

„Der humane Natrium-Jodid-Symporter (hNIS):
Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der hNIS
mRNA-Expression und Analyse der Rolle als Antigen bei
autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen“

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des
akademischen Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin Sandra Katharina Wagner

aus Langerwehe

Berichter:

Prof. Dr. med. Werner A. Scherbaum, DDFI Düsseldorf

Prof. Dr. rer. nat. Fritz Kreuzaler, RWTH Aachen

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2002

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

*² Wie selten ist der Mensch mit dem Zustande zufrieden, in dem er sich befindet!
Er wünscht sich immer den seines Nächsten, aus welchem sich dieser ebenfalls
heraussehnt. ²*

Goethe, Wilhelm Meisters Lehrjahre, I, 14

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Die Rolle von Jodid für die Funktion und das Wachstum der Schilddrüse	1
1.2	Der exogene Jodstoffwechsel	2
1.3	Aufnahme und Verteilung von Jod im menschlichen Körper	3
1.4	Die thyreoidale Jodidaufnahme	3
1.5	Klonierung und molekulare Charakterisierung	6
1.6	Die thyreoidale hNIS-Expression	8
1.7	Auftreten des Symporters in extrathyreoidalen Geweben	10
1.8	Funktion und Regulation des Symporters	11
1.9	NIS bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen	12
1.10	NIS: Ein neues therapeutisches Gen?	13
2.	Fragestellung	14
3.	Material und Methoden	15
3.1	Bezugsquellen	15
3.1.1	Reagenzien	15
3.1.2	Geräte	19
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	20
3.2	Klonierung von PCR-Fragmenten zur Durchführung quantitativer Expressionsstudien	22
3.2.1	Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von hNIS bzw. GAPDH	22
3.2.2	Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten	24
3.2.3	Isolierung genomischer DNA aus einem Agarosegel	25
3.2.4	Einbau von DNA in einen Klonierungsvektor	25

3.2.5	Transformation der Vektorkonstrukte in kompetente <i>E.coli</i> -Zellen	26
3.2.6	Prinzip der Blau-Weiß-Selektion	26
3.2.7	Herstellung eines Bakterienstocks	27
3.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA	27
3.2.9	Durchführung eines Kontrollverdaus	28
3.2.10	Sequenzierung von cDNA-Klonen	28
3.3	Untersuchung der Expression des humanen Symporters	30
3.3.1	Northern Blot Analyse	30
3.3.1.1	Herstellung von DIG-gelabelten RNA-Sonden	30
3.3.1.2	Elektrophorese der RNA	31
3.3.1.3	Blotten der RNA (Kapillarblot über Nacht)	33
3.3.1.4	Hybridisierung mit DIG-gelabelten RNA-Sonden	33
3.3.1.5	Detektion	34
3.3.2	Kompetitive, semiquantitative RT-PCR	35
3.3.2.1	Synthese von Kontrollfragmenten	36
3.3.2.2	Cracking von Plasmiden	37
3.3.2.3	Kompetitive, semiquantitative RT-PCR	38
3.3.2.4	Quantitative Analyse der PCR-Produkte	40
3.3.3	Real-Time Polymerasekettenreaktion	41
3.3.3.1	Herstellung eines externen Standards	42
3.3.3.2	Auswahl spezifischer Primer und Hybridisierungssonden	43
3.3.3.3	Ermittlung der optimalen $MgCl_2$ -Konzentration sowie eines geeigneten Primerpaares für die Real-Time PCR auf hNIS	45
3.3.3.4	Optimierung der Real-Time PCR für GAPDH	47
3.3.3.5	Quantifizierung der Expression des Symporters	49
3.3.3.6	Ermittlung der PCR-Effizienz	49
3.4	Isolierung und Kultivierung thyreoidaler Primärkulturen	50
3.5	Durchführung der Stimulationsexperimente	51

3.6	Isolierung der Gesamt-RNA	51
3.6.1	Isolierung von RNA mit Trizol [®]	52
3.6.2	Isolierung der Gesamt-RNA mit dem RNeasy-Mini Kit	52
3.6.3	Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	53
3.6.4	Synthese komplementärer DNA (cDNA) mit der Expand [™] Reverse Transkriptase	54
3.6.5	Synthese von cDNA mit dem Bulk First Strand Reaction Mix	55
3.7	Untersuchung der funktionellen Aktivität von hNIS	56
3.7.1	Klonierung des humanen Natrium-Jodid-Symporters	56
3.7.2	Transfektion der Zelllinien FTC236 bzw. CHO mit dem "full length" Symporter	57
3.7.3	Studien zur Aufnahme von Na- ¹²⁵ Jodid	58
3.7.3	Inhibition der Aufnahme von ¹²⁵ Jodid durch Perchlorat, NaJ und Quabain	59
3.8	Immunpräzipitation mit dem [³⁵ S]-Methionin-markiertem CHO-hNIS Klon 6-11	60
3.8.1	[³⁵ S]-Methioninmarkierung der CHO-hNIS 6-11 Zellen	60
3.8.2	Autoradiographie	61
3.9	Rolle von hNIS-Antikörpern bei autoimmunen Schilddrüsenerkran- kungen	63
3.9.1	Expression und [³⁵ S]-Methioninmarkierung von hNIS	63
3.9.2	Radioligandenassay	64
3.10	Immunhistologie	65
3.11	Statistik	66

4.	Ergebnisse	67
4.1	Klonierung des humanen Natrium-Jodid-Symporters bzw. der humanen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase	67
4.2	Northern Blot Analyse	68
4.3	Analyse von Expressionsstudien mittels kompetitiver, semiquantitativer PCR	70
4.3.1	Kompetitive RT-PCR auf GAPDH zur Einstellung auf den Gleichen cDNA-Gehalt	71
4.3.2	Kompetitive RT-PCR auf hNIS zur Bestimmung des Einflusses von bTSH auf die Expression des Symporters	73
4.3.3	Einfluss von Forskolin auf die Expression des Symporters	75
4.4	Etablierung einer Real-Time PCR	77
4.4.1	Synthese von Standards für die Real-Time PCR	77
4.4.2	Optimierung der Real-Time PCR auf GAPDH	78
4.4.3	Optimierung der Real-Time PCR auf hNIS	82
4.4.4	Ermittlung der Inter- und Intra-Assayvariationskoeffizienten für die Real-Time PCR auf hNIS	87
4.4.5	Einfluss von Forskolin und bTSH auf die Expression des Symporters	90
4.4.5.1	Konzentrationsabhängigkeit für Forskolin	90
4.4.5.2	Konzentrationsabhängigkeit für bTSH	92
4.4.5.3	Zeitabhängigkeit für Forskolin und bTSH	93
4.4.6	Einfluss von TGF- β 1 und TNF- α auf die Expression des Symporters	95
4.5	Studien zur Aufnahme von Jodid	96
4.5.1	Transfektion der Zelllinie FTC236 bzw. CHO mit dem "full length"-Symporter	96
4.5.2	Basale Jodidaufnahme ausgewählter Klone	99

4.5.3	Zeitabhängigkeit zur Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$	100
4.5.4	Inhibition der Aufnahme von Jodid	101
4.5.4.1	Einfluss von unmarkiertem Natriumjodid auf die Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$	101
4.5.4.2	Einfluss von Perchlorat auf die Jodidaufnahme	103
4.5.4.3	Quabain: Ein Inhibitor der Jodidaufnahme	105
4.6	Immunhistochemie	107
4.7	Immunpräzipitation des $[^{35}\text{S}]$ -Methionin-markierten CHO-hNIS Klon 6-11	109
4.8	Rolle von hNIS-Antikörpern bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen	110
5.	Diskussion	113
6.	Zusammenfassung	122
7.	Literatur	124
	Anhang A	
	Anhang B	
	Anhang C	
	Anhang D	
	Anhang E	

Abkürzungen

AU	Arbitrary Unit
BLU	Boehringer Light Unit
bp	Basenpaar
bTSH	bovines Thyrotropin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA, copy DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FK	Forskolin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
hNIS	humaner Natrium-Jodid-Symporter
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
kb	Kilobase
KF	Kontrollfragment; Kompetitorfragment
min	Minute
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
ntc	no template control; Wasserkontrolle
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerasekettenreaktion

RNA	Ribonukleinsäure
rNIS	muriner Natrium-Jodid-Symporter
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
sek	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Std.	Stunde
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin, Tetrajodthyronin
Tg	Thyroglobulin
TSH	Thyrotropin
TSH-R	Thyrotropinrezeptor
V	Volt

1. Einleitung

1.1 Die Rolle von Jodid für die Funktion und das Wachstum der Schilddrüse

Die Bedeutung der Schilddrüse für den menschlichen Organismus ist durch die Jahrhunderte recht unterschiedlich interpretiert worden. Das Spektrum reicht von Schutz und Befeuchtung des Kehlkopfes, der Bewahrung des Gehirns vor zu starker Blutfülle bis hin zur Verschönerung, insbesondere der weiblichen Halslinie (Merke, 1971).

Das 1813 von Curtois entdeckte Element Jod wurde 1820 von Coindet erstmals bewusst als Schilddrüsenmedikament zur Verminderung der Kropfbildung eingesetzt. Zur gleichen Zeit stellte Fyfe fest, dass die seit alters her zur Kropfbehandlung eingesetzten Schwämme extrem jodhaltig sind. Ein neuer Abschnitt in der Jodforschung begann mit den Berichten des Freiburger Chemikers Baumann (1895). Er fand heraus, dass die in der Schilddrüse auftretenden organischen Verbindungen einen Jodgehalt von bis zu 10% aufwiesen. Damit wurde die Schilddrüse zum jodreichsten Organ des Körpers emporgehoben. Durch diesen Befund war die Erforschung des endogenen Jodstoffwechsels eingeleitet.

1901 gelang Oswald die Reindarstellung von Jodthyroglobulin, das er vor allem im Kolloid der Schilddrüse zu lokalisieren vermochte. 1915 gelang dem Chemiker Kendall nach alkalischer Lyse des Globulinkomplexes die Reindarstellung des eigentlichen Hormons Thyroxin (Tetraiodthyronin; T₄).

Die moderne Ära der Schilddrüsenforschung begann aber erst mit der Anwendung von Radiojodid (¹²⁵J bzw. ¹³¹J), welches direkte Einblicke in Stoffwechselvorgänge ermöglichte. 35 Jahre nach der Entdeckung des Schilddrüsenhormons Thyroxin (T₄) wurde ein weiteres schilddrüsenspezifisches Hormon entdeckt – Triiodthyronin (T₃).

Typisch für die beiden von der Schilddrüse synthetisierten Hormone ist der relativ hohe Anteil an Jodid. Während Jodid beim T₄ ca. 65% des Molekulargewichts ausmacht, so beträgt es beim T₃ immerhin noch 58%. Für die Synthese von Schilddrüsenhormonen muss der Jodstoffwechsel demnach eine besondere Rolle spielen.

Die Bedeutung von T3 und T4 liegt vor allem in der Kontrolle zahlreicher Stoffwechselvorgänge. Ihr Wirkungsspektrum umfaßt den Sauerstoffverbrauch, die Wärmeproduktion, das Wachstum, die Entwicklung, den Stoffwechsel von Lipiden, Kohlenhydraten und Proteinen. Die Wirkungsweise der Hormone an den einzelnen Organen und Stoffwechselsystemen ist relativ verschieden und hängt entscheidend von der vorliegenden Hormonkonzentration ab. Während die T3- bzw. T4-Konzentration bei einer euthyreoten (normalen) Stoffwechsellage als physiologisch bezeichnet wird, beschreiben unphysiologische bzw. pharmakodynamische Hormoneffekte eine Überschreitung des normalen Hormonangebots, hervorgerufen durch eine Hyperthyreose.

1.2 Der exogene Jodstoffwechsel

Der menschliche Organismus ist auf die Zufuhr von Jod angewiesen und braucht demnach besondere Mechanismen um es zu konzentrieren und metabolisieren. Jod ist ein relativ seltenes Element. Es macht lediglich $6,7 \times 10^{-6} \%$ der Erdoberfläche aus (Stecher, 1968).

Das Vorkommen von Jod ist regional sehr unterschiedlich. Dieser Unterschied beruht zum einen auf dem exogenen Jodkreislauf als natürlicher Jodquelle, ist andererseits aber auch abhängig von in zunehmendem Maße jodhaltigen Zivilisationsprodukten, wie jodhaltigen Medikamenten, Kosmetika, Kontrastmittel und jodiertem Brot.

Der exogene Jodkreislauf beginnt mit der Verdunstung von Jod aus dem Meerwasser bzw. der Oxidation an der Wasseroberfläche zu elementarem Jod, welches in die Atmosphäre abgegeben wird. Dieses fällt mit dem Regen auf das Land und wird dort, in Abhängigkeit von der Vegetation, in den verschiedenen Bodenschichten mehr oder weniger stark angereichert. Der Jodgehalt in den einzelnen Bodenschichten wird gefördert durch jodkonzentrierende Pflanzenteile, Humusbestandteile, dem Gehalt an jodreichen Seewasserorganismen sowie dem Regenfall.

Im Gegensatz dazu wird der Jodgehalt durch einen hohen Alkaligehalt des Bodens, dem Durchlaufwasser sowie durch Eisen und Mangan, die ihrerseits zu einer Verflüchtigung von Jod führen, vermindert.

1.3 Aufnahme und Verteilung von Jod im menschlichen Körper

Die Jodaufnahme eines gesunden Menschen variiert erheblich und beträgt in Gegenden mit extremen Jodmangel weniger als 10 µg täglich und reicht bis auf Werte von mehreren Gramm, bei Personen die jodhaltige Medikamente einnehmen.

Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt Kindern ab dem 10. Lebensjahr, Jugendlichen und Erwachsenen eine Jodzufuhr von 180-200 µg/Tag. Der Jodbedarf bei schwangeren bzw. stillenden Frauen liegt bei 230-260 µg/Tag. Er ergibt sich aus der Summe der Ausscheidung von Jod im Harn und im Stuhl.

Mit der Nahrung aufgenommenes Jod wird vor der Resorption im Darm zu Jodid reduziert. Nach der Resorption verteilt sich das gebildete Jodid innerhalb von 2 Stunden gleichmäßig auf den Extrazellulärraum. Das Verteilungsvolumen entspricht etwa 38% des Körpergewichts in Kilogramm (DeGroot, 1966). Intrazellulär finden sich nur geringe Mengen Jodid in den Erythrozyten und Knochen.

Der Verteilungsraum hängt im wesentlichen davon ab, in welchem Ausmaß andere Organe als die Schilddrüse Jodid aus ihm entnehmen und in sich anreichern. Neben der Schilddrüse vermögen weitere Organe wie die Nieren, die Magenschleimhaut, die Brust- und Speicheldrüse Jodid aufzunehmen. Des weiteren findet man eine Jodidaufnahme im Korioidplexus, im Ziliarkörper des Auges, in den Tränendrüsen, im Dünndarm, in der Haut sowie in der Plazenta.

1.4 Die thyreoidale Jodidaufnahme

Die Anreicherung des aus der Nahrung resorbierten Jodids in die Schilddrüse erfolgt über ein Natrium- und energieabhängiges Transportsystem, welches in der basolateralen Zellmembran der Thyreozyten lokalisiert ist (Taurog, 1996; Cavalieri, 1997). Wie bereits erwähnt, ist Jod die essentielle Komponente der Schilddrüsenhormone T3 und T4, die ihrerseits eine wichtige Rolle bei Stoffwechselvorgängen, während des Wachstumsprozesses und der Reifung einer Vielfalt an Organsystemen spielen.

Der aktive Jodidtransport in die Schilddrüse ist ein entscheidender und limitierender Schritt in der Biosynthese der Schilddrüsenhormone. Obwohl bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannt ist, dass der Transport von Jodid über einen spezifischen Natrium-abhängigen Jodidtransporter vermittelt wird, wurde dieser erstmals 1996 kloniert (Dai, 1996).

Der Transport von Jodid in thyreoidale Follikularzellen erfolgt entgegen des elektrochemischen Gradienten für Jodid. Der aktive Transportmechanismus, welcher an der basolateralen Membran der Thyreozyten lokalisiert ist, wird durch den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) vermittelt (Carrasco, 1993). Dabei wird ein Jodid-Ion (I^-) zusammen mit zwei Natrium-Ionen (Na^+) ins Zellinnere transportiert, wobei der transmembrane Natriumgradient als die treibende Kraft zur Jodidaufnahme fungiert (Eskandari, 1997).

Die Energie, die zum einen für den Transfer und zum anderen zum Aufbau des Gradienten benötigt wird, stammt aus einer Quabain-sensitiven Na^+/K^+ -ATPase.

Dem aktiven Jodidtransport ins Zellinnere folgt eine Translokation über die apikale Membran ins Kolloid, dem eigentlichen Ort der Schilddrüsenhormonsynthese. Dieser apikale Jodidtransport wird vermittelt über Pendrin, welches zur Gruppe der Chlorid-Jodid-Transporter gehört (Everett, 1997; Kopp, 1999; Scott, 1999; Suzuki, 1999; Bidart, 2000; Royaux, 2000). Im Gegensatz zum Natrium-Jodid-Symporter erfolgt die Translokation entlang eines Jodidgradienten und benötigt somit keine zusätzliche Energie (s. Abb. 1.1).

An der Zell-Kolloid-Interphase wird Jodid in Tyrosylreste des Thyroglobulingerüsts inkorporiert. Dieser Einbau beruht auf einer Verstoffwechslung von Jodid, die von der Thyroidperoxidase (TPO) katalysiert wird. Die Schilddrüsenhormone T3 und T4 entstehen aus der Verbindung zweier Jodtyrosinreste, welche anschließend im Kolloid gelagert werden. Bei Bedarf wird das jodierte Thyroglobulin über Endozytose in die Schilddrüsenfollikel aufgenommen. Die Schilddrüsenhormone werden nach der phagosomalen Lyse des Thyroglobulins (Tg) dem Blutstrom zugeführt. Alle Schritte, die notwendig sind zur Synthese von Schilddrüsenhormonen, können durch TSH stimuliert werden. Das schilddrüsenstimulierende Hormon (TSH) wird in der Hirnanhangdrüse gebildet und interagiert mit seinem spezifischen Rezeptor an der basolateralen Membran der Follikel über den zyklischen Adenosin-Monophosphatweg (cAMP-Weg) (s. Abb. 1.1; Carrasco, 1993; Weiss, 1984).

