitsschritt nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stand. Die Ergebnisse der Untersuchung im Differential Display ließen sich unter diesen Bedingungen im Northern Blot nur in eingeschränktem Maße reproduzieren. Da aber bei mehrfacher Analyse der Gewebeproben mittels Differential Displays stets eindeutige Ergebnisse vorlagen, erscheint das Vorhandensein falsch-positiver Ergebnisse als sehr unwahrscheinlich.

Die Durchführung des Differential Displays mit vier verschiedenen Primern (A₁-A₄) zeigte insgesamt 311 Banden von denen 50, also 16,7%, auf eine interessante Abweichung der Genexpressionen zwischen dem untersuchten papillären und follikulären Karzinomgewebe hinwiesen. Letztendlich konnten 21 dieser DNA-Fragmente erfolgreich kloniert und anschließend sequenziert werden. Zehn der sequenzierten DNA-Fragmente konnten bereits bekannten Genen zugeordnet werden, die elf verbleibenden sind bisher unerforscht.

Die auf diese Weise gefundenen mRNA-Sequenzen zeigten für follikuläre Schilddrüsenkarzinome im Vergleich zu papillären eine erhöhte Expression von homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3) mRNA, cDNA FLJ25150, highly similar to homo sapiens BNPI mRNA for brain specific Na⁺-dependent inorganic phosphat cotransporter, homo sapiens serine/threonine protein kinase KP78 splice variant CTAK 75a mRNA, homo sapiens hypothetical gen supported by AK095249 (LOC284844) mRNA und Mus musculus villin (Vil), mRNA.

Das papilläre Schilddrüsenkarzinomgewebe wies eine deutlich gesteigerte Expression von homo sapiens hypothetical protein FLJ 12439, mRNA und homo sapiens hypothetical gene supported by AK090401 (LOC283721) mRNA auf.

Zu homo sapiens hypothetical protein FLJ 12439, mRNA, konnten keine weitergehenden Veröffentlichungen gefunden werden.

Arbeiten des International Human Genome Sequencing Consortium bezüglich des homo sapiens hypothetical gene supported by AK090401 und homo sapiens hypothetical gene supported by AK095249 sind ebenfalls noch nicht publiziert.

Insgesamt kann somit die mögliche Bedeutung der gesteigerten Expression dieser drei mRNAs im Hinblick auf das Tumorverhalten des papillären bzw. follikulären Schilddrüsenkarzinoms zum derzeitigen Zeitpunkt nicht beurteilt werden (NBCI News Viewer; Genbank).

Im Bezug auf die cDNA FLJ25150, highly similar to homo sapiens BNPI mRNA for brain specific Na⁺-dependent inorganic phosphat cotransporter, wurde mittels Northern Blot nachgewiesen, daß sie vorwiegend im Gehirn vorkommt. Die Bedeutung dieses Produkts, mit

seinen bisher nachgewiesenen Funktionen, konnte bei der Untersuchung der unterschiedlichen Metastasierungswege der Schilddrüsenkarzinome nicht eingeordnet werden.

Recherchen bezüglich der homo sapiens serine/threonine protein kinase KP78 splice variant CTAK 75a mRNA ergaben eine Homologie zur homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3) mRNA (Drewes, 1998).

Die essentielle Rolle der Mikrotubuli in der gesunden Zelle besteht in der Regulation von Form und Polarität der Zelle während der Differenzierung und Chromosomenteilung innerhalb der Mitose, sowie der Bereitstellung der Wege für den intrazellulären Organellentransport (Sato-Harada R, 1996). Während dieser Prozesse unterliegen die Mikrotubuli ständigen Umbauvorgängen, die den Begriff der dynamischen Instabilität prägten und die Grundlage der Funktionsweise der Mikrotubuli bilden (Drewes G, 1997). Die Regulierung der Funktionen der Mikrotubuli, der Aufrechterhaltung ihrer dynamischen Instabilität, wird durch Mikrotubuli-assoziierte-Proteine (MAP) gewährleistet. Die Phosphorylierung der MAP beeinflusst die sonst stabilisierende Wirkung dieser Proteine. In mitotischen Zellen wurde zum Beispiel eine vielfach gesteigerte Umsatzrate der Mikrotubuli mit einem extrem erhöhten Phosphorylierungsgrad nachgewiesen (Preuss U, 1995).