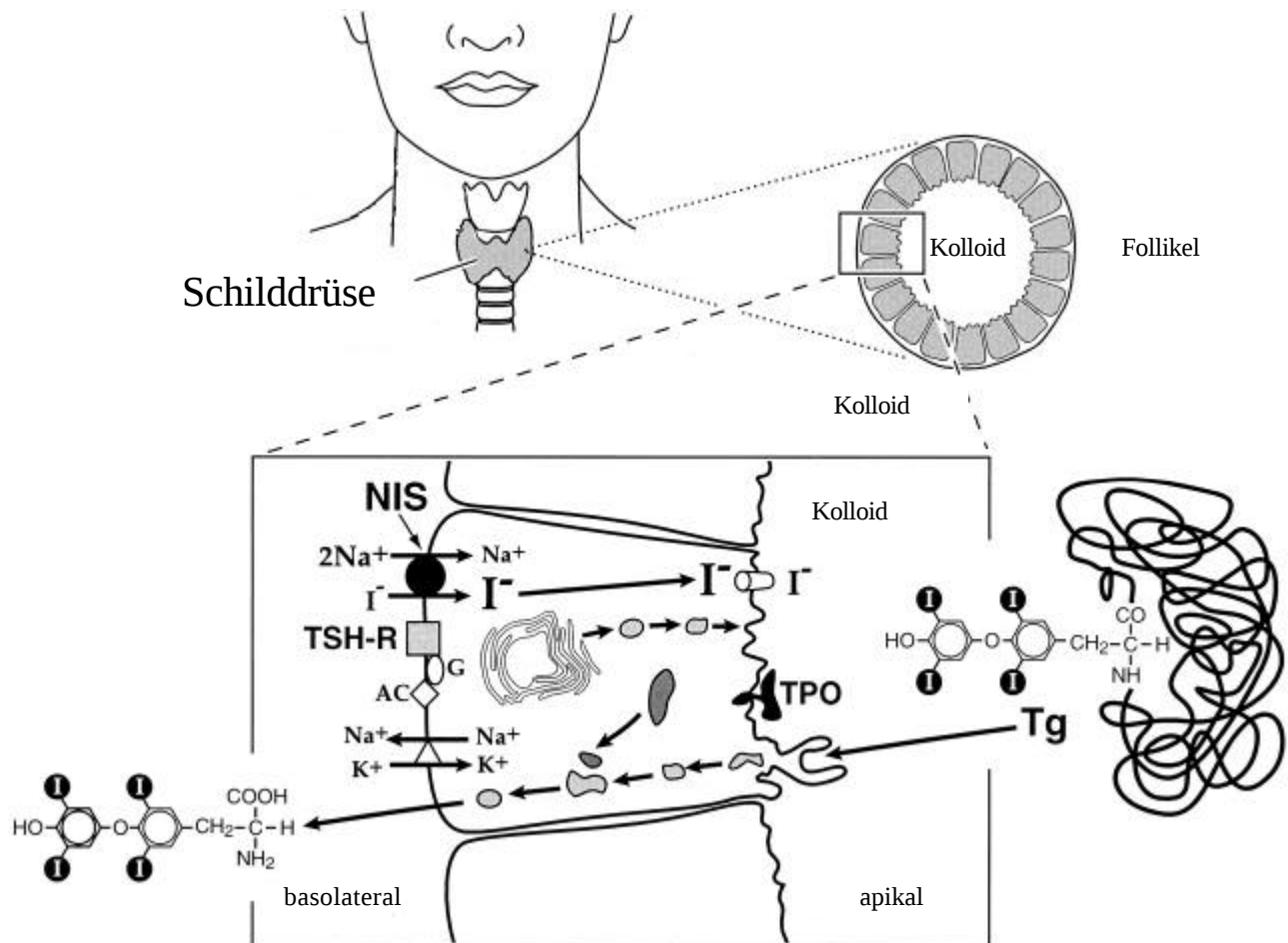


Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Biosynthese der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4). Die Schilddrüsenfollikel bestehen aus einer Epithelzellschicht, die das Kolloid umgibt. Links ist die basolaterale Zelloberfläche dargestellt, rechts die apikale Seite. Modifiziert nach De la Vieja (2000).

- ? : aktive Jodidakkumulation; vermittelt durch den Symporter (NIS)
- ? : Na⁺/K⁺-ATPase
- ? : Thyrotropinrezeptor (TSH-R)
- ? : Adenylatcyclase
- O : G-Protein
- : Jodidausstrom in Richtung Kolloid
- TPO : Katalyse der Verstoffwechslung von Jodid
- ? : Endozytose des jodierten Thyroglobulins (Tg), gefolgt von der phagosomalen Hydrolyse mit abschließender Sekretion der Schilddrüsenhormone in den Blutstrom

1.5 Klonierung und molekulare Charakterisierung

Nachdem der Symporter der Ratte zu Beginn der 90er Jahre aus einer cDNA-Bibliothek einer funktionellen Rattenthyreozytenzelllinie der Fischer Ratte (FRTL-5-Zellen) kloniert worden war, konnte 1996 die Sequenzabfolge des humanen Natrium-Jodid-Symporters (hNIS) aus einer humanen Schilddrüsen-cDNA-Bank ermittelt werden (Dai, 1996; Smanik, 1996).

Der humane Symporter ist lokalisiert auf Chromosom 9p12-13.2 und kodiert für ein Glykoprotein aus 643 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von 70-90 kd. Die kodierende Region umfasst 15 Exons, die von 14 Introns unterbrochen werden. Diese 15 Exons bilden eine 3,9 Kilobasen große messenger-RNA (mRNA; Smanik, 1997).

Als ein Mitglied der Natrium-abhängigen Transporterfamilie ist hNIS ein intrinsisches Membranprotein mit, wie in Abb. 1.2 dargestellt, 13 putativen Transmembrandomänen, einem ex-trazellulären Aminoterminus und einem intrazellulärem Carboxylterminus. Das Protein verfügt über drei potentielle N-gebundene Glykosilierungsstellen, wobei eine im vierten und die beiden anderen im letzten extrazellulären Loop lokalisiert sind (Levy, 1998).

Da die 5'-flankierende Region des hNIS-Genes bereits näher beschrieben wurde, könnten nun Untersuchungen durchgeführt werden, welche die molekularen Mechanismen der hNIS-Genregulation zu klären vermögen.

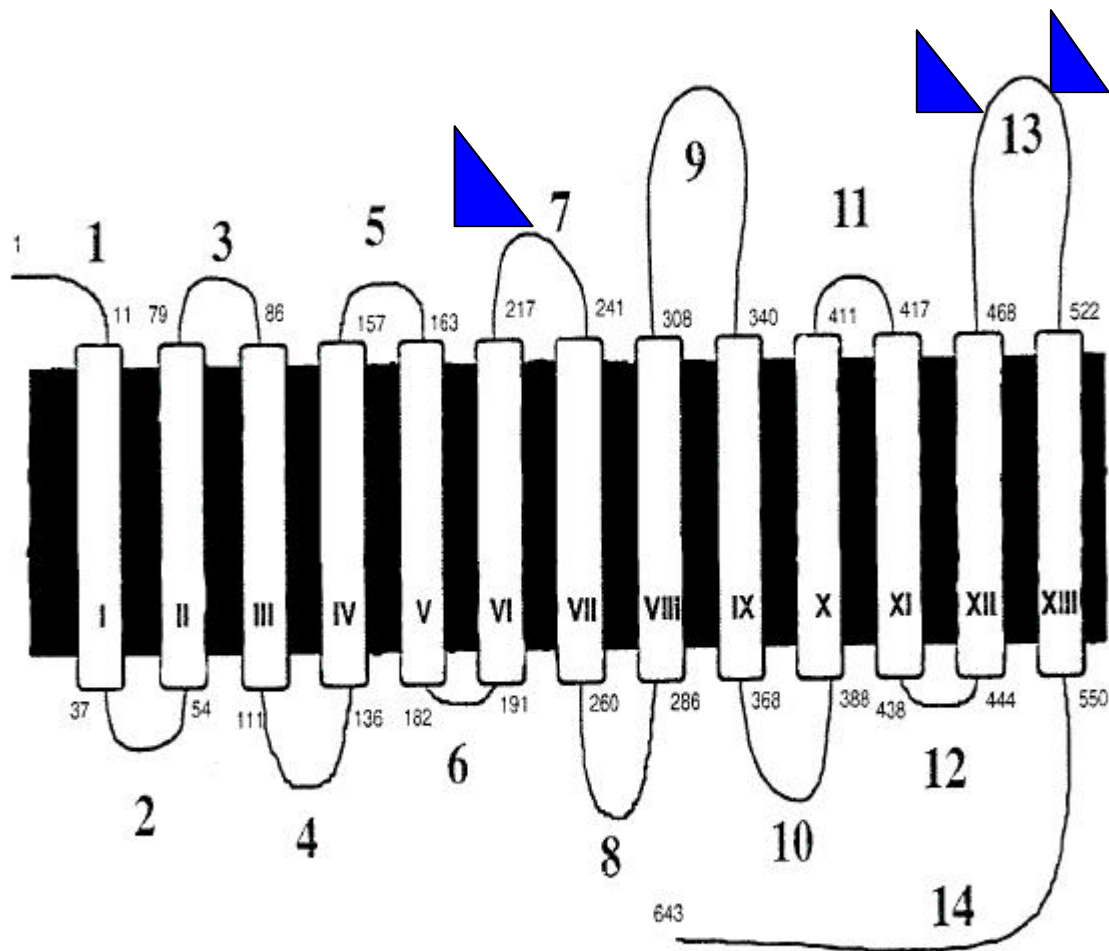


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des humanen Natrium-Jodid-Symporters (hNIS). Modifiziert nach Spitzweg (2001).

1: Sequenznummer

|| : Transmembrandomäne

1: Extramembranloops

▲: N-glykosidische Bindungsstellen

1.6 Die thyreoidale hNIS-Expression

Die Klonierung des hNIS-Genes, sowie die Verfügbarkeit poly- und monoklonaler hNIS-spezifischer Antikörper ermöglichen Expressionstudien in Schilddrüsengeweben, deren Ziel es sein soll, Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten zwischen Normalgewebe und Gewebe von spezifischen Schilddrüsenerkrankungen aufzuzeigen.

Normales Schilddrüsengewebe zeigt eine relativ heterogene hNIS-Proteinexpression, welche räumlich auf die basolaterale Membran einer Minderheit von Follikularzellen begrenzt zu sein scheint (Caillou, 1998; Castro, 1999).

Eine relativ weit verbreitete Schilddrüsenerkrankung ist der Morbus Basedow (engl.: Graves' disease). Dieses Krankheitsbild bezeichnet eine Schilddrüsenüberfunktion (Hyperthyreose), die gekennzeichnet ist durch stimulierende TSH-Rezeptorantikörper, einem supprimierten basalem TSH-Spiegel, sowie erhöhten T3- und T4-Werten im Serum (Tonacchera, 2001). Patienten mit diesem Krankheitsbild zeigen eine stark erhöhte hNIS-Proteinexpression (Saito, 1997; Joba, 1999). Western und Northern Blot Analysen zeigten eine um den Faktor 3 bis 4 gesteigerte hNIS-Expression im Morbus Basedow Gewebe (Saito, 1997).

Eine weitere häufig auftretende Erkrankung der Schilddrüse ist die Thyreoiditis. Dabei handelt es sich um eine Entzündung des Schilddrüsengewebes unterschiedlicher Ursache. Es werden verschiedene Formen dieser Erkrankungen beschrieben, von denen die chronisch autoimmune Schilddrüsenentzündung die bekannteste ist. Diese auch als Hashimoto Thyreoiditis bezeichnete Entzündung führt in der Regel zu einer bleibenden Schilddrüsenunterfunktion (Hypothyreose). Die chronische Thyreoiditis ist eine Autoimmunkrankheit, bei der es bedingt durch eine Fehlsteuerung des Immunsystems zur Bildung von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Lymphozyten kommt, die gegen verschiedene Bestandteile des Schilddrüsengewebes gerichtet sind. Daraus resultiert eine Entzündungsreaktion, die im fortgeschrittenen Stadium zu einer Zerstörung der Schilddrüse führt. Von dieser Erkrankung sind Frauen dreimal häufiger betroffen als Männer.

Die Expression des Symporters bei autoimmuner Thyreoiditis ähnelt dem Expressionsspiegel des Normalgewebes, wobei es zu einer starken Expression des Symporters in Nähe der lymphozytären Infiltrate kommt. Hierdurch wird die Hypothese gestützt, dass NIS ein potentiell Autoantigen bei Schilddrüsenerkrankungen sein könnte (Caillou, 1998).

Multinoduläres Kropfgewebe zeigt eine erniedrigte hNIS-Expression (Joba, 1998). Während in kalten Knoten, die keine Aufnahme von radioaktivmarkiertem Jodid zeigen, die Expression des Symporters erniedrigt ist, so ist sie in autonom funktionierenden Knoten mit einer gesteigerten Aufnahmefähigkeit für Jodid stark erhöht (s. Tab. 1.1).

Expression bei gutartigen Schilddrüsenerkrankungen:	Expression bei bösartigen Schilddrüsenerkrankungen:
- stark erhöht bei Morbus Basedow - normal/reduziert bei Hashimoto's - erniedrigt beim vielknotigen Kropf - erhöht in autonomen Knoten - reduziert bei kalten Knoten	- reduziert in follikulären/papillären Karzinomen, die wenig differenziert sind - keine Expression in anaplastischen und Hürthle-Zellkarzinomen

Tab. 1.1: Expression des Natrium-Jodid-Symporters (NIS) bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen

1.7 Auftreten des Symporters in extrathyreoidalen Geweben

Die Schilddrüse teilt ihre Fähigkeit zur aktiven Akkumulation von Jodid mit mehreren anderen Geweben. Dazu zählen unter anderem die Speicheldrüse, die Tränendrüse, die Magenschleimhaut, die Brustdrüse, der Ziliarkörper des Auges, die Haut sowie die Plazenta. Der Transport von Jodid in die beschriebenen extrathyreoidalen Gewebe, welcher nicht TSH-abhängig ist, zeigt eine funktionelle Ähnlichkeit zu dem der Schilddrüse, wie zum Beispiel der Inhibition durch Perchlorat und Thiocyanat oder aber der Bildung eines Jodidkonzentrationsgradienten in ähnlicher Höhe (Carrasco, 1993). Es gibt sogar Berichte über eine Verstoffwechslung von Jodid in diesen Geweben (Evans, 1966; Strum, 1983).

Im Fall der Speicheldrüse führt ein aktiver Jodidtransport zu einer höheren Jodidkonzentration im Speichel als im Plasma (Carrasco, 1993). Bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen, bei denen eine Radiojodidtherapie durchgeführt wurde, kam es zu einer Fehlfunktion der Speicheldrüse, die auf eine Akkumulation von markiertem Jodid zurückgeführt wurde (Markitziu, 1993).

Das von den exokrinen Drüsen freigesetzte und durch Oxidation zu Hypojodid umgewandelte Jodid fungiert als antimikrobielles Agens, welches die Schleimhäute vor den umgebenden Mikroorganismen zu schützen vermag (Majerus, 1992).

Des Weiteren vermag die Brustdrüse während der Schwangerschaft und der anschließenden Stillphase Jodid zu konzentrieren, wodurch der Jodidbedarf der Neugeborenen gedeckt wird, um somit die Synthese der Schilddrüsenhormone gewährleisten zu können, die ihrerseits essentiell sind für eine ordentliche Entwicklung des Nervensystems, der Skelettmuskulatur sowie der Lunge (Tazebay, 2000).

Da nunmehr die Vermutung nahe lag, dass diese Organe eventuell über einen Natrium-Jodid-Symporter verfügen, wurde die Expression desselben sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in einer Vielzahl extrathyreoidaler Gewebe untersucht. Der Symporter konnte in folgenden Organen lokalisiert werden: der Speicheldrüse, der Tränendrüse, der Magenschleimhaut sowie der Brustdrüse. Es wurde vermutet, dass der Transport von Jodid durch die funktionale Expression des Symporters gesteuert wird (Jhiang, 1998; Spitzweg, 1998/1999).

1.8 Funktion und Regulation des Symporters

Bereits vor der Klonierung des Symporters wurden Untersuchungen durchgeführt, die Aufschluss geben sollten über den thyreoidalen Jodidtransport. Obwohl der genaue Mechanismus unklar war, war jedoch bereits bekannt, dass das in der Hirnanhangdrüse gebildete TSH den Jodidtransport in die Schilddrüse über den cAMP-Weg zu stimulieren vermag (Carrasco, 1993). Nach der Klonierung von hNIS konnte am Rattenmodell gezeigt werden, dass durch die Zugabe von TSH sowohl die Gen- als auch die Proteinexpression des Symporters gesteigert werden konnte (Kogai, 1997; Saito, 1997). Neben TSH vermögen Forskolin bzw. extrazelluläres Adenosin die Expression des Symporters im Rattenmodell zu steigern (Harii, 1999).

Mehrere Arbeiten lassen vermuten, dass der Jodidtransport in der Brustdrüse durch Prolaktin stimulierbar ist. Dies könnte vor allem ein wichtiger Regulator während des Stillprozesses nach der Geburt sein (Levy, 1998; Rillema, 1997/2000).

Weitere Studien an Ratten zeigten, dass die NIS-Expression in der Brustdrüse während der gesamten Dauer des Stillprozesses (bis zu sechs Monate) hochreguliert ist und bereits 24 Stunden nach Abstillen deutlich sinkt.

Des weiteren wurden in FRTL-5 Zellen, der thyreoidalen Zelllinie der Fischer Ratte, Untersuchungen zur Beschreibung möglicher Inhibitoren der Expression des Symporters durchgeführt. Neben dem transformierenden Wachstumsfaktor- β 1 (TGF- β 1), einem potenten Inhibitor des Wachstums und der DNA-Synthese in der Schilddrüse, konnten Östradiol, der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon- γ (INF- γ), Interleukin-1 α (IL-1 α), Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 β (IL-1 β) als mögliche Inhibitoren beschrieben werden (Kawaguchi, 1997; Aj-jan, 1998; Pekary, 1998; Furlanetto, 1999; Spitzweg, 1999).

Bereits 1948 berichteten Wolff und Chaikoff, dass die organische Bindung von Jodid innerhalb der Schilddrüse durch erhöhte Plasmajodidspiegel blockiert wird. Sie konnten des weiteren zeigen, dass dieser als Wolff-Chaikoff bezeichnete Effekt transient ist und nach einer Verweildauer von 25 bis 50 Stunden die Schilddrüse eine Adaptation an die vorherrschenden Verhältnisse zeigt und eine annähernd normale Schilddrüsenhormonsynthese fortgesetzt wird (Wolff & Chaikoff, 1948/49). Durch die Klonierung des Symporters konnte die Rolle von hNIS beim Auftreten des Wolff-Chaikoff-Effektes näher untersucht werden (Spitzweg, 1999; Uyttersprot, 1997).

Es wurde vermutet, dass die sogenannte Flucht vom Wolff-Chaikoff-Effekt auf einer Runterregulation des Symporters beruht, wodurch die intrathyreoidale Jodidkonzentration herabgesetzt wird und die Inkorporation von Jodid in das Thyroglobinrückgrat wieder aufgenommen wird (Eng, 1999).

1.9 NIS bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen

Raspé berichtete 1995 erstmals, dass die TSH-induzierte Jodidaufnahme in kultivierten Hundethyreozyten nach Zugabe von Hashimoto-Seren inhibiert wird. Es wurde vermutet, dass kreuzreagierendes NIS verantwortlich sein könnte für den registrierten Abfall der Jodidakkumulationsfähigkeit.

Endo und seiner Arbeitsgruppe gelang es 1996 den Ratten-Symporter stabil in einem Fusionsprotein zu exprimieren, um Seren von Patienten mit Morbus Basedow oder Hashimoto Thyreoiditis auf die Anwesenheit von NIS-Antikörpern zu überprüfen. Sie konnten zeigen, dass 84% (22 von 26) der Seren der Morbus Basedow Patienten bzw. nur 15% (3 von 20) der Hashimoto-Seren Immunglobulin G (IgG) besaßen und das Fusionsprotein zu binden vermochten (Endo, 1996).

Um eine Vielzahl an Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen auf die Anwesenheit von NIS-Autoantikörpern testen zu können, entwickelte die Arbeitsgruppe um Morris ein kalibriertes ELISA-System (Morris, 1997). Bei diesem ELISA wurde die Bindungsfähigkeit der gebildeten Immunglobuline an den Ratten-Symporters (rNIS) ermittelt. In Vorarbeiten wurden dazu verschiedene rNIS-Peptide synthetisiert und auf ihre Bindungsfähigkeit hin untersucht. Als Ergebnis konnte postuliert werden, dass die synthetisierten Peptide unterschiedliche Bindungsaffinitäten aufwiesen. Für einen eindeutigen Nachweis von NIS-Autoantikörpern in Seren verschiedener Patienten scheinen demnach besondere strukturelle Konformationen notwendig zu sein.

Mit diesen Studien wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Natrium-Jodid-Symporter eine wichtige Rolle bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen einnehmen könnte. Da aber in den genannten Studien nur wenige Patienten untersucht worden waren, ist die Bedeutung von Autoantikörpern gegen hNIS bisher unklar.

1.10 NIS: Ein neues therapeutisches Gen ?

Die thyreoidale Expression von NIS könnte ein möglicher Ausgangspunkt bei der Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen sein. Bei der Behandlung mit radioaktivmarkiertem Jodid im fortgeschrittenen Krankheitsstadium könnte ihm eine enorme Bedeutung zuteil werden.

Mit einer eindeutigen Charakterisierung der Regulation des humanen Natrium-Jodid-Symporters könnte die Entwicklung neuer Gentherapien ermöglicht werden, die bei der Behandlung von thyreoidalen und extrathyreoidalen Tumoren ihren Einsatz finden könnten.

In Studien mit Tumorzellen transformierter Rattenthyreozyten, die keinen Jodidtransport mehr zeigten, konnte durch eine Transfektion mit einer cDNA des rNIS die Fähigkeit zur Akkumulation von radioaktivmarkiertem Jodid sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wieder hergestellt werden (Shimura, 1997).

Obwohl der gerichtete NIS-Gentransfer eine moderne Art der Krebsbehandlung mittels Radiojodidtherapie zu sein vermag, müssen jedoch vorab viele weitere Fragen geklärt werden, um zu gewährleisten, dass die durchgeführte Behandlung nur das erkrankte Gewebe anspricht und nicht zu unerwünschten Veränderungen in anderen Organen führt, die ebenfalls in der Lage sind aktiv Jodid zu akkumulieren.

2. Fragestellung

Da über die Regulation der Expression des humanen Natrium-Jodid-Symporters (hNIS) bisher nur relativ wenig bekannt war und hNIS in naher Zukunft eine wichtige Rolle bei der Diagnose und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen zu kommen könnte, war es ein primäres Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit eine Methode zur sensitiven Detektion der hNIS-Genexpression aufzubauen.

Dazu sollten drei verschiedene Quantifizierungsmethoden angewendet und hinsichtlich ihrer Effektivität und Effizienz miteinander verglichen werden. Im einzelnen sollte das Expressionsverhalten des humanen Symporters mittels der Northern Blot Analyse, der semiquantitativen Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) sowie der innovativen Real-Time PCR am LightCycler der Firma Roche Diagnostics bestimmt werden. Dabei sollte das Expressionsverhalten des Symporters in Abhängigkeit von Stimulatoren bzw. Inhibitoren auf RNA-Ebene bzw. auf cDNA-Ebene untersucht werden.

Da dem Symporter die Rolle eines potentiellen Autoantigens zugeschrieben worden war, sollte der humane Symporter kloniert und humanes rekombinantes NIS exprimiert werden, um ein sensitives Nachweissystem für hNIS-Autoantikörper aufzubauen. Mit dieser Technik sollte erstmals eine große Population von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen im Vergleich zu Normalpersonen getestet werden.

Parallel zur Etablierung eines Nachweissystems für hNIS-Autoantikörper, wurde die funktionelle Aktivität des klonierten Symporters in CHO-Zellen überprüft. Dazu wurde die Fähigkeit zur Aufnahme von radioaktivmarkiertem Jodid untersucht.

Mit den durchgeführten Experimenten zur Beschreibung des Expressionsverhaltens und zur Bestimmung der Anwesenheit von Autoantikörpern sollte der humane Natrium-Jodid-Symporter innerhalb dieser Arbeit näher beschrieben werden, sowie eine Aussage getroffen werden über seine mögliche Rolle bei der Diagnostik schilddrüsenpezifischer Erkrankungen.

3. Material und Methoden

3.1 Bezugsquellen

3.1.1 Reagenzien

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

First Strand cDNA Synthesis Kit

Iodine-125

Protein A Sepharose

Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

Template Suppression Reagent

Big DyeTM Terminator DNA Sequencing
Kit

BioTez, Berlin, Deutschland

Klonierungsprimer

Sequenzierprimer

Biorad, München, Deutschland

Ammoniumpersulfat

Coomassie

Natriumdodecylsulfat (SDS)

TEMED

Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

G 418 Sulfat (Geneticin)

Clontech, Heidelberg, Deutschland

NucleoTrap Gel Extraction Kit

Gibco Life Technologies, Weiterstadt, Deutschland

Earles BBS (10x)

fötales Kälberserum

Glutamin

LB-Agar

LB-Broth

Natriumhydrogencarbonat

Penicillin/Streptomycin

RPMI1640-Medium

Trizol

Invitrogen, Groningen, Niederlande

One Shot™ TOP10F'kompetente Zellen

pTracer™-CMV Vektor

pBK-CMV Vektor

Promega, Mannheim, Deutschland

1kb DNA Ladder

DNA Polymerase I (Klenow)

Nuklease-freies Wasser

pGEM-4Z Vektor

pGEM-T.Easy Vektor

Restriktionsenzyme

RNAsin

T4 DNA Ligase

T4 DNA Polynucleotide Kinase

TNT-Kit

Quiagen, Hilden, Deutschland

QIAshredder
RNeasy Mini Kit

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Alkalische Phosphatase
Anti-Dig-AP Antikörper
CSPD
DIG Easy Hyb
Dispase
ExpandTM High Fidelity PCR-System
ExpandTM Reverse Transkriptase
FuGeneTM 6 Transfection Reagent
High PureTM PCR Product Purification Kit
High PureTM Plasmid Isolation Kit
Hybridization Probe
LightCycler-FastStart DNA Master
PCR Deoxynucleotide Mix
p(dT)₁₅-Primer
TitanTM One Tube RT-PCR System
X-Gal

Roth, Karlsruhe, Deutschland

Acrylamidlösung
Eisessig
Ethanol
Isopropylalkohol
Methanol

Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Agarose
Benzamidin
β-Mercaptoethanol

Bromphenolblau
bovines TSH
BSA
Chloroform
Diethylpyrocarbonat(DEPC)
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Ethidiumbromid
Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)
Formaledehyd (37%)
Formamid
Forskolin
Glycerol
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)
Kaliumchlorid
Lithiumchlorid
Maleinsäure
Methionin
MOPS
Natriumacetat
Natriumchlorid
Natriumcitrat
Natriumhydroxid
Natriumjodid
Natriumperchlorat
Phenol
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
PPO
Quabain
Sucrose
Tris-HCl
Tween-20
Wasserstoffperoxid 30% (H₂O₂)

Stratagene, Amsterdam, Niederlande

pBK-CMV Vektor

TIB Molbiol, Berlin, Deutschland

LightCycler Hybridisierungsproben

LightCycler Oligonukleotidprimer

3.1.2 Geräte

Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland

ABI PRISMTM 310 Genetic Analyser

Gene Amp[®] PCR System 9700

BIO-RAD, München, Deutschland

Gelelektrophoresekammer

Braun, Melsungen, Deutschland

Certomat[®] H Bakterieninkubator

Certomat[®] R Bakterienschüttler

Eppendorf, Köln, Deutschland

Pipetten diverser Volumina

Thermomixer 5436

Gilson, Langenfeld, Deutschland

Pipetten diverser Volumina

Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Brutschrank

Labufuge 400R

	Lamin Air Modell HLB 2472
	Regulierbarer Heizblock
	Elektronische Analysenwaage
MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland	
	Geldokumentationssystem TFX-20M
Roche Diagnostics, Mannheim Deutschland	
	LightCycler System
	LumiImager Station
Sharp, Leipzig, Deutschland	
	Mikrowelle R-2V18
Shimadzu, Duisburg, Deutschland	
	Biospec 1601 Spektrophotometer
Sigma, Deisenhofen, Deutschland	
	Zentrifuge 3K30

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

AGFA, Leverkusen, Deutschland	
	Thermopapier
	Röntgenfilme
Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland	
	Filtertips (10 µl; 100 µl; 1000 µl)

Corning Costar, Bodenheim, Deutschland

Einmal-Pipetten (1; 5; 10; 25 ml)

Petrischalen

Polystyren Reagenzglas (12 x 75 mm)

Zellkulturflaschen

Eppendorf, Köln, Deutschland

Einmal-Pipettenspitzen (10; 100; 1000 µl)

Einmal-Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 ml)

Silanisierte Reaktionsgefäße (0,6; 1,5 ml)

Millipore, Eschborn, Deutschland

Multiscreen Platten (BV 1,2 µm)

3.2 Klonierung von PCR-Fragmenten zur Durchführung quantitativer Expressionsstudien

Ein primäres Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung des Expressionsverhaltens des humanen Natrium-Jodid-Symporters (hNIS), während diverser Stimulationen auf RNA-Ebene bzw. cDNA-Ebene, unter Einsatz verschiedener Quantifizierungsmethoden (Northern Blot Analyse; kompetitive, semiquantitative RT-PCR; Real-Time PCR).

Dazu mussten jedoch zunächst entsprechende DNA-Fragmente sowohl für das Target-Gen hNIS als auch für das "house keeping"-Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase) über eine Polymerasekettenreaktion (PCR; polymerase chain reaction) aus isolierter RNA amplifiziert werden, damit diese Fragmente, nach Klonierung in einen spezifischen Plasmidvektor, als Standard, als Kontrollfragment (Kompetitor) bzw. als Matrize zur Synthese von RNA-Sonden eingesetzt werden konnten.

3.2.1 Polymerasekettenreaktion zur Amplifikation von hNIS bzw. GAPDH

Zur Synthese der gewünschten Fragmente wurde mit Hilfe einer Gen-Datenbank und unter Anwendung des Winstar Quickprime Programm Oligonukleotidprimer ermittelt (s. Tab. 3.1), die eine spezifische Amplifikation des humanen Natrium-Jodid-Symporters (hNIS) sowie der humanen Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) ermöglichten.

Als Ausgangsmaterial fungierte RNA der Schilddrüsenkarzinomlinie FTC133, die zunächst über eine Reverse Transkription in eine komplementäre DNA (cDNA; copy DNA) übersetzt wurde, welche als Template für die nachfolgende Polymerasekettenreaktion diente.

Durch den Einsatz des TitanTM One Tube RT-PCR Systems (Roche Diagnostics) konnten sog. "carry over"-Kontaminationen verhindert werden, da cDNA-Synthese und PCR in einem Gefäß durchgeführt wurden, ohne das Gefäß während der Reaktion öffnen zu müssen.

Bei der von Mullis (1987) entwickelten Methode der PCR handelt es sich um eine enzymatische DNA-Vervielfältigungsmethode, bei der *in vitro* in mehreren Schritten spezifische Oligonukleotidprimer entlang der Matrizen-DNA verlängert werden, so dass Nukleotidstränge definierter Länge und Sequenz angereichert werden. Die Temperatur des verwendeten Thermoblocks wechselt dabei periodisch, so dass die entstandenen DNA-Doppelstränge zu Beginn eines jeden Zyklus denaturiert werden, die spezifischen Primer sich erneut an die Einzelstränge anlagern und diese durch die Anlagerung der korrespondierenden Nukleosidtriphosphate (dNTP's) verlängert werden können. Bei dieser Methode wird die Hitzestabilität der verwendeten Taq-Polymerase (zumeist isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*) ausgenutzt, deren Temperaturoptimum über 70°C liegt. Bei jedem Reaktionszyklus kommt es zu einer Verdopplung der zu amplifizierenden DNA-Fragmente und damit zu einer exponentiellen, etwa 10^6 - 10^7 -fachen Anreicherung dieser, durch die Primer flankierten, DNA-Fragmente (Mullis, 1987).

	Natrium-Jodid-Symporter (hNIS)	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase (GAPDH)
Sense Primer	ggg cct cac cag cac cta cga	gca ggg ggg agc caa aag gg
Antisense Primer	tgc cac cca cca caa aag tcc aga a	tgc cag ccc cag cgt caa ag
Fragmentgröße	418 bp	566 bp
cDNA-Synthese	30 min ; 50°C	30 min ; 50°C
Prädenaturierung	2 min ; 94°C	2 min ; 94°C
PCR	30 sek ; 94 °C 30 sek ; 58°C 60 sek ; 68°C	30 sek ; 94 °C 30 sek ; 58°C 60 sek ; 68°C
Terminale Elongation	7 min ; 68°C	7 min ; 68°C
Zykluszahl	35	35

Tab. 3.1: Primer und Reaktionsbedingungen zur reversen Transkription und Amplifikation von hNIS und GAPDH

3.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten

Benötigte Lösungen:

50x TAE-Puffer	Tris	242 g
	Eisessig	57,1 ml
	0,5 M EDTA pH 8,0	100 ml
	H ₂ O	ad 1l
10x Gel-Ladepuffer	Bromphenolblau	0,05%
	Sucrose	40%
	EDTA pH 8,0	0,1 M
	SDS	0,5%

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung der amplifizierten PCR-Produkte wurde ein 1,5% Agarosegel (1,5 g Agarose auf 100 ml 1x TAE-Puffer) gegossen, welches mit 1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde. Der komplette PCR-Ansatz wurde mit 10x Gel-Ladepuffer vermischt und auf das auspolymerisierte Gel aufgetragen.

Zusätzlich wurden 5 µl (500 ng) eines Molekulargewichtsmarkers (1kb DNA Leiter, Promega), der den Bereich von 250 bis 10.000 Basenpaaren (bp) umspannt, aufgetragen.

Die Gelkammer wurde mit 1x-TAE-Puffer aufgefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 110 V für ca. 90 min. Im UV-Transluminator konnten die entstandenen PCR-Produkte auf Grund der interkalierenden Fähigkeit des Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Das Gel wurde mit Hilfe eines Geldokumentationssystems der Firma MWG-Biotech aufgenommen und für weitere Auswertungen archiviert.

3.2.3 Isolierung genomischer DNA aus einem Agarosegel

Die entsprechenden PCR-Fragmente wurden mit Hilfe des NucleoTrap Gel Extraction Kits (Clontech) aus dem Agarosegel eluiert. Dabei wurde zunächst das betreffende PCR-Produkt aus dem Gel ausgeschnitten und bei 55°C für 10 min im NT1-Puffer aus der Agarose herausgelöst. Während dieser Inkubation erfolgte die Bindung der DNA an die Matrix der zugefügten NucleoTrap Suspension. Über mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte wurde die DNA gereinigt, bevor durch Zugabe von 20 µl HPLC-Wasser und einer erneuten Wärmezufuhr, 55°C für 5 min, die Bindung zwischen DNA und NucleoTrap Suspension gelöst wurde und nach einem letzten Zentrifugationsschritt die DNA in Lösung vorlag. 4 µl der so gewonnenen DNA wurden abschließend auf einem Agarosegel (s. 3.2.2) zur Kontrolle aufgetragen.

3.2.4 Einbau von DNA in einen Klonierungsvektor

Damit die eluierte DNA in einen Klonierungsvektor eingebaut werden konnte, musste dieser verschiedene Eigenschaften aufweisen. Neben einem "Origin of Replication" und einer Ampicillinresistenz, sollte er zusätzlich über einen zur Aufnahme von Fremd-DNA besonders eingefügten DNA-Abschnitt mit diversen Restriktionsschnittstellen (multiple Klonierungsstelle) verfügen, in den nach entsprechender Linearisierung die Fremd-DNA eingebaut werden konnte. Durch den Verdau mit einem "single cut"-Enzym wurde das ringförmige Plasmid linearisiert, mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und anschließend mit dem Insert ligiert.

Für diese Reaktion wurden 7 µl DNA und 1 µl Vektor mit 1 µl einer T4-DNA-Ligase (Promega) vermischt und über Nacht bei 15°C inkubiert.

Das isolierte GAPDH-Fragment wurde in den pGEM-T.Easy-Vektor ligiert, während der humane Symporter in den pGEM-4Z-Vektor (beide Vektoren von Promega) kloniert wurde.

3.2.5 Transformation der Vektorkonstrukte in kompetente *E.coli*-Zellen

Zu 25 µl, auf Eis aufgetauten, kompetenten One Shot™ Top10F' Bakterienzellen (Invitrogen) wurden 1-2 µl des Ligationsansatzes gegeben, 30 min auf Eis inkubiert und ein "Hitzeschock" für exakt 30 sek bei 42°C durchgeführt und anschließend sofort wieder auf Eis gestellt ("quick chill"). Durch diesen Hitzeschock konnte das DNA-Vektor-Konstrukt in die kompetenten Zellen eingebracht werden. Zum Transformationsansatz wurden 250 µl SOC-Medium pipettiert und die Zellen für 1 Std. bei 37°C unter starkem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ansatz mit Hilfe eines sterilen Drigalskispatels auf selektive Ampicillin-LB-Agar Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.6 Prinzip der Blau-Weiß-Selektion

Durch den Zusatz von Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG, Roche Diagnostics) und X-Gal (Roche Diagnostics) auf den Agarplatten konnte über eine Blau-Weiß-Selektion ermittelt werden, welche der resultierenden Bakterienklone das DNA-Vektor-Konstrukt ins Plasmid integriert hatten.

Basis dieser Selektion ist, dass die multiple Klonierungsstelle innerhalb des 5'-Abschnittes des *lacZ*-Gens liegt. Dieser Abschnitt kodiert für den aminoterminalen Teil der β-Galaktosidase. Um das Selektionssystem gut ausnutzen zu können, müssen die kompetenten Bakterienstämme auf ihrem Genom den 3'-Abschnitt des *lacZ*-Gens besitzen und somit für den carboxyterminalen Teil der β-Galaktosidase kodieren. Bakterien, die den Plasmidvektor integriert haben sind ampicillinresistent und besitzen eine funktionsfähige β-Galaktosidase, die sich aus einem Plasmid-kodierten Anteil und einem Genom-kodierten Anteil zusammensetzt. Diese Bakterien bilden in Gegenwart des Farbstoffes X-Gal und des Induktors IPTG blaue Kolonien.

Durch den Einbau der DNA für GAPDH bzw. für hNIS in die multiple Klonierungsstelle des Vektors wird der Leserahmen des *lacZ*-Gens zerstört. Die betreffenden Ampicillin-resistenten Bakterienkolonien bleiben in Gegenwart von IPTG und X-Gal weiß (Knippers, 1971).

3.2.7 Herstellung eines Bakterienstocks

Mehrere weiße Klone wurden zur weiteren Analyse einer Plasmidisolierung unterzogen. Dazu wurden zunächst die entsprechenden Klone mit einem sterilen Zahnstocher von der Platte gepickt und über Nacht in 5 ml LB-Medium (Gibco) als Schüttelkultur inkubiert. Als Selektionsantibiotikum wurde 1% Ampicillin der Kultur zugesetzt. Am nächsten Morgen wurden 450 µl der Bakteriensuspension mit 200 µl LB-Medium und 50 µl Glycerinlösung (80%) vermischt und dieser Bakterienstock bei -80°C gelagert.

3.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA

Aus der restlichen Bakteriensuspension wurde Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse unter Einsatz des High Pure Plasmid Isolation Kits (Roche Diagnostics) isoliert. Das Lysat wird dabei in einem Schritt neutralisiert und auf Hochsalzbedingungen eingestellt. Nach Ausfällung bakterieller DNA und Zelltrümmern wird der plasmidhaltige Überstand mit dem High Pure Filter Tube gereinigt. Nukleinsäuren werden dabei spezifisch in Gegenwart eines chaotropen Salzes an die Silica-Oberfläche gebunden. Da nur Nukleinsäuren spezifisch gebunden werden, wird die Plasmid-DNA nach mehreren Waschschritten nunmehr frei von Salzen, Proteinen und anderen zellulären Verunreinigungen in Niedrigsalzpuffer oder Wasser eluiert.