Diese Phosphorylierung, die die Absonderung der MAP von den Mikrotubuli katalysiert, erfolgt vor allem durch MAP/microtubule affinity-regulating kinase (MARK).

Da die abnormale Phosphorylierung des Mikrotubuli-assoziierten-Proteins tau, das nur in neuronalen Zellen nachgewiesen wurde, eine entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankungen einnimmt, betreffen die meisten Publikationen zu diesem Themenkomplex das MAP tau. Für MARK wurde jedoch nachgewiesen, daß es neben tau auch ubiquitär vorkommende MAPs mit gleichen Auswirkungen phosphoryliert (Illenberger S, 1996).

Daran läßt sich bereits eine entscheidende Rolle der MARK bei der Kontrolle der Dynamik des Zytoskeletts und der damit verbundenen Aufrechterhaltung der Zellpolarität erkennen (Ebner A, 1999).

Eine übersteigerte Expression von MARK zeigte in einigen Zellen dramatische Konsequenzen, mit progredienter Disorganisation des Zytoskeletts und teils folgendem Zelltod, die mit der Höhe des Expressionsgrads von MARK korrelierten.

Bereits frühere Veröffentlichungen zu MARK3 wiesen auf dessen vermehrte Bildung nach Reizung mit DNA-schädigenden Substanzen hin. Zusätzlich zeigten frühere Arbeiten,

induziert durch chemische Karzinogenese, den Verlust der Zellpolarität in fetalen Pankreaszellen, gefolgt von einem kompletten Verlust von MARK3 in fetalen Pankreaskarzinomzellen (Ono T, 1997; Parsa I, 1988).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß MARKs nur in physiologischer Expression in Verbindung mit korrekter Platzierung innerhalb der Zelle ein Parameter für die gesicherte Funktion des Zytoskeletts und für die Differenzierung der Zellen darstellen. Eine übermäßige Produktion allerdings bedingt die Zerstörung physiologischer Abläufe im Rahmen der Zellorganisation bis hin zum möglichen Zelltod.

Die im Vergleich zu der papillären Schilddrüsenkarzinom-Zellreihe gesteigerte Expression von homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3 (MARK3) mRNA bei dem follikulären Gewebe in der vorliegenden Arbeit läßt zumindest auf eine erhöhte Phosphorylierung der MAPS und daraus folgend auf eine erhöhte Instabilität der Mikrotubuli schließen. Es wurde nicht überprüft, inwiefern es zu einer Dislokation von MARK3 in den betroffenen Zellen kam, so daß ein direkter Vergleich zu den Beobachtungen von Parsa (Cancer Research 1988) nicht gezogen werden kann. Die vermehrte Instabilität der Mikrotubuli und die daraus folgenden Störungen der Zellphysiologie könnten Hinweis darauf sein, daß besonders die Kontrolle einer physiologischen Angiogenese auf die ausgewogene Expression von MARK3 angewiesen ist. Durch eine Störung der Zellphysiologie in Form vermehrter Expression von MARK3 könnte die überwiegende Expression proangiogenetischer Faktoren, wie zum Beispiel VEGF, FGF oder Angiopoietin, oder die verminderte Expression inhibitorischer Faktoren, wie Thrombospondin-1 oder Angiostatin, mit den Folgen einer zügigen Neovaskularisation und damit verbundener Bahnung einer hämatogenen Metastasierung, wegweisend beeinflusst werden.

Zu den analysierten Genen, denen entsprechende Sequenzen von cDNA-Clonen zugeordnet werden konnten, werden zur Zeit Analysen in verschiedenen Zentren, Sanger Centre, Hinxton, Cambridgeshire, Multimegabase Sequencing Centre, Seattle, durchgeführt. Veröffentlichungen dazu liegen bisher nicht vor (Genbank).

Hingewiesen sei noch auf die Homologie einer mRNA Sequenz zu Mus musculus villin (Vil), mRNA. Villin wird mit Reorganisationsprozessen nach Zellschädigungen in Zusammenhang gebracht, ist aber hauptsächlich in Niere und Darmgewebe lokalisiert (Ferarry, 1999), so daß

sich ein direkter Zusammenhang mit den Metastasierungsprozessen der Schilddrüse nicht eindeutig herstellen läßt.

Zusammenfassend kann damit festgestellt werden, daß im Rahmen der vorliegenden Arbeit deutliche Unterschiede in der Genexpression zwischen follikulären und papillären Schilddrüsenkarzinomzellen gefunden werden konnten.