3.2.9 Durchführung eines Kontrollverdaus

In einem Restriktionsverdaus wurden 4 µl der Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen behandelt, die eine Charaktisierung des DNA-Vektor-Konstrukts ermöglichen sollten. Während für GAPDH ein Kontrollverdaus mit *PstI* und *NcoI* angesetzt wurde, erfolgte die Restriktion von hNIS mit *HindIII* und *EcoRI*. Nach ca. 60 min wurde der Verdaus auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. Punkt 3.2.2).

Entsprachen die resultierenden Banden der Größe, der in der PCR amplifizierten Fragmente (s. Tab. 3.1) wurde über eine abschließende Sequenzierung die "Identität" der Fragmente ermittelt.

3.2.10 Sequenzierung von cDNA-Klonen

Mit Hilfe der Sequenzierung konnte die genaue Basenabfolge der klonierten Fragmente bestimmt werden und anschließend mit denen in einer Datenbank aufgelisteten Sequenzen verglichen werden, um festzustellen, ob eventuelle Sequenzunterschiede vorliegen, sowie den Beweis zu führen, dass es sich bei den klonierten cDNA-Vektor-Konstrukten tatsächlich um ein Fragment der GAPDH bzw. des humanen Symporters handelte.

In einem dünnwandigen 200 µl PCR-Reaktionsgefäß wurden ca. 1 µg Plasmid-DNA, 0,5 µl des jeweiligen spezifischen Sequenzierungsprimer M13 forward bzw. M13 reverse (Applied Biosystems) mit 4 µl BigDye Terminator Sequenziermix (Applied Biosystems) zusammenpipettiert und mit Nuclease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht.

Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem Thermocycler durchgeführt. Dabei wurden 26 Zyklen folgenden Temperaturprofiles durchlaufen: 10 sek bei 96°C; 5 sek bei 50°C; 4 min bei 60°C. Im Anschluß an die PCR wurden die PCR-Produkte über eine Ethanol-fällung gereinigt. Dazu wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß 10 µl Natriumacetat (3M, pH 5,2), 80 µl H₂O und 250 µl Ethanol (96%) vorgelegt und mit dem kompletten Sequenzierungsansatz vermischt. Es erfolgte eine Präzipitation für 15 min bei 13.000 x g.

Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Ethanol (70%) gewaschen und weitere 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nach einer erneuten Verwerfung des Überstandes wurde das Pellet für 2-3 min in einem Vakuumtrockner getrocknet und anschließend in 20 µl Template Supression Reagent (Applied Biosystems) resuspendiert. Bevor die Proben dann in den ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer eingelesen wurden, erfolgte eine zweiminütige Denaturierung bei 94°C.

Das Prinzip der Sequenzierung beruht auf der Auftrennung verschieden langer Fragmente in einer Silicagelkapillare. Diese Fragmente entstehen während der Amplifikationsreaktion durch den Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs), die nach ihrem Einbau in die synthetisierte DNA zu einem Abbruch der Elongationsreaktion führen, da sie keine freie OH-Gruppe tragen, die zur Anlagerung weiterer Nukleotide notwendig ist.

Während der Auftrennung der amplifizierten Fragmente gemäß ihrer Länge, werden parallel dazu die eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotide durch einen Laser angeregt, wobei jedes Fluorophor Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. Über eine spezielle Software kann die gelesene Sequenzfolge graphisch dargestellt werden (s. Anhang A) und mit den in den Datenbanken eingelesenen Dateien verglichen werden (s. Anhang B-E).

3.3 Untersuchung der Expression des humanen Symporters

Ein Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression von hNIS. Dazu wurden drei molekularbiologische Methoden angewandt bzw. etabliert, mit deren Hilfe auf RNA- bzw. auf cDNA-Ebene quantifiziert werden konnte. Während die Northern Blot Analyse eine Untersuchung des Expressionsverhaltens direkt auf RNA-Ebene ermöglichte, konnte über die kompetitive, semiquantitative RT-PCR sowie die innovative Real-Time PCR das Expressionsverhalten des Symporters nach der Umschreibung in cDNA charakterisiert werden.

Bei der Auswahl dieser drei molekularbiologischen Methoden sollte des Weiteren die Progression in der Entwicklung von Methoden zur Quantifizierung von Expressionstadien auf RNA-Ebene dargestellt werden. Fortschritte zeigten sich sowohl durch eine Erhöhung der Sensitivität als auch in einer Reduktion des Arbeitsaufwandes, die mit einer verkürzten Detektionszeit einhergeht.

3.3.1 Northern Blot Analyse

Für den Northern Blot wurde Gesamt-RNA aus Thyreozyten isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine geeignete Trägerschicht, einer Nylonmembran, übertragen und dort immobilisiert. Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgt durch Hybridisierung der Membran mit einer geeigneten, markierten RNA-Sonde, welche mit Hilfe von Chemilumineszenz nachgewiesen werden konnte.

3.3.1.1 Herstellung von DIG-gelabelten RNA-Sonden

Zur Herstellung von Digoxigenin(DIG)-markierten RNA-Sonden wurden die DNA-Vektor-Konstrukte eingesetzt, in die zuvor hNIS bzw. GAPDH erfolgreich inkloniert worden waren. Die Template-DNA wurde mit entsprechenden Restriktionsendonukleasen behandelt, um das Plasmid zu linearisieren.

Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung wurden über folgende Standardmarkierungsreaktion "run off"-Transkripte erzeugt:

1 µg	gereinigtes, linearisiertes Plasmid
2 µl	dNTP Markierungs-Mix
2 µl	Transkriptionspuffer
1 µl	RNAse-Inhibitor
2 µl	RNA-Polymerase, SP6 bzw. T7

Die Standardmarkierungsreaktion wurde auf ein Endvolumen von 20 µl gebracht und 2 Std. bei 37°C inkubiert. Um die Template-DNA zu entfernen, wurden anschließend 2 µl RNAse-freie DNase I (Promega) hinzugegeben und für weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA (pH 8,0) gestoppt.

Zum Transkriptionsansatz wurden 2,5 µl 4 M LiCl und 75 µl kalter Ethanol (96%) hinzugefügt, gut durchmischt und über Nacht bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde das Gemisch 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl DEPC-Ethanol (70%) gewaschen. Nach einem kurzen Trocknungsprozess unter Vakuum wurde das Pellet in 100 µl RNAse-freiem Wasser gelöst und mit 1 µl RNAse-Inhibitor (Promega) vermischt.

3.3.1.2 Elektrophorese der RNA

Benötigte Lösungen:

DEPC-Wasser	0,1% DEPC	
	H ₂ O	ad 1 l
	Autoklavieren	
10 mM EDTA	EDTA	0,037 g
	A. dest	ad 10 ml

10 x MOPS	0,2 M MOPS 0,05 M Natriumacetat 0,01 M EDTA auf pH 7,0 mit ca. 3 g NaOH-Plättchen, autoklavieren
RNA-Probenpuffer	250 µl deionisiertes Formamid 83 µl Formaldehyd (37%) 50 µl 10x MOPS 17 µl DEPC-Wasser 0,4 µl Ethidiumbromid Bromphenolblau

Die zur Elektrophorese der RNA benötigte Kammer und Gelform wurden über Nacht in 3% H₂O₂ gewässert und am nächsten Morgen gut mit DEPC-Wasser gespült. Anschließend wurde ein denaturierendes Formalin-Agarosegel gegossen. Dazu wurde Agarose für ein 0,8-1% Gel eingewogen, mit 5 ml 10x MOPS sowie 37,5 ml DEPC-Wasser gemischt und für 2-3 min bei 400 W in der Mikrowelle gelöst. Nachdem das Gel auf ca. 50°C abgekühlt war, wurden 8 ml Formaldehyd (37%) hinzugegeben, das Ganze gut gemischt und das Gel gegossen. Nachdem das Gel fest war, wurden die RNA-Proben in je 4 Volumina Probenpuffer aufgenommen, 10 min bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Die Gelkammer wurde bis zur Oberkante des Gels mit 1x MOPS gefüllt, die Proben aufgetragen und der Lauf gestartet. Nachdem die Proben ins Gel gelaufen waren (nach ca. 5 min), wurde die Gelkammer mit 1x MOPS aufgefüllt und das Gel elektrophoretisch bei 80 V für ca. 2-3 Std. aufgetrennt.

Nach der Auftrennung wurde das Gel für 2 weitere Stunden in DEPC-Wasser gewässert, um überschüssiges Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen. Abschließend wurde die RNA unter UV-Licht detektiert.

3.3.1.3 Blotten der RNA (Kapillarblot über Nacht)

Benötigte Lösungen:

20* SSC-Puffer 0,3 M Natriumcitrat
 3 M NaCl
 auf pH 7,0

Für den Transfer der RNA aus dem Trenngel auf die Nylonmembran wurde zunächst eine Lage Whatman-3MM Papier (7 x 17 cm) in die Gelkammer gelegt und beide Seiten der Kammer bis zur Hälfte mit 20* SSC-Puffer gefüllt. In der Zwischenzeit wurden 5 Lagen Whatman-3MM-Papier auf Gelgröße zurecht geschnitten und in 20* SSC-Puffer getränkt. Nachdem das Whatman-Papier in der Kammer vollständig mit SSC-Puffer vollgesogen war, wurde das Gel mit der Oberseite nach unten aufgelegt, eventuelle Luftblasen entfernt, die zurecht geschnittene und ebenfalls in 20* SSC getränkte Nylonmembran aufgelegt und die Ränder des Gels mit einer Maske aus Parafilm abgedeckt. Auf die Membran wurden neben dem mit SSC getränkten Whatman-Papier zurecht geschnittene Zellstoffstücke gelegt, abermals eventuelle Luftblasen entfernt und der Blot abschließend mit einem geeignetem Gewicht beschwert und über Nacht geblottet. Am nächsten Tag wurde die Membran luftgetrocknet und die RNA über einen Prozess, der Crosslinking genannt wird, kovalent an die Membran gebunden. Abschließend wurden die auf die Membran transferierten RNA-Banden unter einem UV-Schirm angezeichnet.

3.3.1.4 Hybridisierung mit DIG-gelabelten RNA-Sonden

Zu Beginn der Hybridisierung wurde die Nylonmembran mit 20 ml DIG Easy Hyb/100 cm² Membran (Roche Diagnostics) für 2 Std. bei 68°C prähybridisiert. In der Zwischenzeit wurden die DIG-gelabelten RNA-Sonden 10 min bei 99°C denaturiert und nach einem "quick chill" zum frisch hergestellten Hybridisierungspuffer gegeben. Zu 2,5 ml Hybridisierungspuffer kamen 2 µl der GAPDH-Sonde und 10 µl der hNIS-Sonde.

Die Nylonmembran wurde mit der entsprechenden Sondenlösung eingeschweißt und über Nacht bei 68°C im Wasserbad hybridisiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran zweimal für jeweils 20 min bei Raumtemperatur mit 50 ml 2* SSC + 0,1% SDS und dann mit je 50 ml 0,1* SSC + 0,1% SDS bei 68°C gewaschen, wobei darauf geachtet werden mußte, dass die Membran zwischen den einzelnen Waschschritten nicht austrocknete.

3.3.1.5 Detektion

Benötigte Lösungen:

Puffer 1	0,1 M Maleinsäurepuffer 0,15 M NaCl	auf pH 7,5
Waschpuffer	Puffer 1 mit 0,3% Tween 20	
Puffer 2	10x Blockierungsreagenz Puffer 1	10 ml 90 ml
Puffer 3	0,1 M Tris-HCl 0,1 M NaCl	auf pH 9,5

Die Membran wurde 5 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 min bei Raumtemperatur mit 100 ml Puffer II/100 cm² Membran blockiert. In der Zwischenzeit wurde der Anti-DIG-alkalische Phosphatase Antikörper (Roche Diagnostics) 1:10.000 in 20 ml Puffer 2 verdünnt und die Membran 30 min in dieser Lösung inkubiert. Nach einem doppelten Waschschrift für 15 min mit 100 ml Waschpuffer, wurde die Membran in 20 ml Puffer 3 äquilibriert. Das Detektionsreagenz CSPD (Roche Diagnostics) wurde 1:100 in Puffer 3 verdünnt, zur Membran gegeben und 10 min bei 37°C einwirken gelassen. Abschließend erfolgt die Detektion der RNA am LumiImager (Roche Diagnostics).

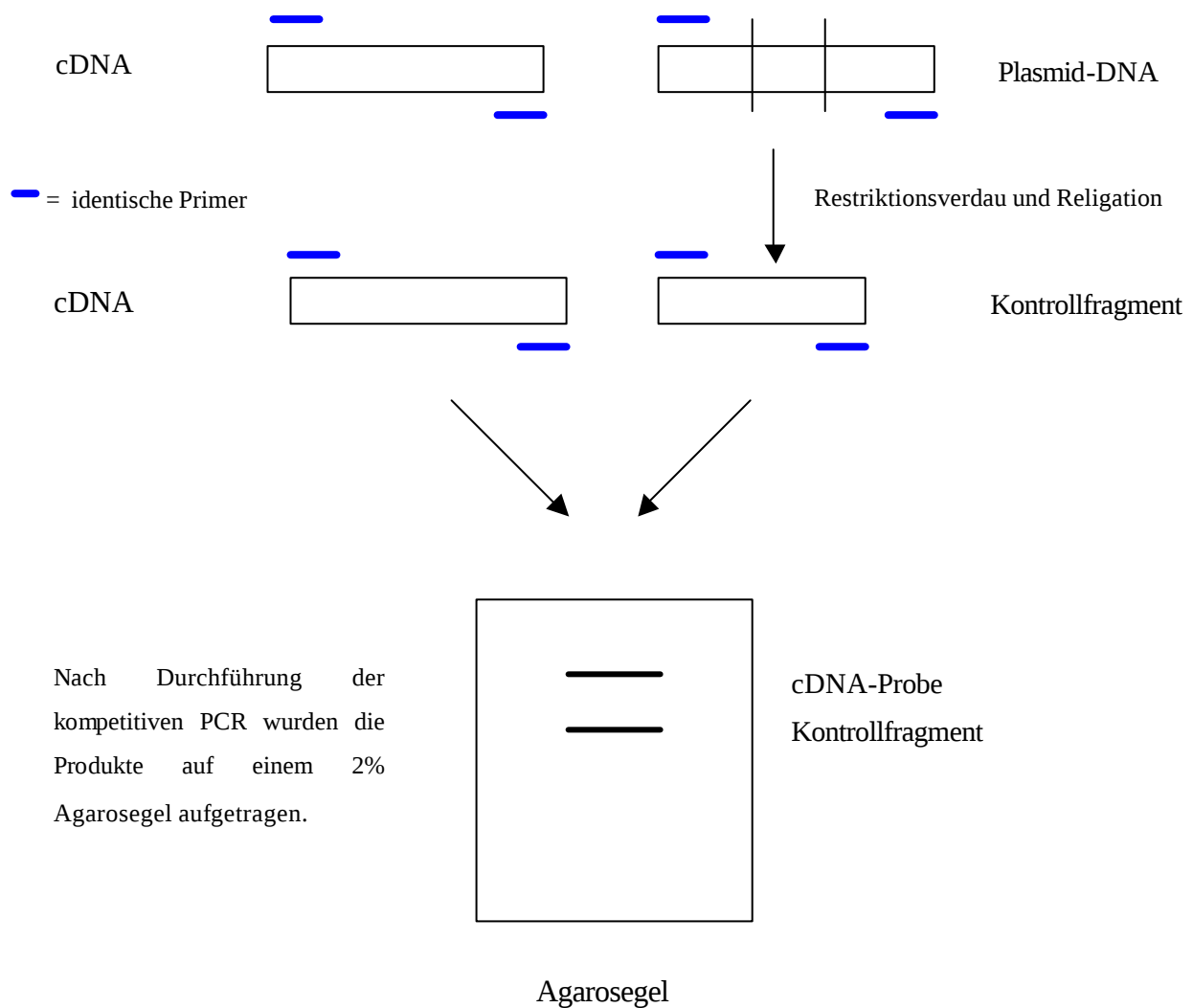
3.3.2 Kompetitive, semiquantitative RT-PCR

Mit der Entwicklung der Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte eine Revolution der Molekularbiologie, die eine Nukleinsäuredetektion in einem Frequenzbereich von einer einzelnen Kopie ermöglicht (Freeman, 1999). Der Hauptstörfaktor für einen erfolgreichen Einsatz der PCR, als eine quantitative Methode, ist der inhärente Wechsel in der chemischen Reaktionskinetik im Verlauf der Zeit. Dies bedeutet, dass zunächst einmal der Bedarf an Substrat und weiteren essentiellen Bestandteilen gewährleistet werden muss (Orlando, 1998).

Jede PCR durchläuft drei Stadien der Amplifikation, die gekennzeichnet sind von stark geänderten Kinetiken. Die erste Phase, auch geometrische Phase genannt, die nur innerhalb der ersten Zyklen stattfindet, wird beschrieben durch eine logarithmische Amplifikation der Template-DNA. Die folgende lineare Phase wird begleitet von einer Reduktion der Amplifikationsrate und Effizienz wodurch das Wachstum des Produktes exponentiell erfolgt. In dieser Phase kommt es zu einer Verdopplung der Amplifikate in jedem durchlaufenden Zyklus. In der dritten und letzten Phase der PCR kommt es zu einem Stop der Akkumulation - die Reaktion erreicht ihren Plateauwert. Das Plateau ist ein unvermeidbares und unbeständiges Phänomen, das durch einen Substratmangel, der Konkurrenz unspezifischer Produkte sowie der Reassoziierung der Target-DNA verursacht wird.

Eine alternative Methode zur Quantifizierung der Genexpression ist die kompetitive, semiquantitative RT-PCR. Bei dieser Methode werden cDNA-Fragmente innerhalb der PCR zueinander in Konkurrenz gesetzt. Da beide Fragmente identische Primerbindestellen tragen, konkurrieren sie um die im Ansatz enthaltenen Primermoleküle. Das kleinere Kompetitorfragment zeigt in der gelelektrophoretischen Auftrennung ein anderes Laufverhalten als das Originalfragment. Da der Kompetitor kürzer ist, kann er in der Elektrophorese schneller wandern, als sein korrespondierendes Fragment.

Schema der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR:



3.3.2.1 Synthese von Kontrollfragmenten

Damit eine kompetitive, semiquantitative RT-PCR etabliert werden konnte, bedurfte es der Synthese von sogenannten Kompetitorfragmenten (Kontrollfragmenten). Dazu wurde die isolierte Plasmid-DNA der Fragmente für GAPDH bzw. für hNIS mit verschiedenen Restriktionsenzymen behandelt, so dass innerhalb des Fragmentes ca. 80-100 Basenpaare (bp) herausgeschnitten wurden.

Zur Synthese des hNIS-Kompetitors wurde die DNA des Klonierungsproduktes mit *DraIII* und *BsgI* spezifisch geschnitten, während für die Kontrollfragmentsynthese von GAPDH die Restriktionsendonukleasen *BlpI* und *BbsI* (alle Enzyme von Promega) verwendet wurden. Beide Ansätze wurden 2 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend für eine weitere Stunde mit ATP, dNTPs und Klenowpolymerase (Promega) behandelt, um glatte Enden zu erzeugen. Nach einer Ethanol-Fällung der DNA (s. Punkt 3.2.10) wurden beide Konstrukte religiert. Es erfolgte eine erneute Transformation in kompetente *E.coli*-Bakterienzellen, mit anschließender Isolierung und Sequenzierung der Klone.

3.3.2.2 Cracking von Plasmiden

Benötigte Lösungen:

Crackingpuffer	5 M NaOH	2 ml
	10% SDS	2,5 ml
	Sucrose	10 g
	H ₂ O	ad 50 ml
3 M Kaliumchlorid	Kaliumchlorid	2,24 g
	A. dest	10 ml

Über ein Cracking wurde ermittelt, welche Klone als potentiell Kontrollfragment in Frage kommen konnten. Mit dieser schnellen Methode konnte nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung ermittelt werden, welche Bakterienklone ein verkürztes DNA-Vektor-Konstrukt enthielten.

Dazu wurden zunächst mehrere Einzelklone gepickt und über Nacht als Schüttelkultur inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 250 µl der Bakterienkultur entnommen und 2 min bei 20.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 40 µl EDTA-Lösung (10 mM) vermischt. Nach der Zugabe von 50 µl Crackingpuffer und wiederholtem vortexen erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 70°C mit anschließender Abkühlung auf Raumtemperatur.

Nach Zugabe von 2 µl 3 M Kaliumchloridlösung und einigen Körnchen Bromphenolblau wurden die Zellen 5 min auf Eis inkubiert, um anschließend für 3 min bei 13.000 x g zentrifugiert zu werden. 20 µl des Cracking-Ansatzes wurden auf einem 1% Agarosegel aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt.

Aus den Schüttelkulturen der Klone, deren Auftrennungsverhalten auf ein verkürztes DNA-Fragment schließen ließ, wurde Plasmid-DNA isoliert (s. Punkt 3.2.8), ein Kontrollverdau durchgeführt (s. Punkt 3.2.9) und interessante Klone abschließend ansequenziert (s. Punkt 3.2.10).

3.3.2.3 Kompetitive, semiquantitative RT-PCR

Im Verlauf dieser PCR kommt es zu einer Kompetition zwischen der eingesetzten cDNA und dem Kontrollfragment (KF), welches in definierter Konzentration dem PCR-Ansatz zugesetzt wurde. Damit eine quantitative Aussage ermöglicht werden konnte, wurde in einer ersten PCR-Reihe der cDNA-Gehalt auf das "house keeping"-Gen GAPDH normalisiert. Dies bedeutet, dass in jedem Reaktionsgefäß eine konstante Menge an Kontrollfragment pipettiert wurde (z.B. 10^7 Kopien KF-GAPDH) und die eingesetzte Menge an cDNA solange variiert wurde, bis alle PCR-Amplifikate nach der gelelektrophoretischen Auftrennung ein Verhältnis der resultierenden Bandenintensitäten von etwa 1:1 zeigten.

Die so ermittelten cDNA-Mengen wurden in einer zweiten PCR-Reihe auf hNIS eingesetzt. Dabei wurde zunächst ermittelt, welche hNIS-Kompetitorverdünnungsstufe gewählt werden musste, damit das Verhältnis der Bandenintensität zwischen Kompetitor und der unbehandelten (basalen) cDNA-Probe etwa 1:1 betrug. Diese Verdünnungsstufe wurde dann in einer weiteren PCR konstant zu den ermittelten cDNA-Mengen eingesetzt.

Die resultierenden PCR-Amplifikate wurden gelelektrophoretisch auf einem Agarosegel (2%) aufgetrennt. Das Gel wurde am LumiImager (Roche Diagnostics) aufgenommen und dort über eine spezielle Software (LumiAnalyst) quantifiziert. Hierüber konnte eine Aussage getroffen werden, um welchen Faktor die Expression des Symporters nach der Zugabe verschiedener Reagenzien inhibiert bzw. stimuliert wurde.

Für die RT-PCR auf GAPDH wurde zu folgendem Reaktionsgemisch bestehend aus

5,0 µl	10x Reaktionspuffer mit MgCl ₂
2,0 µl	dNTP (jedes Nukleotid 10 mM)
5,0 µl	GAPDH sense (10 µM)
5,0 µl	GAPDH antisense (10 µM)
0,7 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

eine variable Menge an cDNA und 2,0 µl der jeweiligen Kompetitorplasmidverdünnung gegeben und der Reaktionsansatz auf ein Endvolumen von 50 µl gebracht, bevor das in Tab. 3.2 aufgeführte PCR-Profil durchlaufen wurde. Abschließend wurden 25 µl des PCR-Produktes auf einem 2% Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Im Fall von hNIS wurde folgendes Reaktionsgemisch in Form eines Mastermixes vorgelegt:

2,5 µl	10x Reaktionspuffer ohne MgCl ₂
4,0 µl	MgCl ₂ (25 mM)
2,0 µl	dNTP (jedes Nukleotid 10 mM)
2,5 µl	hNIS sense (10 µM)
2,5 µl	hNIS antisense (10 µM)
1,5 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)

Zu diesem Mastermix wurde die ermittelte cDNA-Menge sowie die entsprechende Kompetitorverdünnung (2µl) hinzugegeben und das Gemisch auf ein Endvolumen von 25 µl gebracht, bevor das in Tab. 3.2 aufgelistete PCR-Profil durchlaufen wurde. Auch hier wurden die PCR-Amplifikate auf einem 2% Agarosegel aufgetragen und nach erfolgreicher Elektrophorese am LumiImager aufgenommen und für weitere Analysen archiviert.

	Natrium-Jodid-Symporter (hNIS)	Glycerinaldehyd-3-phosphat- dehydrogenase (GAPDH)
sense Primer	ggg cct cac cag cac cta cga	gca ggg ggg agc caa aag gg
antisense Primer	tgc cac cca cca caa aag tcc aga a	tgc cag ccc cag cgt caa ag
Fragmentgröße	418 bp	566 bp
Kontrollfragment	299 bp	480 bp
Prädenaturierung	2 min ; 94°C	2,5 min. ; 94°C
PCR	30 sek ; 94 °C 35 sek ; 65°C 45 sek ; 72°C	30 sek ; 94 °C 30 sek ; 59°C 30 sek ; 72°C
term. Elongation	7 min ; 72°C	7 min ; 72°C
Zykluszahl	40	35

Tab. 3.2: Primersequenzen und Reaktionsbedingungen zur Durchführung der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR auf GAPDH bzw. auf hNIS

3.3.2.4 Quantitative Analyse der PCR-Produkte

Über den LumiImager und der dazugehörenden LumiAnalyst Software wurden die Intensitäten der resultierenden PCR-Banden bestimmt. Dabei wurde zunächst einmal geprüft, inwieweit die vorliegenden Konzentrationsverhältnisse zwischen cDNA und dem Kompetitor für GAPDH gleich sind, oder ob bei der Auswertung der hNIS-PCR ein Korrekturfaktor berücksichtigt werden musste. Im Fall von hNIS, wurden die berechneten Intensitäten für die einzelnen cDNA-Proben zur basalen Probe ins Verhältnis gesetzt und somit ein Stimulations- bzw. Inhibitionsfaktor errechnet.

Kommt es zu einer gesteigerten Expression von hNIS in der korrespondierenden cDNA-Probe, so verschiebt sich das Bandenverhältnis zu Gunsten der cDNA-Probe. Im Fall einer Inhibition verschiebt sich das Verhältnis der Bandenintensitäten in Richtung des eingesetzten Kompetitors.

3.3.3 Real-Time Polymerasekettenreaktion

Des Weiteren wurde im Verlauf dieser Arbeit eine Methode zur Real-Time Quantifizierung der Expression spezifischer mRNA etabliert. Dazu wurde das LightCycler System der Firma Roche Diagnostics verwendet. Dieses System bietet den Vorteil innerhalb kurzer Zeit eine große Probenzahl messen zu können. Innerhalb dieses Systems kann die Generierung von PCR-Produkten in Real-Time verfolgt werden. Die PCR-Reaktion läuft in speziellen Borsilikat-Glaskapillaren ab, welche durch ihr günstiges Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis Temperaturänderungsraten von bis zu 20°C/sek erlauben. Es wurde sowohl eine Real-Time PCR für GAPDH als auch für hNIS, unter Einsatz spezifisch fluoreszenzmarkierter Sonden, etabliert.

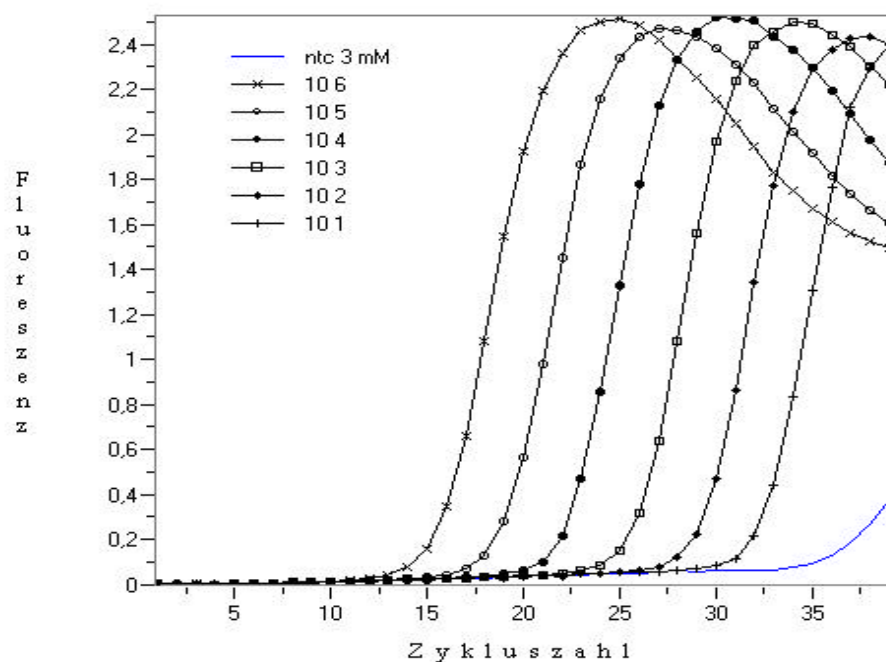


Abb.3.1: Dargestellt ist die Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl während einer Real-Time PCR über 40 Zyklen. Als Probenmaterial fungierte der synthetisierte externe Standard des Symporters in einer Konzentration von 10^6 bis 10^1 Kopien und einer Wasserkontrolle (ntc).

3.3.3.1 Herstellung eines externen Standards

Um mittels einer Real-Time PCR quantifizieren zu können, bedurfte es eines eigens für diese PCR hergestellten Standards. Als Standard fungierten die unter Punkt 3.2 klonierten PCR-Fragmente.

Um eine optimale Effizienz innerhalb der PCR zu erlangen und einen Vergleich zwischen den zu messenden cDNA-Proben zu ermöglichen, wurden die Plasmidstandards zunächst linearisiert (GAPDH mit *PstI*; hNIS mit *EcoRI*). Nach erfolgter Linearisierung wurde der DNA-Gehalt spektrophotometrisch ermittelt. Die vorliegende Kopienzahl wurde über folgende Formel berechnet:

$$\text{Kopienzahl/ } \mu\text{l} = \frac{\text{Konzentration [g/}\mu\text{l]}}{\text{Plasmidgröße [nt] * 660 g/mol}}$$

Die Konzentration des entsprechenden Standards wurde auf 10^{10} Kopien/2 μl eingestellt, zu je 10 μl in silanisierten Einmal-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Bei Bedarf wurde eine serielle Verdünnung in Zehnerschritten hergestellt und 2 μl der jeweiligen Verdünnungsstufe in die PCR eingesetzt.

3.3.3.2 Auswahl spezifischer Primer und Hybridisierungssonden

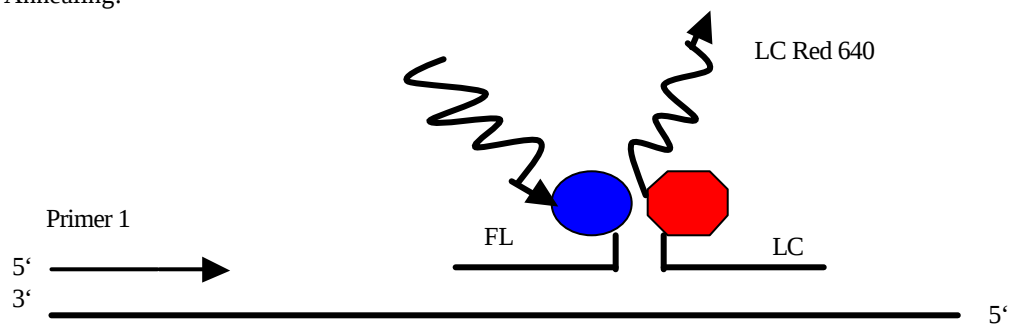
Für die Quantifizierung von hNIS und GAPDH wurden Primer und Hybridisierungssonden ausgewählt, die folgenden Kriterien entsprachen. Das resultierende PCR-Produkt sollte ca. 200 bis 300 bp lang sein und innerhalb des klonierten Fragmentbereiches liegen. Des weiteren wurde eine Annealingtemperatur zwischen 55 und 65°C gewählt. Der GC-Gehalt der Primer sollte zwischen 50 und 60% liegen, wobei eine Primerlänge von 20 bis 25 Nukleotiden nicht überschritten werden sollte. Die Primer wurden zudem so ausgewählt, dass sie Exon-Intron-überspannend waren.

Durch den Einsatz spezifisch markierter Sonden erfolgte die Detektion der PCR-Produkte. Die Lage der Hybridisierungsproben wurde so gewählt, dass sie innerhalb des durch die Primer begrenzten Fragmentes liegen und somit zu einer Erhöhung der Spezifität für das PCR-Produkt führen.

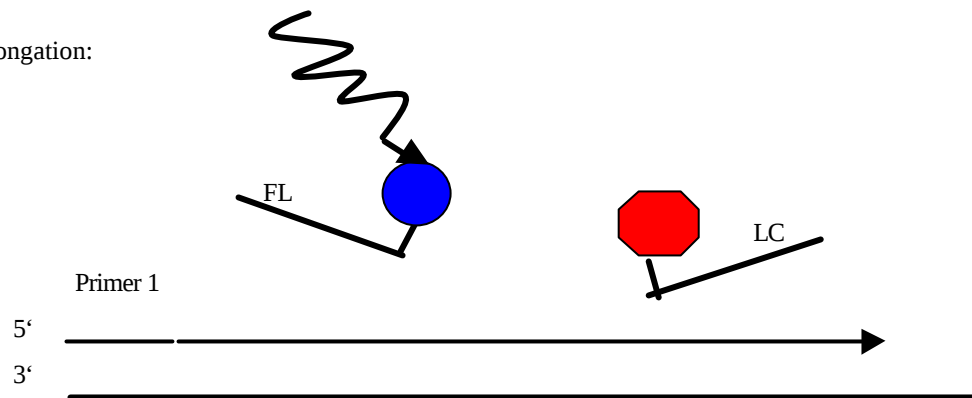
Bei den Hybridisierungsproben handelt es sich um Oligonukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch markiert sind. Die erste Sonde ist an ihrem 3'-Ende mit dem Donorfarbstoff Fluoreszein markiert, während die zweite an ihrem 5'-Ende den Akzeptorfarbstoff LightCycler-Red 640 (LC-Red 640) trägt sowie über eine freie Phosphatgruppe an ihrem 3'-Ende verfügt. Durch eine Kopf-an-Schwanz-Anordnung der Sonden in der Primerannealingphase der PCR, werden beide Sonden in relative Nähe zueinander gebracht. Der maximale Abstand zwischen den beiden Sonden sollte dabei ca. 5 Nukleotide betragen. Bedingt durch diese räumliche Nähe kann die Energie der Donorsonde (fluoreszenzmarkierte Sonde) über einen sogenannten "Fluoreszenzresonanzenergietransfer" (FRET) auf die Akzeptorsonde übertragen werden, die dann Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert, welches von den optischen Einheiten des LightCyclers detektiert wird. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt während der Annealingphase eines jeden Zyklus, wobei die Intensität der gemessenen Fluoreszenz direkt proportional zur gebildeten Menge an Amplifikat ist.

Schema der LightCycler Real-Time PCR:

1. Annealing:



2. Elongation:



Zur Etablierung der PCR wurden folgende, in Tab. 3.3 dargestellten Primer und Hybridisierungs-sonden, synthetisiert:

Primer und Sonden	Sequenz
GAPDH 1 for	5′ - ttg gta tcg tgg aag gac tca
GAPDH1 rev	5′ - tgt cat cat att tgg cag gtt t
GAPDH FL	5′ - tgt ccc cac tgc caa cgt gtc ag -3′-Fluor
GAPDH LC	5′ - LC Red640-ggt gga cct gac ctg ccg tct aga
hNIS F	5′ - gcc tca cca gca cct acg ag
hNIS F1	5′ - ctc atc ctg aac caa gtg acc g
hNIS F2	5′ - tag cca cga tgc tgt aca ccg
hNIS R	5′ - cag aat gta tag cgg ctc ctc g
hNIS R1	5′ - gtt aaa gtc cat gag gtt gat ccg
HNIS FL	5′ - cac tta gca tca cca cga cct gga ac -3′-Fluor
HNIS LC	5′ - LC Red640- cat cag ttc aga cca cag cct tca tg

Tab. 3.3: Oligonukleotidsequenz der Primer und Hybridisierungs-sonden für hNIS bzw. GAPDH

3.3.3.3 Ermittlung der optimalen $MgCl_2$ -Konzentration sowie eines geeigneten Primerpaares für die Real-Time PCR auf hNIS

Faktoren, wie die eingesetzte Primerkonzentration, deren Annealingtemperatur sowie die eingesetzte $MgCl_2$ -Konzentration haben einen wesentlichen Einfluss auf die Spezifität und Effektivität der PCR. Dazu wurden in entsprechenden Vorversuchen alle wesentlichen Reaktionsparameter optimiert, so dass mit Hilfe der Real-Time PCR eine optimale Quantifizierung von PCR-Produkten erfolgen konnte.

Mg²⁺-Ionen fungieren als Cofaktoren für DNA-Polymerasen, die ihrerseits den Prozess der Elongation ermöglichen und müssen folglich in ausreichender Menge dem PCR-Ansatz hinzugefügt werden, damit die eingesetzte DNA-Polymerase optimal arbeiten kann.

Zwischen eingesetzter MgCl₂-Konzentration und DNA-Polymerase besteht jedoch keine direkte Proportionalität, so dass sowohl zu hohe als auch zu niedrige MgCl₂-Konzentrationen die PCR stören können.

Zur Etablierung einer Real-Time PCR für hNIS wurden die synthetisierten Oligonukleotidprimer (s. Tab. 3.3) in allen möglichen Kombinationen zusammen mit dem Hybridisierungsproben in einer ersten PCR eingesetzt, wobei eine Annealingtemperatur von 60°C und eine MgCl₂-Konzentration von 3,5 mM gewählt wurde. Als Template zur Überprüfung der einzelnen Primerkombinationen und MgCl₂-Konzentration fungierte das hNIS-Plasmid in einer Verdünnungsreihe von 10⁶ bis 10¹ Kopien.

Es wurden nachfolgende Primerkombinationen ausgetestet, wobei jeder Primer in einer Konzentration von 0,5 µM eingesetzt wurde:

F/R	F1/R	F2/R	F/R1	F1/R1	F2/R1
-----	------	------	------	-------	-------

Daraus ergab sich für einen PCR-Ansatz folgender Mastermix:

Matrizen-DNA (Standard, cDNA , H ₂ O)	2,0 µl
FastStart DNA Master Hybridization Probe	2,0 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Primer sense (5 µM)	2,0 µl
Primer antisense (5µM)	2,0 µl
PCR-H ₂ O	ad 20 µl

Die PCR-Ansätze wurden in die in speziellen Zentrifugenadaptern gekühlten Glaskapillaren pipettiert, in diesen 30 sek bei 2900 rpm zentrifugiert und sofort in den LightCycler Rotor eingesetzt und das vorbereitete PCR-Programm gestartet.