Wie erwartet, wurden dabei nicht nur in ihrer Funktion bekannte Gene gefunden, sondern auch einige bis dato weitgehend unerforschte. Die Bedeutung dieser für die Unterschiede im Metastasierungsverhalten papillärer und follikulärer Schilddrüsenkarzinome muß durch weiterführende Studien geklärt werden.

Eine interessante Rolle im Sinne der Fragestellung nimmt vor allem MARK3 ein, dessen übermäßige Expression eventuell als ein Faktor für die überwiegend hämatogen ablaufende Metastasierung des follikulären Karzinoms in Frage kommt. Die endgültige Klärung dieses Sachverhalts bedarf allerdings noch weiterer Forschungstätigkeit.

5. Verzeichnis der Abkürzungen

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	basepair
cDNA	copy Desoxyribonucleicacid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonucleotidacid
g	Erdbeschleunigung
GTP	Guanintriphosphat
kD	kilodalton
MGM	Molekulargewichtsmarker
mRNA	messenger Ribonucleicacid
N.	Nervus
PCR	Polymerase-chain-reaction
RAP	Random Arbitrary Primer
RNA	Ribonucleicacid
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodium-salt-citrate
TRH	Thyroidea-Releasing-Hormon
TSH	Thyroidea-stimulierendes-Hormon
TTP	Thymidintriphosphat
UTP	Uraciltriphosphat
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
V.	Vena
Vv.	Venae

6. Literaturverzeichnis

Altschul SF, Lipman DJ
Protein database searches for multiple alignments
Proc Natl Acad Sci USA (United States), Jul 1990, 87(14) p5509-13

Austoni M.
Thyroid papillary Karzinoma in identical twins
The Lancet 14; 1115, 1998

Böcker, Denk, Heitz
Pathologie, 2.Auflage
Urban und Fischer Verlag, 2001

Bunone G, Vigneri P, Mariani L, Butó S, Collini P, Pilotti S, Pierotti MA, Bongarzone
Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors
American Journal of Pathology 155; 1967-1976, 1999

Charib H
Fine needle aspiration biopsy of thyroid nodules
Mayo Clin Proc 69; 44-49, 1994

Dameron KM, Volpert OV, Bouck N
Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1
Science 265 ; 1582-4, 1994

Drewes G, Ebneith A, Preuss U et al.
MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption
Cell 89; 297-308, 1997

Drewes G, Ebneith A and Mandelkow Em
MAPs, MARKs and microtubule dynamic
TIBS 23; 307-311, 1998

Ebneith A, Drewes G, Mandelkow Em et al.
Phosphorylation of MAP2c and Map4 by MARK kinases leads to the destabilization of microtubules in cells
Cell Motil Cytoskeleton 44(3); 209-24, 1999

Erbar P.
Onkologie, 3.Auflage
Schattauer Verlag, 2001

- Farahati J, Mörtl M
Die Bedeutung des Lymphknotenstatus beim papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinom für den Nuklearmediziner
Zentralbl Chir 125; 830-34, 2000
- Farid NR, Shi Y and Zou M
Molecular basis of thyroid cancer
Endocrinology Review 15; 202-232, 1994
- Feldt-Rasmussen U
Iodine and cancer
Thyroid 11; 483-486, 2001
- Fellmer PT, Sato K, Tanaka R, Okamoto T
Vascular endothelial growth factor-C gene expression in papillary and follicular thyroid carcinomas
Surgery 126(6); 1056-1061, 1999
- Ferary E, Cohen-Tannoudji M, Pehau-Arnaudet G
In vivo, villin is required for Ca(2+)-dependent F-actin disruption in intestinal brush borders
J Cell Biol 146(4); 819-830, 1999
- Ferrara N, Houk K, Jakeman I, Leung D
Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins
Endocrine Reviews 13; 18-32, 1992
- Fidler IJ, Hart IR
Biological diversity in metastatic neoplasms origins and implications
Science 217 ; 998-1001, 1982
- Folkman J
Tumor angiogenesis
The molecular basis of cancer 1995, 206-232
- Folkman J
Tumor angiogenesis: therapeutic implications
New England Journal of medicine 285; 1182-6, 1971
- Folkman J
Clinical Application of Research on Angiogenesis
The New England Journal of medicine 333; 1758-1763, 1995
- Franceschi S, Boyle P
The epidemiology of thyroid carcinoma
Crit. Review in Oncogen 4; 25-52, 1993