Zur Optimierung der Real Time PCR am LightCycler für den humanen Natrium-Jodid-Symporter wurde folgendes PCR-Profil durchlaufen:

Denaturierung

Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

PCR

Cycles	42						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	60	12	20	0	0	0	Single
3	72	17	20	0	0	0	None

Kühlung

Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

3.3.3.4 Optimierung der Real-Time PCR für GAPDH

Im Gegensatz zur Etablierung der Real-Time PCR für den Symporter wurde für GAPDH nur ein Primer/Sondenpaar gefunden, so dass lediglich die optimale MgCl_2 -Konzentration für die Real-Time PCR ermittelt werden mußte. Dazu wurden folgende in Tab. 3.4 aufgelisteten Mastermixe hergestellt und für jede MgCl_2 -Konzentration zwei Verdünnungsstufen (10^4 bzw. 10^2 Kopien GAPDH-Plasmid) in der LightCycler PCR ausgetestet.

	Mix 1		Mix 2		Mix 3		Mix 4	
MgCl ₂	0,8 µl	2 mM	1,6 µl	3 mM	2,0 µl	4 mM	2,4 µl	5 mM
GAPDH1 for	1,0 µl	0,25 µM	1,0 µl	0,25 µM	1,0 µl	0,25 µM	1,0 µl	0,25 µM
GAPDH 1 rev	1,0 µl	0,25 µM	1,0 µl	0,25 µM	1,0 µl	0,25 µM	1,0 µl	0,25 µM
GAPDH LC	2,0 µl	0,2 µM	2,0 µl	0,2 µM	2,0 µl	0,2 µM	2,0 µl	0,2 µM
GAPDH FL	2,0 µl	0,2 µM	2,0 µl	0,2 µM	2,0 µl	0,2 µM	2,0 µl	0,2 µM
LC-Master	2,0 µl	1 x	2,0 µl	1 x	2,0 µl	1 x	2,0 µl	1 x
PCR- H ₂ O	8,8 µl		8,4 µl		8,0 µl		7,6 µl	

Tab. 3.4: Mastermix für vier verschiedene MgCl₂-Konzentrationen zur Ermittlung der optimalen Salzkonzentration für die Real-Time PCR auf GAPDH

Zur Ermittlung einer optimalen Real-Time PCR auf GAPDH ergab sich folgendes PCR-Profil:

Denaturierung

Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

PCR

Cycles	46						
Type:	Quantification		Fluorescence Display Mode =			F2/1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	60	10	20	0	0	0	Single
3	72	15	20	0	0	0	None

Kühlung

Cycles	1						
Type:	None		Fluorescence Display Mode =			F2/1	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

3.3.3.5 Quantifizierung der Expression des Symporters

Zur Ermittlung der GAPDH-Kopienzahl wurden 40 ng cDNA in die optimierte Real-Time PCR (s. Punkt 3.3.3.4) eingesetzt. Dies entsprach 2 µl einer 1:10 Verdünnung. Zur Amplifikation von hNIS wurden 200-250 ng cDNA eingesetzt. Gleichzeitig wurde in jedem Real-Time PCR-Lauf eine "no template control" (ntc; Wasserkontrolle) sowie eine Verdünnungsreihe des jeweiligen externen, homologen Standards mitgeführt. Im Fall von hNIS umfasste die Standardkurve 10^6 bis 10^1 Kopien, während die Standardkurve für GAPDH von 10^7 bis 10^3 Kopien reichte.

Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte über die LightCycler Software LCDA (Version 3.1.102). Als Analysemodul wurde in beiden Fällen die "Fit Points"-Methode angewandt, welche vor allem bei der Quantifizierung in einem Kopienbereich von weniger als 1000 Kopien zu reproduzierbaren Ergebnissen führte (s. dazu Punkt 3.3.3.6). Die resultierenden Kopienzahlen für hNIS wurden auf GAPDH normalisiert, in dem sie mit einem Korrekturfaktor verrechnet wurden, so dass als Ergebnis die hNIS-Kopienzahl pro 1 Mio. GAPDH-Kopien angegeben wurde.

3.3.3.6 Ermittlung der PCR-Effizienz

Die genaue Bestimmung der PCR-Effizienz als Maß für die Qualität der PCR-Reaktion ergab sich aus den resultierenden PCR-Produkten der mitgeführten Verdünnungsreihe des Plasmidstandards. Die Auswertung erfolgte über die "Fit Points"-Methode. Diese Methode greift vor allem dann, wenn die Kopienzahl zu Beginn der PCR unter 1000 Kopien liegt. Hierbei wird der Schnittpunkt der log-linearen Phase mit der "Noise Band" festgelegt. Dieser Schnittpunkt wird als C_T -Wert angegeben und bezeichnet den Punkt, an dem ein PCR-Signal klar vom Hintergrund getrennt werden kann. Aus der Steigung der linearen Regression über die Auftragung der C_T -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienzahl lässt sich die PCR-Effizienz nach folgender Formel errechnen:

$$\text{PCR-Effizienz} = \log_{10}^{1/\text{Steigung der linearen Regression}}$$

Eine PCR wurde als optimal bezeichnet, wenn ihre Effizienz zwischen 1,8 und 2,0 liegt.

3.4 Isolierung und Anlegung thyreoidaler Primärkulturen

Benötigte Lösungen:

Spinnerlösung	Earles BBS (10x)	100 ml
	NaHCO ₃	6 ml
	Ampura (A.dest)	ad 1 l
Kultivierungsmedium	RPMI 1640-Medium	450 ml
	Glutamin	500 µl
	Penicillin/Streptomycin	500 µl
	FKS	50 ml

Das operativ entfernte Schilddrüsengewebe von Patienten mit Struma diffusa wurde in RPMI 1640 als Transportmedium bei 4°C gelagert.

Zu Beginn der Thyreozytenisolierung wurde frische Spinnerlösung hergestellt. Pro Gewebe wurden 250 mg Dispase abgewogen und in 50 ml 37°C warmer Spinnerlösung gelöst und anschließend sterilfiltriert. Durch kräftiges Schütteln des Falcon-Röhrchens wurde die Schilddrüse 3x mit je 40 ml Spinnerlösung gewaschen. Bevor das Gewebe fein zerkleinert wurde, wurde es von überschüssigem Fett- und Bindegewebe befreit. Das zerkleinerte Gewebe wurde in einen sterilen Schikane-Erlenmeyerkolben überführt und mit der sterilen DispaLösung vermischt. Unter starkem Rühren wurde das zerkleinerte Gewebe 2-3 Std. bei 37°C im Was-serbad inkubiert. Anschließend wurde die verdaute Zellsuspension durch ein Doppelsieb passiert und in einem sterilen Becherglas aufgefangen. Die Zellsuspension wurde mit Spinnerlösung auf ein Gesamtvolumen von 100 ml gebracht, auf zwei Falcon-Röhrchen verteilt und in einer vorgekühlten Zentrifuge 6 min bei 5000 rpm (ohne Bremse) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 50 ml Spinnerlösung aufgenommen, gewaschen und 7 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Waschschrift wurde solange wiederholt bis die Thyreozyten annähernd blutfrei waren. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Pellets in 20 ml Kultivierungsmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

3.5 Durchführung der Stimulationsexperimente

Nach ca. 2 Wochen Kultivierungsdauer, inklusive Mediumwechsel und Vereinzeln der Zellen bei zu hoher Zelldichte, wurden ca. 1×10^6 Zellen/ml im 6-well-Format ausgesät und nach weiteren 24 Std. die entsprechenden Experimente gestartet. Innerhalb dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Expression des Symporters durch die Zugabe von Faktoren die einen Einfluss auf die Schilddrüsenhormonsynthese (Forskolin, bTSH) haben oder aber Faktoren, die an der Entwicklung von Schilddrüsenerkrankungen beteiligt sein könnten (TNF- α , TGF- β 1) beeinflusst werden kann. Während Stimulationseffekte relativ leicht zu messen sind, erfolgte bei der Untersuchung möglicher Inhibitoren der Symporterexpression zunächst eine Stimulation mit 10 mU/ml bTSH für 24 Std., bevor den Zellen die potenten Inhibitoren zugesetzt wurden.

Neben einer Konzentrationsreihe für jede Substanz (Forskolin, bTSH, TNF- α , TGF- β 1) wurde zusätzlich die Zeitabhängigkeit für bTSH und Forskolin bestimmt.

3.6 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Untersuchung des Expressionsverhaltens des humanen Natrium-Jodid-Symporter wurden, wie unter Punkt 3.4 und 3.5 beschrieben, primäre Thyreozytenkulturen angelegt und entsprechen stimuliert bzw. inhibiert.

Aus den stimulierten Thyreozyten wurde Gesamt-RNA isoliert. Diese RNA wurde entweder direkt in die Northern Blot Analyse eingesetzt oder aber in cDNA umgeschrieben, die dann als Template zur Durchführung der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR bzw. der Real-Time PCR fungierte.

Im folgenden werden jeweils zwei verschiedene RNA-Isolierungs- bzw. cDNA-Synthesemethoden beschrieben, die zur Quantifizierung der Expression des humanen Natrium-Jodid-Symporters eingesetzt wurden.

3.6.1 Isolierung von RNA mit TRIZOL[®]

Nach erfolgter Stimulation der Thyreozyten wurde das Kultivierungsmedium verworfen und die Zellen in 1ml TRIZOL (Gibco Life Technologies) aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Eppendorfgefäße 15 sek per Hand geschüttelt und nach 2-3 min bei 4°C und 11.800 rpm für 15 min zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und 500 µl Isopropanol dazugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation (Präzipitation der RNA) wurde die RNA 10 min bei 11.800 rpm und 4°C zentrifugiert. Die pelletierte RNA wurde mit 75% DEPC-Ethanol gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation von 5 min bei 4°C und maximaler Geschwindigkeit 5 min luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl Nuklease-freiem Wasser resuspendiert und mit 1µl RNasin (RNase-Inhibitor, Promega) vermischt.

3.6.2 Isolierung von Gesamt-RNA mit dem RNeasy Mini Kit

Zur Bestimmung des Expressionsverhaltens mittels Real-Time PCR erfolgte die Isolierung der RNA über das RNeasy Mini Kit (Qiagen). Diese RNA-Isolierungstechnik verbindet selektive Bindungseigenschaften einer Silicagel-Membran mit den hohen Zentrifugationsgeschwindigkeiten von Tischzentrifugen. Sie ist zu dem weniger gesundheitsgefährdend als die Isolierung der RNA über TRIZOL, bei der man über längere Zeiträume hinweg phenolischen Dämpfen ausgesetzt ist.

Zu Beginn der Isolierung wurden die Proben durch den Einsatz eines denaturierenden Guanidin-Thiocyanat-haltigen Puffers lysiert. Parallel dazu erfolgte eine Inaktivierung von RNAsen, um sicherzustellen, dass intakte Ribonukleinsäuren isoliert werden. Nach der Lyse wurde das Zellmaterial in speziellen "QIAshreddern" zerkleinert. Durch die Zugabe von Ethanol wurde die Bindungskapazität der Nukleinsäure derart erhöht, so dass in der anschließenden Zentrifugation die Gesamt-RNA an die Membran des "Spin Columns" gebunden werden konnte. Über mehrere Waschschrte wurden unspezifisch gebundene Fragmente, sowie Salze ausgewaschen, bevor die RNA in 50 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert wurde.

Da ein relativ großes Elutionsvolumen gewählt wurde, erfolgte eine Einengung der resuspendierten RNA unter Vakuum. Dieser Einengungsprozess wurde mit einem DNase-Verdau gekoppelt, um eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA ausschließen zu können. Demnach wurden zu 50 µl RNA-Lösung 4 µl einer 1:10 verdünnten DNase I-Lösung (Roche Diagnostics) gegeben und zusammen im Vakuumtrockner bei ca. 35°C auf das gewünschte Volumen von ca. 15 µl eingengt.

3.6.3 Spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Benötigte Lösungen:

TE-Puffer:	Tris/HCl pH 8,0	10 mM
	EDTA	1 mM

Sowohl die Konzentration als auch der Reinheitsgrad der isolierten RNA wurden durch eine spektrophotometrische Messung der optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Dazu wurde die RNA-Lösung 1:70 in TE-Puffer verdünnt und die optische Dichte (OD) nach Kalibrierung des Photometers mit TE-Puffer als Blindwert bestimmt. Der gemessene Wert bei 260 nm erlaubt die Berechnung der RNA-Konzentration in der Probe nach folgender Formel:

$$\begin{aligned}\mu\text{g/ml RNA} &= \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnung} \times \text{Extinktionsfaktor} \\ &= \text{OD}_{260} \times 70 \times 44,18\end{aligned}$$

Das Verhältnis der gemessenen OD₂₆₀- zu den resultierenden OD₂₈₀-Werten lässt Rückschlüsse auf die Reinheit der RNA zu. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 ist dabei optimal.

Nach erfolgter Berechnung der Gesamtmenge an isolierter RNA wurden 1-3 µg RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt.

3.6.4 Synthese komplementärer DNA (cDNA) mit der ExpandTM Reverse Transkriptase

Bei diesem als Reverse Transkription bezeichneten Prozess, bei dem das Enzym Desoxynukleosid-Triphosphate komplementär zum RNA-Strang synthetisiert, diente die isolierte RNA als Matrize für die Synthese eines einzelsträngigen DNA-Stranges. Das Enzym benötigt jedoch als Startsequenz für die Synthese eines cDNA-Stranges einen kurzen, doppelsträngigen Nukleinsäurebereich, der durch die Reaktion von Oligonukleotiden (Oligo(dT)) mit dem im RNA-Strang vorhandenen polyadenylierten Bereich - dem Poly A-Schwanz - entsteht.

Zur Synthese von cDNA wurden in einem dünnwandigen 200 µl PCR-Gefäß 1 µg TRIZOL-RNA mit 1µl RNase-freier DNase I vermischt, auf ein Endvolumen von 24 µl gebracht und nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C, dem Temperaturoptimum der DNase I, um eventuell vorliegende genomische DNA abzubauen, anschließend für weitere 10 min bei 65°C inkubiert (Inaktivierung der DNase I). Nachfolgend wurde folgendes Reaktionsgemisch zu dem Reaktionsansatz und nunmehr inaktiver DNase I gegeben:

8 µl	5 x Expand TM Reverse Transkriptase Puffer
4 µl	DTT (100 mM)
2 µl	dNTP-Mix (jedes Nukleotid 10 mM)
1 µl	Oligo(dT) ₁₅ -Primer (1µg/µl)
1 µl	Expand TM Reverse Transkriptase (50 units/µl)

Dieses Gemisch wurde bei 42°C 1 Std. inkubiert, bevor die Proben aliquotiert wurden und entsprechend bei -20°C gelagert wurden. Die für die Reverse Transkription benötigten Reagenzien stammten alle von der Firma Roche Diagnostics.

3.6.5 Synthese von cDNA mit dem Bulk First Strand Reaction Mix

Eine alternative Methode zur Synthese von cDNA über die ExpandTM Reverse Transkriptase ist der Einsatz des Bulk First Strand Reaction Mix (Amersham Pharmacia Biotech). Dieser ermöglicht eine Umschreibung von bis zu 3 µg RNA in cDNA in einem Reaktionsvolumen von 15 µl.

Die in die Real-Time PCR eingesetzten cDNA-Proben stammten allesamt aus RNAs, die über das Qiagen-Kit (s. Punkt 3.6.2) isoliert und anschließend mit dem Bulk First Strand Reaction Mix in cDNA umgeschrieben worden waren.

Dabei wurden 3 µg RNA-Lösung mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 8 µl gebracht und 10 min bei 65°C erhitzt. Der für die Synthese von cDNA benötigte Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

Bulk First Strand Reaction Mix	5 µl
DTT	1 µl
Not I-d(T) ₁₈ -Primer (1:25 verdünnt)	1 µl

Nach erfolgreicher Denaturierung der RNA wurden je 7 µl des Mastermixes zu der RNA-Lösung gegeben und der komplette Ansatz 1 Std. bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde die synthetisierte cDNA in Anlehnung an das Protokoll des High Pure PCR Product Purification Kits (Roche Diagnostics) aufgereinigt und nach abschließender Elution in 20 µl Elutionspuffer bis zur Durchführung der Real-Time PCR am LightCycler bei 4°C gelagert.

3.7 Untersuchung der funktionellen Aktivität von hNIS

Ein weiteres Merkmal des Natrium-Jodid-Symporters ist die Fähigkeit zur aktiven Aufnahme von Jodid. Deshalb wurden Untersuchungen zur Charakterisierung der funktionellen Aktivität des rekombinanten, humanen Symporters durchgeführt.

3.7.1 Klonierung des humanen Natrium-Jodid-Symporters

Zur Klonierung eines vollständigen NIS-cDNA-Klones wurde aus humanem Schilddrüsengewebe RNA isoliert, welche mit Hilfe der AMV Reversen Transkriptase (Roche Diagnostics) in cDNA umgeschrieben wurde. Der "full length" Symporter wurde über eine 30 Zyklen umfassende PCR amplifiziert, die sich zusammensetzt aus einer Denaturierung für 30 sek bei 94°C, einem Primerannealing für 30 sek bei 60°C und einer Extension bei 72°C für 1 min unter Einsatz des folgenden spezifischen Primerpaares (*hNIS-FL forward* 5'-GCCGCCACCATGCAGGCCCTGGAGACC-3' und *hNIS-FL reverse* 5'-TGGCCCTGTC-CTCAGAGGTT-3'). Die Primer waren so ausgesucht worden, dass sie neben der publizierten NIS-cDNA-Sequenz zusätzlich eine KOZAK-Sequenz (GCCGCCACC) enthielten, die über den sense-Primer co-amplifiziert wurde. Das PCR-Produkt wurde aus dem Gel eluiert und anschließend in die *BamHI*-Schnittstelle des pBK-CMV Vektors (Stratagene) bzw. in die *HincII*-Schnittstelle des pGEM-4Z Vektors (Promega) ligiert. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz der klonierten Produkte erfolgte über eine automatisierte Sequenzierung (Applied Biosystems).

3.7.2 Transfektion der Zelllinie FTC236 bzw. CHO mit dem "full length" Symporter

Unter Transfektion versteht man den Transfer von DNA in Säugerzellen. Neben der transienten (abortiven) Transfektion, bei der die eingeschleuste DNA nicht ins Chromosom der Empfängerzelle eingebaut wird, gibt es die sogenannte stabile (permanente) Transfektion. Zur Einschleusung von DNA in Zellen sind verschiedene Techniken entwickelt worden.

Neben der Calcium-Phosphat-Präzipitation, der DEAE-Dextran Technik, der Elektroporation, der Mikroinjektion und dem Gebrauch viraler Vektoren gibt es die kationische Liposomen-vermittelte Transfektion (z.B. FuGENETM, Roche Diagnostics), bei der mit Nukleinsäuren-beladene Phospholipid-Vesikel mit der Zellmembran der Empfängerzelle fusionieren, so dass ihr Inhalt durch Endozytose ins Zellinnere gelangt.

Die zur Transfektion eingesetzten Zellen wurden wie in Tab 3.5 aufgelistet kultiviert:

CHO chin. Hamsterovarzellen	FTC236 humane, folliculäre Schilddrüsenkarzinomzellen
RPMI 1640 w/o Glutamin	RPMI 1640 w/o Glutamin
2% Glutamin	2% Glutamin
10% fötales Kälberserum	10% fötales Kälberserum
4% HT-Supplement	

100.000 Zellen wurden in 5 ml Kulturmedium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% wachsen gelassen. Pro Transfektion wurden je 4,5 µl FuGENETM-Reagenz (Roche Diagnostics) in 85,5 µl serumfreies Medium gegeben und 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1,5 µg des hNIS-pBK-Vektorkonstruktes gemischt und weitere 15 min bei RT inkubiert.

Vor Zugabe des Transfektionsansatzes wurde das alte Kulturmedium durch 2 ml antibiotikumfreies Medium ersetzt. Zu diesen 2 ml wurde nun tropfenweise der komplette Transfektionsansatz gegeben und anschließend mit 3 ml ebenfalls antibiotikumfreiem Medium überschichtet. Nach einer Inkubation von 24 Std. wurde dem Kulturmedium als Selektionsantibiotikum G418 (Geneticin, Calbiochem) in einer Konzentration von 50-62,5 µg/ml Kulturmedium zugesetzt. Im Zuge dieser Selektion überlebten nur die Zellen, in die das Vektorkonstrukt erfolgreich eingebaut werden konnte, wodurch die Zellen nunmehr resistent gegen G418 wurden.

Die Zellen, die überlebten, wurden in einer anschließenden "limiting dilution" so weit verdünnt, dass Einzelklone kultiviert wurden, die dann mittels einer Real-Time PCR am LightCycler quantitativ erfasst wurden. Die Klone, die eine hohe Kopienzahl für hNIS zeigten, wurden zu weiteren Untersuchungen in Kultur genommen.

3.7.3 Studien zur Aufnahme von Na-¹²⁵Jodid

Benötigte Lösungen:

Hepespuffer	120 mM NaCl	7,01 g/l
	5 mM KCl	0,37 g/l
	3 mM Na ₂ HPO ₄	0,53 g/l
	1 mM MgCl ₂ x 7H ₂ O	0,20 g/l
	1 mM CaCl	0,15 g/l
	10 mM Glucose	1,80 g/l
	20 mM Hepes (pH 7,4)	5,21 g/l
	1 mM Methimazol	0,11 g/l
	1 µM KJ	1 ml/l aus 1 mM Stock
10% TCA	Trichloressigsäure	10%
	H ₂ O	ad 1 l

Zur Durchführung von Studien zur Aufnahme von Jodid wurden je 100.000 Zellen/2 ml Vollmedium im 6-well-Plattenformat ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% wachsen gelassen. Vor Zugabe der Radioaktivität wurden die Zellen 2x mit temperiertem HEPES-Puffer gewaschen.

Zur Erfassung der Kinetik der Jodidaufnahme wurden die Zellen mit 2 ml HEPES-Puffer und 0,5 μCi $^{125}\text{Jodid}$ für 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min inkubiert. Zu jedem Zeitpunkt wurden die Zellen 3x mit eiskaltem HEPES-Puffer gewaschen. Das in die Zellen aufgenommene $^{125}\text{Jodid}$ wurde über eine Fällung mit eiskalter Trichloressigsäure herausgelöst und im β -Counter gemessen. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Zellen.

3.7.4 Inhibition der Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$ durch Perchlorat, NaJ und Quabain

Parallel zur Aufnahme von markiertem Jodid sollte untersucht werden, in wie weit die Aufnahmerate von Jodid durch die Zugabe möglicher Inhibitoren verändert wird. In einer ersten Versuchsreihe wurde parallel zum markierten Jodid, unmarkiertes Jodid in verschiedenen Konzentrationen (0 / 0,1 / 1,0 / 10 / 100 mM) zugesetzt und nach 1 Std. bei 37°C überprüft wie sich die Aufnahmerate des eingesetzten $^{125}\text{Jodid}$ veränderte.

Ein weiterer potentieller Inhibitor zur Aufnahme von Jodid ist Quabain. Quabain blockiert die Na^+/K^+ -ATPase, wodurch die zur Aufnahme von Jodid benötigte Energie nicht mehr freigesetzt werden kann. Zur Ermittlung der Inhibition durch Quabain wurde ebenfalls eine Konzentrationsabhängigkeit (0 / 0,01 / 0,1 / 1 / 5 / 10 mM) durchgeführt.

Als dritter möglicher Inhibitor zur Aufnahme von Jodid wurde der Einfluss von Perchlorat in den mit hNIS transfizierten Zellen untersucht. Mit folgender Konzentrationsreihe (0 / 0,01 / 0,1 / 1 / 10 / 100 μM) sollte gezeigt werden, in wie weit Perchlorat mit Jodid um die Bindungsstelle zur Translokation ins Zellinnere konkurriert.

3.8 Immunpräzipitation mit dem [^{35}S]-Methionin-markiertem CHO-hNIS-Klon 6-11

3.8.1 [^{35}S]-Methioninmarkierung der CHO-hNIS 6-11 Zellen

Benötigte Lösungen:

Puffer I	20 mM Tris pH 7,4
	2 mM EDTA
	5 mM PMSF (5ml/l)
	5 mM Benzamidin
	1% Trasylol

Puffer II	20 mM Tris pH 7,4
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	5 mM PMSF
	5 mM Benzamdin
	1% Trasylol

Der erfolgreich mit dem "full length" Konstrukt des Symporters transfizierte CHO-Klon 6-11 wurde nunmehr mit [^{35}S]-Methionin markiert.

Dazu wurden zunächst Zellen in einer kleinen Kulturflasche ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% wachsen gelassen. Nachdem das Medium abgesaugt wurde, erfolgte ein doppelter Waschschrift der Zellen mit Methionin-freiem RPMI-Medium. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Methionin-freiem Medium, welches neben 5% FKS und 0,1% Glutamin zusätzlich 50 $\mu\text{g/ml}$ G418 enthielt, aufgenommen und mit 0,5 mCi [^{35}S]-Methionin für ca. 18 Std. inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde das hochradioaktive Medium abgesogen und die Zellen 3x mit Methionin-freiem RPMI gewaschen. Die Zellen wurden von der Kulturflasche heruntergekratzt und 10 min bei 1300 x g zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 1,5 ml Puffer I aufgenommen, auf Eis gestellt und mit einem speziellen Mörser homogenisiert. Nach der Spülung des Mörsers mit 0,5 ml Puffer I wurde die Zellsuspension auf 2 Eppendorfgefäße verteilt und die Suspension 45 min bei 33.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C eingefroren. Die Pellets wurden in 0,9 ml Puffer II und 0,1 ml 10% Triton X-100 (Roche Diagnostics) resuspendiert und 2 Std. auf Eis geschüttelt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 30 min bei 4°C und 20.000 x g wurden die Überstände der beiden Eppendorfgefäße vereinigt und 1 µl im β -Counter gemessen.

3.8.2 Autoradiographie

Benötigte Lösungen:

Probenpuffer	0,5 M Tris HCl	1,0 ml
	Glycerin	0,8 ml
	10% SDS	1,0 ml
	β -Mercaptoethanol	0,4 ml
	Bromphenolblau	einige Körnchen
	A. dest	14 ml
12% Trenngel (SDS-PAA-Gel)	30% Acrylamid-Mix	3,3 ml
	1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
	10% SDS	0,1 ml
	10% Ammoniumpersulfat	0,1 ml
	TEMED	4 µl
	A. dest	ad 10 ml

5% Sammelgel (SDS-PAA-Gel)	30% Acrylamid-Mix	670 µl
	1 M Tris (pH 6,8)	500 µl
	10% SDS	40 µl
	10% Ammoniumpersulfat	40 µl
	TEMED	4 µl
	A. dest	ad 4 ml
Laufpuffer	SDS	5 g
	Tris	15 g
	Glycin	72 g
	A. dest	ad 5 l
Gelentfärber	Methanol	580 ml
	Eisessig	60 ml
	A. dest	ad 1 l
20% PPO	PPO	20 g
	Essigsäure	100 ml
Waschpuffer (pH 9,0)	LiCl	21,2 g
	Tris/HCl	12,1 g
	A. dest	ad 1l

Für die Autoradiographie wurden jeweils 25 µl Serum von 8 Patienten mit Schilddrüsenerkrankungen sowie 8 Normalseren mit 5×10^6 cpm des markierten CHO-Klones vermischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Protein A-Sepharose (1:2 verdünnt in Puffer II) wurden die Seren für weitere 2 Std. inkubiert.

Nach fünfmaligen Waschen mit Waschpuffer und einem zusätzlichen Waschschrift mit PBS, wurde das Pellet in 45 µl Probenpuffer aufgenommen und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf ein 12% SDS-PAA-Gel aufgetragen, nach erfolgreicher Auftrennung gefärbt, mit 20% PPO fixiert und in einem Vakuumtrockner getrocknet. Nachdem ein Röntgenfilm aufgelegt wurde, wurde das Gel für 2-3 Wochen bei -80°C gelagert und der Röntgenfilm anschließend entwickelt.

3.9 Rolle von hNIS-Antikörpern bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen

In der Literatur war vor der Klonierung von hNIS bereits beschrieben worden, dass Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen über Autoantikörper verfügen, die an den Symporter binden können. Zur Detektion von Autoantikörpern gegen den rekombinanten Symporter wurde ein Radioligandenassay entwickelt, mit dessen Hilfe eine große Anzahl an Seren quantitativ getestet werden konnten.

3.9.1 Expression und [^{35}S]-Methioninmarkierung von hNIS

Benötigte Lösungen:

Radioligandenpuffer	20 mM	Tris
	150 mM	NaCl
	0,1%	BSA
	5 mM	Methionin
	5 mM	Benzamidin
	1 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid
	2 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
	auf pH 7,4	

Mit Hilfe des cDNA-Klones im pGEM-4Z Vektor, der für das "full length" Transkript unter der Kontrolle des SP6-Promotors kodiert, wurde das Antigen durch *in vitro* Transkription und Translation exprimiert.

1 µg der gereinigten hNIS-cDNA wurde in Anwesenheit von [^{35}S]-Methionin unter Verwendung des "Rabbit Reticulocyte Lysate System" (TNT Kit, Promega) transkribiert und translatiert.

Der Einbau der Radioaktivität wurde über eine Fällung mit 10% Trichloressigsäure und abschließender Messung im β -Counter bestimmt. Als Kontrollprotein fungierte der humane Glukosetransporter 2 (GLUT-2), der für ein 524 AS-großes Protein kodiert, welches analog zu hNIS 13 Transmembrandomänen besitzt.

Aliquots des radiogelabelten hNIS bzw. GLUT-2 wurden in 100 μ l Radioligandenpuffer verdünnt und mit 20 μ l Serum bzw. 5 μ l eines monoklonalen Antikörpers (anti-hNIS bzw. anti-GLUT-2) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 150 μ l Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) und einer Inkubation von 2 Std. wurden die Immunkomplexe gewaschen und auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen. Im Anschluss an die Auftrennung wurde das Gel in Coomassie gefärbt, fixiert und getrocknet. Abschließend wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und der Film nach einer Exposition von 14 Tagen entwickelt.

3.9.2 Radioligandenassay

10 μ l Serum wurden in 50 μ l Radioligandenpuffer verdünnt, im 96-well-Format als Doppelwerte aufgetragen und für 12 Std. bei 4°C mit 30.000 cpm radiomarkiertem hNIS inkubiert. Nach Zugabe von 20 μ l Protein A-Sepharose für 2 Std., wurden die Proben auf eine vorbehandelte 96-well Filtrationsplatten (Multiscreen BV, 1,2 μ m, Millipore) transferiert und ausführlich mit Radioligandenpuffer gewaschen. Die Radioaktivität der gebundenen Immunkom-plexe wurde nach Zugabe von 20 μ l flüssigem Szintillator direkt im Top Count β -Counter gemessen.

In jedem Experiment wurde sowohl eine identische Positivkontrolle (PK) als auch eine Negativkontrolle (NK) mitgeführt. Diese wurden als interne Kontrollen genutzt, um die gemessene Aktivität in Form von "Arbitrary Units" (AU) mit Hilfe folgender Formel angeben zu können:

$$(\text{cpm}_{\text{test serum}} - \text{cpm}_{\text{NK}}) / (\text{cpm}_{\text{PK}} - \text{cpm}_{\text{NK}}) \times 100$$

3.10 Immunhistologie

Zum Nachweis der Expression von hNIS auf Proteinebene wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

Da Antikörper besonders stabil und spezifisch an ein Antigen binden, fungieren sie oftmals als Sonden zur Identifizierung bestimmter Moleküle in Zellen und Geweben. Hierfür gibt es eine Reihe unterschiedlicher Markierungstechniken, wobei allen gleich ist, dass der Antikörper fest an das Antigen bindet und unspezifisch gebundene Moleküle durch gründliches Auswaschen entfernt werden. Die Bewertung der Färbung erfolgt am Mikroskop.

Benötigte Lösungen:

Lösung A:	Na ₂ HPO ₄	2,26 g
	A. dest	ad 100 ml
Lösung B:	NaOH	0,63 g
	A. dest	ad 25 ml
40% PFA-Stocklösung	Paraformaldehyd	40 g
	Lösung A	83 ml
	Lösung B	17 ml
Blockierungsreagenz	BSA	5%
	Tween-20	0,05%
	A. dest	ad 25 ml

Die hNIS-Färbung der transfizierten CHO-Klone bzw. FTC236-Klone wurde in sogenannten "culture slides" durchgeführt. Dabei wurden 3×10^4 Zellen pro Kammer ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Morgen erfolgte durch die Zugabe von 4% Paraformaldehyd eine Fixierung der Zellen, welche durch die Zugabe von 0,5% Saponin zusätzlich permeabilisiert wurden.

Nach einem kurzen Waschschrift erfolgte eine Blockierung mit 5% BSA + 0,05% Tween 20 für 60 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen 3x für 10 min mit PBS gewaschen. Mit Hilfe eines speziell mitgelieferten Werkzeuges wurden die Kammerwände des "culture slides" entfernt, so dass nur noch der Objektträger übrig blieb.

Auf die Zellen wurde als erster Antikörper anti-NIS-2.2 (freundliche Gabe von Prof. J.C. Morris, Mayo Clinic und Mayo Graduate Medical School, Rochester, MN) in verschiedenen Konzentrationen auf die Zellen gegeben und 2 h bei 37°C inkubiert.

Nach einem dreimaligen Waschschrift für jeweils 10 min mit PBS wurde ein Biotin-markierter Anti-Maus Antikörper (LSAB-Kit) in einer 1:1 Verdünnung auf die Zellen gegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaligem Waschen mit PBS erfolgte eine zweite Inkubation mit alkalischer Phosphatase-markiertem Extravidin in einer Verdünnung von 1:500. Nach einer Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur und einem intensiven Waschschrift mit PBS, wurde als Färbesubstrat Fast Red (DAKO) zugesetzt und die Färbung unter dem Lichtmikroskop beurteilt.

3.11 Statistik

Mit Hilfe des Computerprogramm GraphPad Prism wurde eine statistische Analyse durchgeführt. Unterschiede in der Expression des Symporters wurden mit ungepaarten Student t-Test analysiert. P-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung des humanen Natrium-Jodid-Symporters bzw. der humanen Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase

Ein primäres Ziel dieser Promotionsarbeit war die Untersuchung der Expression des humanen Natrium-Jodid-Symporters (hNIS) auf RNA-Ebene. Dazu bedurfte es neben der Klonierung von hNIS ebenfalls der Klonierung eines entsprechenden "house keeping" Gens.

Dieses Haushaltsgen, das auf Grund seiner konstitutiven Expression immer gleich stark expremiert wird, fungiert als "interne Kontrolle", damit sicher gestellt werden kann, dass die durchgeführten Stimulations- bzw. Inhibitionsexperimente lediglich einen Einfluss auf die Expression des Symporters, sowie dessen Regulation haben. In dieser Arbeit fungierte die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) als Haushaltsgen.

Die aus Thyreozyten-RNA mittels einer TitanTM One Tube RT-PCR, unter dem Einsatz spezifischer Primer (s. Tab. 3.1) amplifizierten Fragmente für GAPDH bzw. hNIS, wurden nach entsprechender Isolierung aus einem Agarosegel in die unter Punkt 3.2.4 aufgeführten Vektor-systeme eingebaut.

Nach erfolgreicher Transformation mit anschließender Isolierung von Plasmid-DNA wurde, neben einem Kontrollverdau mit spezifischen Restriktionsendonukleasen, die Größe, der in den Vektor eingebauten Fragmente, überprüft.

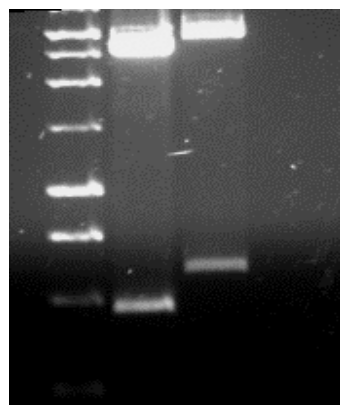


Abb. 4.1: Restriktionsverdau der cDNA-Klone für hNIS bzw. GAPDH

Bahn 1: 1 kB Basenpaarleiter

Bahn 2: hNIS; Verdau mit *HindIII* und *EcoRI*

Bahn 3: GAPDH; Verdau mit *PstI* und *NcoI*

← GAPDH

← hNIS

Die in Abb. 4.1 dargestellten Fragmente für GAPDH bzw. hNIS entsprachen den in Tab.3.1 aufgeführten Fragmentgrößen.

Zum Abschluss der Klonierung wurde die Basenabfolge der eingebauten Gene bzw. ihrer Fragmente über eine Sequenzierung mit geeigneten Oligonukleotidprimern überprüft. Ein Vergleich der resultierenden Sequenzen mit der in einer Gen-Bank veröffentlichten Sequenzfolge, unter Zuhilfenahme der Software DNASTar, ermöglichte über ein Alignment (s. Anhang B und C) die Verifizierung der Identität der klonierten Fragmente.

Diese als GAPDH bzw. als hNIS identifizierten Vektorkonstrukte dienten nunmehr zur Synthese von RNA-Sonden, zur Synthese von Kontrollfragmenten für die kompetitive, semiquantitative RT-PCR, sowie zur Generierung von Plasmidstandards für die Real-Time PCR am LightCycler.

4.2 Northern Blot Analyse

Zum semiquantitativen Nachweis von hNIS-RNA wurden Untersuchungen unter Zuhilfenahme der Northern Blot Analyse durchgeführt.

Dazu wurde nach der gelelektrophoretischen Auftrennung von 3 µg RNA diese aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht aus Nylon übertragen. Der Nachweis spezifischer RNA-Moleküle erfolgte durch eine Hybridisierung der Membran mit geeigneten Digoxigenin-markierten RNA-Sonden, die über Chemilumineszenz nachgewiesen wurden (s. Punkt 3.3.1).

Zur Untersuchung der Expression von hNIS fungierten RNA-Proben aus primären, mit Forskolin bzw. bTSH stimulierten Thyreozyten. Die RNA-Isolierung erfolgte über TRIZOL (s. Punkt 3.6.1).

Da der humane Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) ein schwach exprimiertes Gen ist, war es relativ schwierig die resultierenden Banden zu quantifizieren.

Abb. 4.2 lässt jedoch erkennen, dass nach Zugabe von 10 µM Forskolin die Expression von hNIS gesteigert wird. Nach einer weiteren Erhöhung der Forskolinkonzentration auf 15 µM sinkt die Expression des Symporters annähernd auf den Basalwert ab.