- Görögh T, Folz BJ, Lippert BM, Gottschlich S, Externbrink J, Niemann AM
 Untersuchung zur Reproduzierbarkeit einer nichtradioaktiven DDRT-PCR-Methode
 zum Nachweis der Genexpression un Plattenepithelkarzinomzellen der oberen Luft-
 und Speisewege
 Laryngo-Rhino-Otol 76; 42-45, 1997
- Heinzerling LM, Feige K, Rieder s, Akens MK, Dummer R, Stranzinger G
 Tumor regression induced by intratumoral injection of DNA codiing for human
 interleukin-12 melanoma metastases in gray horses
 Journal of Molecular Medicine 78; 692-702, 2001
- Illenberger S, Drewes G, Trinczek B et al.
 Phosphorylation of microtubule-associated proteins MAP2 and MAP4 by the protein
 kinase p110marker
 J. Biol. Chem. 271; 10834-10843, 1996
- Ishiwata I, Sudo T, Kiguchi K
 Tumor angiogenesis factor produced by cancer cells
 Human cell 12(1): 37-46, 1999
- Ishiwata T, Iino Y, Takei H
 Tumor angiogenesis as an independent prognostic indicator in human papillary thyroid
 carcinoma
 Oncology Reports 5: 1343-1348, 1998
- Ito T, Kito K, Adati N, Metusi Y, Hagiwara H, Sakaki y
 Fluorescent differential display arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an
 automated DNA sequencer
 FEBS Letters 351(12); 231-236, 1994
- Jin X, Bookstein R, Willis K, et al.
 Evaluation of endostatin antiangiogenesis gene therapy in vitro and in vivo
 Cancer Gene Ther (England), Dec 2001, 8(12) p982-9
- Kahn J, Ruiz R, Kershmann R
 A phase I/II study of recombinant platelet factor (rPF4) in patients with AIDS related
 Karposi's Sarkoma
 Proc Am Soc Clin Oncol 12; 50, 1993
- Kohn EC, Alessandro R, Spoonster J, Wersto RP, Liotta LA,
 Angiogenesis: role of Kalzium-mediated signal transduction
 Proc Natl Acad Sci USA 92; 1307-11, 1994
- Kurian KM, Watson Cj, Wyllif AH
 DNA Chip Technology
 Journal of Pathology 187; 267-271, 1999

- Kling J
Roll-your-own-microarrays
The Scientist 16; 51, 2002
- Liang P, Pardee AB
Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction
Science 257, 967-971, 1992
- Lievens S, Goormachtig S and Holsters M
A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation
Nucleic Acids Research 29; 3459-3468, 2001
- Mäkinen T, Jussila L, Veikkola T, Krpanen T
Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor 3
Nature Medicine 7, 2; 199-205, Feb. 2001
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J
Molecular cloning
Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1982
- Mann K
Diagnostik und Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome
Internist 43: 174-185, 2002
- Memon A, Darif M
Epidemiology of reproductive and hormonal factors in thyroid cancers
Int Journal Cancer 97; 82-89, 2002
- Nigel JP, Prevo R, Banerji S, Leek RD
Intratumoral Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer
Cancer Research 62; 1315-1320, 2002
- Nilsson M
Iodide handling by the thyroid epithelial cell
Exp Clin Endocrinol Diabetes 109; 13-17, 2001
- Ono T, Kawabe T, Sonta S
Assignment of MARK3 alias KP78 to human chromosome band 14q32.3 by in situ hybridization
Cytogenet Cell Genet 79: 101-102, 1997
- Onoda N, Ishikawa T, Yoshikawa K, Sugano S, Kato Y, Sowa M
Telomerase activity in thyroid tumors
Oncology Reports 5; 1447-1450, 1998

- Parsa I
Loss of a Mr 78,000 marker in chemically induced transplantable carcinomas and primary carcinoma of human pancreas
Cancer Res (United States), Apr 15 1988, 48(8) p2265-72
- Panayotis L, Hideyuki T, Tito F
Limitations of Differential Display
Biochemical and Biophysical Research and Communications 251; 653-56, 1998
- Papke K
Endokrine Organe, Stoffwechsel und Ernährung
Exaplan 2.Auflage
Urban Fischer Verlag, 1999
- Prabakaran D, Kim P, Kim K, Arvan P
Polarized secretion of thrombospondin in opposite to thyroglobin in thyroid epithelial cells
Journal of Biological Chemistry 268; 9041-48, 1993
- Preuss U, Döring F, Illenberg S et al.
Cell cycle dependent phosphorylation and microtubule binding of tau protein stably transfected into chinese hamster ovary cells
Biol. Cell 6; 1397-1410, 1995
- Ramsden JD
Angiogenesis in the thyroid gland
Journal of Endocrinology 166, 475-480, 2000
- Reiners C, Farahati J
I-131 therapy of thyroid cancer patients
Quart J Nucl Med; 43:324-335, 1999
- Reiners C, Biko J, Demidchik EP, Drozd V
Thyroid cancer after exposure to ionizing irradiation
The Thyroid and Environment, Schattauer 193-204, 2000
- Reiners C
Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Schilddrüsenkarzinoms
UNI-MED, 2003
- Risau W, Flamme I
Vasculogenesis
Anu Rev Cell Dev Biol 11; 73-91, 1995
- Sambrook J, Russell DW
Molecular Cloning
Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001

Sato-Harada R, Okabe S, Umeyama T et al.
Microtubule-associated proteins regulate microtubule function as the track for intracellular membrane organelle transports
Cell Struct Funct 21(5); 283-95, 1996

Schiebler, Schmidt, Zilles
Anatomie, 8.Auflage
Springer Verlag 1999

Schlumberger MJ
Papillary and follicular thyroid carcinoma
New Engl J Med 338:297-306, 1998

Sim K, O'Reilly M, Liang H, Fortier A, He W, Madsen J et al.
Recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer
Cancer Research 57; 1329-34, 1997

Soh E, Duh Q, Sobhi S, Young D, Epstein H et al.
VEGF expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83; 1336-1341, 1997

Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE
VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics
Nature Medicine 7, 2; 186-191, Feb. 2001

Stein J, Liang P
Differential Display technology: a general guide
Cellular and Molecular Life Sciences 59; 1235-1240, 2002

Swartz MA, Skobe M
Lymphatic function, Lymphangiogenesis, and Cancer Metastasis
Microscopy Research And Technique 55; 92-99, 2001

Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, et al.
Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines
Oncogene (England), Oct 19 1995, 11(8) p1569-79

Yen PM
Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action
Physiological Reviews 81(3); 1097-1142, Jul. 2001

Zetter BR
The cellular basis of site-specific tumor metastasis
New England Journal of medicine 322; 605-612, 1990

Zhang M, Martin KJ, Sheng S, Sager R
Expression genetics: A different approach do cancer diagnosis and prognosis
TIBTECH 16; 66-71, 1998

Zhao S, Ooi SL, Pardee AB
New primer strategy improves precision of differential display
Biotechniques 18; 842-850, 1995

7. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Friederike Buchbender, geb. Neufeldt

Geburtstag: 15.06.1978
Geburtsort: Lüneburg
Familienstand: verheiratet

Schulische Ausbildung:

1984-1985 Grundschole Lüneburg
1985-1988 Grundschole Monheim am Rhein
1988-1997 Annette-von-Droste-Hülshoff-Gymnasium Düsseldorf,
abgeschlossen mit Abitur
1993-1995 Scuola Germanica di Milano, Italien

Studium:

Okt. 1997 Einschreibung an der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf
Aug. 1999 Ärztliche Vorprüfung
Aug. 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Sonstige Aktivitäten:

Sep. 1999- Sep. 2004 Ratsfrau im Stadtrat der Stadt Monheim am Rhein
Okt. 1999 Aufnahme in die Begabtenförderung der Konrad-
Adenauer-Stiftung
Sep. 2001 Famulatur in der Chirurgie in Cape Coral, USA

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Röher und Herrn PD Dr. med. KM Schulte für die Stellung des Themas dieser Arbeit, die ständige Diskussionsbereitschaft, das kritische Korrekturlesen und ihre Geduld.

Mein Dank gilt darüber hinaus Herrn Dr. med. P.T. Fellmer für die Einführung in das experimentelle Arbeiten, seine Unterstützung und Geduld.

Weiterhin gilt mein Dank Frau M. Gyenes für ihre große Hilfe und Unterstützung bei der experimentellen Arbeit im Labor. Ihre andauernde und große Hilfsbereitschaft war für mich sehr wertvoll.