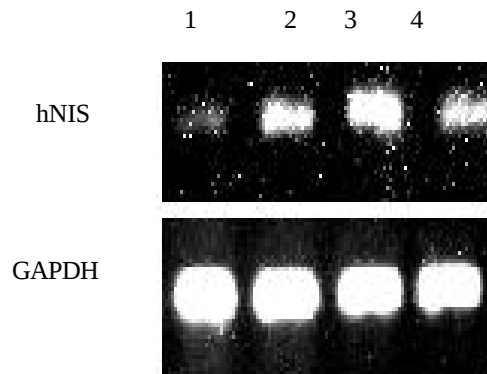


Abb. 4.2: Northern Blot zur Untersuchung der hNIS-Expression nach Stimulation mit Forskolin.

Von links nach rechts sind je 3 µg folgender RNA-Proben aufgetragen:

Bande 1: Basalwert (unstimulierte Kontrolle)

Bande 2: 1 µM Forskolin

Bande 3: 10 µM Forskolin

Bande 4: 15 µM Forskolin

Eine Stimulation mit bTSH führt ebenfalls zu einer Steigerung der hNIS RNA-Konzentration der entsprechend mit bTSH behandelten primären Thyrozyten.

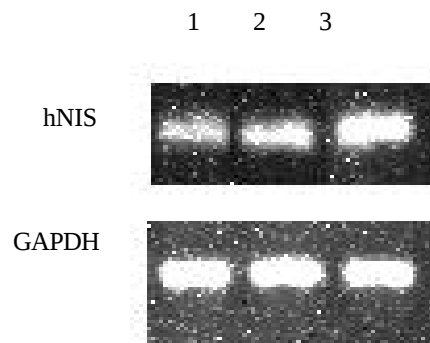


Abb. 4.3: Northern Blot nach Stimulation primärer Thyrozyten mit bTSH.

Bande 1: Basalwert (unstimulierte Kontrolle)

Bande 2: 1 mU/ml bTSH

Bande 3: 10 mU/ml bTSH

Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen zeigen, dass in Homologie zu mit Forskolin und bTSH stimulierten Rattenthreozyten, die hNIS Expression auch in humanen Schilddrüsenzellen gesteigert wird. In den nachfolgenden Experimenten zur Bestimmung der Expressionsspiegel des humanen Symporters wurden beide Substanzen als Stimulatoren eingesetzt.

4.3 Analyse von Expressionsstudien mittels kompetitiver, semiquantitativer RT-PCR

Zur Quantifizierung des Expressionsverhaltens von hNIS wurde eine kompetitive, semiquantitative RT-PCR entwickelt, bei der ein von der Größe her kleineres Kompetitorfragment (Kontrollfragment; KF) zur amplifizierenden cDNA in Konkurrenz gesetzt wurde. Anhand der resultierenden PCR-Produkte, die auf einem 2% Agarosegel aufgetragen wurden, konnte mit Hilfe der Software des LumiImagers (LumiAnalyst, Roche Diagnostics) eine quantitative Aussage in Form von Stimulationsfaktoren getroffen werden.

Die dazu benötigten Kompetitor- bzw. Kontrollfragmente wurden, wie unter Punkt 3.3.2.1 beschrieben, hergestellt und nach einer abschließenden Sequenzierung mit den Originalfragmenten verglichen.

Wie in Anhang D und E dargestellt, wurden durch den Verdau mit den spezifischen Restriktionsendonukleasen – *DraIII* und *BsgI* zur Synthese des hNIS-Kontrollfragmentes bzw. *BlnI* und *BbsI* zur Generierung des GAPDH-Kontrollfragmentes – innerhalb der klonierten Fragmente zwischen 80 und 100 Basenpaare herausgeschnitten, die zu einer Verkürzung des jeweiligen Fragmentes führen.

Da intramolekulare Schnittstellen gesucht worden waren, blieben die ursprünglichen Primerbindestellen bestehen und das synthetisierte Kontrollfragment konnte in der nachfolgenden PCR mit der cDNA um die vorhandenen Primer und Nukleotide, die limitierenden Faktoren der PCR, konkurrieren. Aufgrund der geringeren Größe des Kontrollfragmentes zeigte dieses ein schnelleres Laufverhalten in der abschließenden gelelektrophoretischen Auftrennung. Der optische Unterschied wurde durch den Einsatz eines 2% Agarosegels vergrößert, da bedingt durch die "Engmaschigkeit" des Gels die PCR-Amplifikate deutlicher voneinander getrennt wurden.

4.3.1 Kompetitive RT-PCR auf GAPDH zur Einstellung auf den gleichen cDNA-Gehalt

Zur Untersuchung der Expression von hNIS wurden primäre Thyreozyten, wie unter Punkt 3.5 beschrieben, nach vorangegangener Isolierung und Kultivierung (s. Punkt 3.4) im 6-well-Format ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Forskolin (0,1/1,0/10/15 μ M) bzw. mit bTSH (0,1/1,0/10 mU/ml) stimuliert. Nach 24 Std. erfolgte die Isolierung der RNA über TRIZOL (s. Punkt 3.6.1) mit anschließender Umschreibung von 1 μ g isolierter RNA in cDNA (s. Punkt 3.6.4). Diese cDNA wurde in die etablierte RT-PCR eingesetzt. In einer ersten PCR-Reihe wurde die cDNA-Menge für jeden Stimulationsansatz so lange variiert bis annähernd ein Verhältnis von 1:0,8 bis 1:1,2 zwischen den PCR-Produkten aus cDNA und der konstant eingesetzten Kontrollfragmentverdünnung vorlag.

In Abb. 4.4a bzw. Abb. 4.4b sind die korrespondierenden Agarosegele der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR zur Normalisierung auf GAPDH dargestellt.

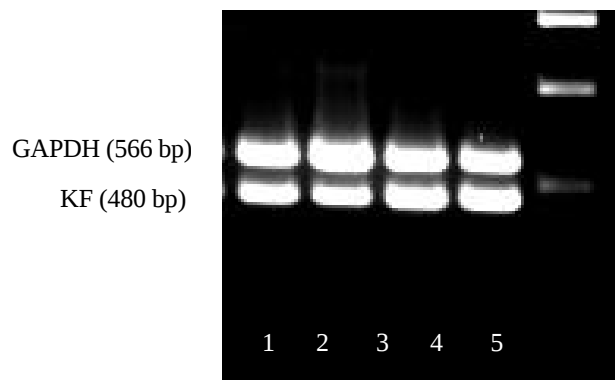


Abb. 4.4a: Kompetitive, semiquantitative RT-PCR auf GAPDH zur Einstellung der mit bTSH stimulierten cDNA-Proben. Von links nach rechts sind folgende Proben aufgetragen:

Bande 1: 10 mU/ml bTSH

Bande 2: 1,0 mU/ml bTSH

Bande 3: 0,1 mU/ml bTSH

Bande 4: basal (unstimulierte Kontrolle)

Bande 5: 1 kb Basenpaarleiter

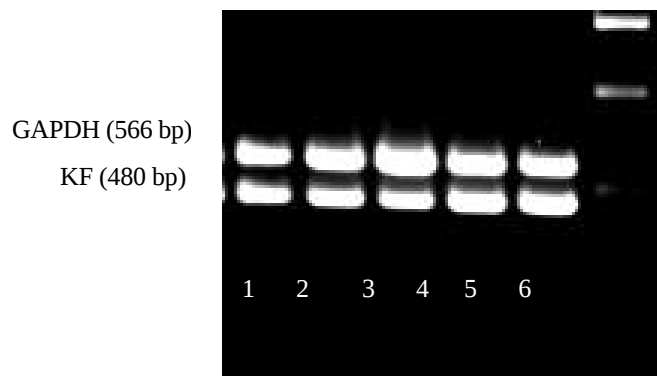


Abb. 4.4b: Auftragung der PCR-Produkte zur Einstellung der cDNA-Proben auf den gleichen GAPDH-Gehalt nach Stimulation der Thyreozyten mit Forskolin.

Aufgetragen sind von links nach rechts:

Bande 1: 15 μ M Forskolin

Bande 2: 10 μ M Forskolin

Bande 3: 1,0 μ M Forskolin

Bande 4: 0,1 μ M Forskolin

Bande 5: basal

Bande 6: 1 kb Basenpaarleiter

Die hier dargestellten Agarosegele wurden nach der Aufnahme am LumiImager über eine spezielle LumiAnalyst Software quantifiziert. Dabei wurde die gemessene Bandenintensität in Boehringer Light Units (BLU's) angegeben. Diese Einheit beschreibt die Stärke einer jeden Bande.

Die in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 angegebenen BLU's zur Einstellung des cDNA-Gehaltes für die kompetitive, semiquantitative RT-PCR auf hNIS verdeutlichen, dass die gewählten cDNA-Mengen bei einem konstanten Einsatz von 10^7 Kopien GAPDH-Kontrollfragment (KF-GAPDH) annähernd zu einem 1:1 Verhältnis führen.

	GAPDH	KF-GAPDH
10mU/ml bTSH	$2,43 \times 10^6$	$2,32 \times 10^6$
1mU/ml bTSH	$2,47 \times 10^6$	$2,31 \times 10^6$
0,1mU/ml bTSH	$2,40 \times 10^6$	$2,37 \times 10^6$
basal	$2,30 \times 10^6$	$2,34 \times 10^6$

Tab. 4.1: BLU's der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR auf GAPDH zur Konzentrationsabhängigkeit von bovinem TSH (bTSH)

	GAPDH	KF-GAPDH
15 μM FK	$2,52 \times 10^6$	$2,44 \times 10^6$
10 μM FK	$2,65 \times 10^6$	$2,42 \times 10^6$
1 μM FK	$2,55 \times 10^6$	$2,45 \times 10^6$
0,1μM FK	$2,58 \times 10^6$	$2,59 \times 10^6$
basal	$2,64 \times 10^6$	$2,61 \times 10^6$

Tab. 4.2: BLU's zur kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR auf GAPDH zur Konzentrationsabhängigkeit von Forskolin (FK)

4.3.2 Kompetitive RT-PCR auf hNIS zur Bestimmung des Einflusses von bTSH auf die Symporterexpression

Aus den in Abb. 4.4 dargestellten Ergebnissen ergaben sich für die anschließende kompetitive, semiquantitative RT-PCR auf hNIS folgende cDNA-Mengen:

Basalwert	1,3 μ l
0,1 mU/ml bTSH	0,4 μ l
1,0 mU/ml bTSH	1,0 μ l
10 mU/ml bTSH	1,5 μ l

Diese cDNA-Mengen wurden in Konkurrenz zu jeweils 10^5 Kopien des hNIS-Kontrollfragmentes gesetzt, in dem, wie unter Punkt 3.3.2.3 beschrieben, eine kompetitive, semiquantitative PCR durchgeführt wurde, deren Produkte nach entsprechender Amplifikation auf einem 2% Agarosegel aufgetragen wurden. Die resultierenden PCR-Banden wurden am LumiImager aufgenommen und anschließend analysiert.

Abb. 4.5 zeigt die Verschiebung des Verhältnisses zwischen Kompetitor und cDNA hin zur cDNA-Bande nach Zugabe der jeweiligen bTSH-Konzentration.

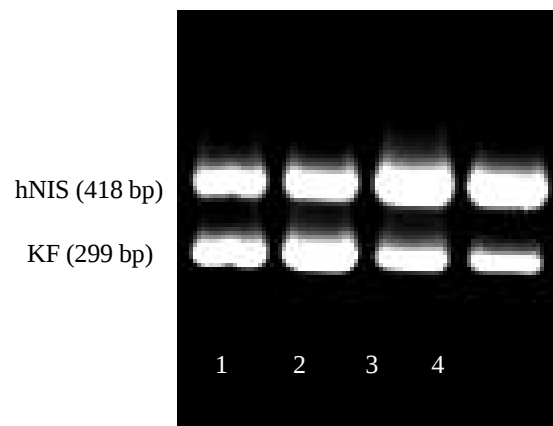


Abb. 4.5: Kompetitive, semiquantitative RT-PCR auf hNIS zur Untersuchung der Abhängigkeit der Expression des Symporters von bTSH

Dargestellt sind von links nach rechts folgende PCR-Produkte

Bande 1: basal

Bande 2: 0,1 mU/ml bTSH

Bande 3: 1 mU/ml bTSH

Bande 4: 10 mU/ml bTSH

In Tab. 4.3 sind die korrespondierenden Boehringer Light Units (BLU's) zur Bestimmung der Expressionsspiegel aufgeführt. Eine genauere Betrachtung dieser Werte lässt erkennen, dass eine Steigerung der bTSH-Konzentration zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen cDNA und hNIS-Kontrollfragment in Richtung cDNA-Bande führt. Durch die Zugabe von 10 mU/ml bTSH kommt es zu einer deutlichen Steigerung der hNIS-Expression.

	h-NIS	KF-hNIS	Stimulationsfaktor
basal	$1,53 \times 10^4$	$1,56 \times 10^4$	1,0
0,1 mU/ml bTSH	$2,21 \times 10^4$	$2,52 \times 10^4$	0,88
1,0 mU/ml bTSH	$2,55 \times 10^4$	$1,25 \times 10^4$	1,66
10 mU/ml bTSH	$3,29 \times 10^4$	$1,15 \times 10^4$	2,15

Tab. 4.3: Ermittelte Boehringer Light Units (BLU's) der Expressionsraten zur konzentrationsabhängigen Steigerung der hNIS Expression durch bTSH.

4.3.3 Einfluss von Forskolin auf die Expression des Symporters

Des Weiteren wurde der Einfluss von Forskolin, einem Stimulator der Adenylatcyclase, auf die Expression von hNIS untersucht.

Auch hier wurde eine kompetitive, semiquantitative RT-PCR auf hNIS durchgeführt, indem folgende cDNA-Mengen, mit jeweils 10^5 Kopien hNIS-Kontrollfragment, in einer PCR koamplifiziert wurden:

Basalwert	1,0 μ l
0,1 μ M Forskolin	1,2 μ l
1,0 μ M Forskolin	0,8 μ l
10 μ M Forskolin	2,0 μ l
15 μ M Forskolin	1,0 μ l

Die gelelektrophoretische Auftrennung der resultierenden PCR-Produkte lässt erkennen, dass die Expression des Symporters durch die Zugabe von Forskolin gesteigert wird, was durch eine Verstärkung der cDNA-Bande sichtbar gemacht wird. Die maximale Expression von hNIS wird, wie in Abb. 4.6 dargestellt, bei einer Konzentration von 10 μ M Forskolin erreicht.

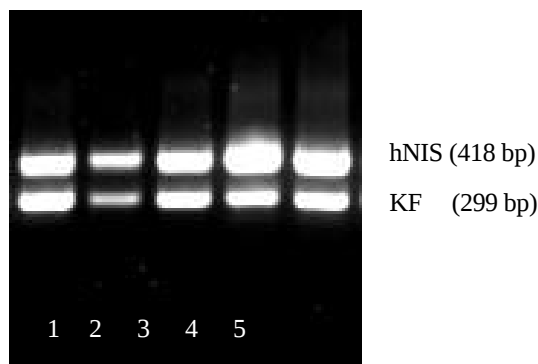


Abb. 4.6: Kompetitive, semiquantitative RT-PCR zur hNIS Expression nach Stimulation mit Forskolin. Dargestellt sind von links nach rechts folgende PCR-Produkte:

Bande 1: basal (unstimulierte Kontrolle)

Bande 2 : 0,1 μ M Forskolin

Bande 3: 1,0 μ M Forskolin

Bande 4: 10 μ M Forskolin

Bande 5: 15 μ M Forskolin

Auch hier erfolgte eine graphische Auswertung des Agarosegels mit Hilfe der LumiAnalyst Software. Nach Zugabe von 10 μM Forskolin wird die Expression des Symporters um den Faktor 2,71 gesteigert. Eine weitere Erhöhung der Forskolinkonzentration lässt die Expressionsrate auf 1,38 absinken (s. Tab. 4.4).

	h-NIS	KF-hNIS	Stimulationsfaktor
basal	$1,90 \times 10^4$	$1,94 \times 10^4$	1,0
0,1 μM Forskolin	$2,30 \times 10^4$	$1,15 \times 10^4$	1,21
1,0 μM Forskolin	$2,43 \times 10^4$	$1,51 \times 10^4$	1,27
10 μM Forskolin	$3,50 \times 10^4$	$1,29 \times 10^4$	2,71
15 μM Forskolin	$2,63 \times 10^4$	$1,51 \times 10^4$	1,38

Tab. 4.4: Boehringer Light Units (BLU's) zur Ermittlung der Expressionsrate zur konzentrationsabhängigen Steigerung der Symporterexpression durch Forskolin.

4.4 Etablierung einer Real-Time PCR

Um über ein höchst sensitives Nachweissystem zur Durchführung von Expressionsanalysen in humanen Schilddrüsenzellen zu verfügen, sollte eine entsprechende Real-Time PCR auf dem LightCycler (Roche Diagnostics) etabliert werden. Innerhalb dieses Systems kann zu jedem Zeitpunkt der Amplifikation die Bildung von PCR-Produkten verfolgt werden. Dadurch kann bereits innerhalb der log-linearen Phase der PCR-Reaktion eine exakte Bestimmung der gebildeten PCR-Produkte erfolgen, während es sich bei der kompetitiven, semiquantitativen PCR um eine Endpunktmessung handelt.

Durch den Vergleich der PCR-Profile der einzelnen cDNA-Proben mit denen der Verdünnungsreihe des homologen, externen Standards, kann die Anzahl der vorliegenden cDNA-Kopien mit einer Genauigkeit bestimmt werden, wie sie innerhalb der herkömmlichen PCR nicht möglich ist.

4.4.1 Synthese von Standards für die Real-Time PCR

Um möglichst identische Reaktionsbedingungen zwischen den externen Standards und den zu quantifizierenden cDNA-Proben zu gewährleisten, wurden die eingesetzten Plasmidstandards linearisiert (s. Punkt 3.3.3.1) und die Vollständigkeit des Restriktionsverdaus auf einem 1% Ethidiumbromidgel überprüft (s. Abb. 4.7).

Die anschließende Optimierung der Real-Time PCR erfolgte anhand der linearisierten Plasmide, denen die entsprechenden Zielgene zuvor inkloniert worden waren (s. Punkt 4.1).

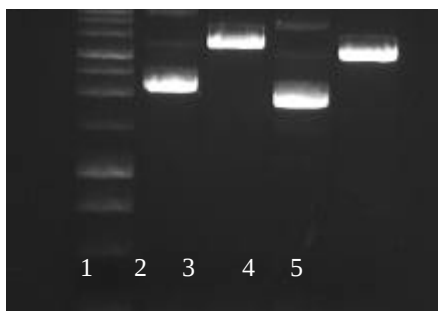


Abb. 4.7: Linearisierung des homologen, externen Plasmidstandards für GAPDH bzw. hNIS

Bahn 1: 1kb Basenpaarleiter

Bahn 2: ca. 1 µg ungeschnittenes GAPDH-Plasmid

Bahn 3: ca. 1 µg mit *PstI* geschnittenenes GAPDH-Plasmid

Bahn 4: ca. 1 µg ungeschnittenes hNIS-Plasmid

Bahn 5: ca. 1 µg mit *EcoRI* geschnittenenes hNIS-Plasmid

4.4.2 Optimierung der Real-Time PCR auf GAPDH

Da für die PCR auf das Haushaltsgen GAPDH nur ein Primerpaar mit korrespondierenden Sonden gefunden und synthetisiert worden war, musste für dieses Primer-/Sondenpaar lediglich die optimale MgCl_2 -Konzentration ermittelt werden (s. Punkt 3.3.3.4).

Bei einer konstanten Annealingtemperatur von 60°C wurde in verschiedenen Reaktionsansätzen die MgCl_2 -Konzentration von 1 mM bis 4 mM variiert (s. Tab. 3.4).

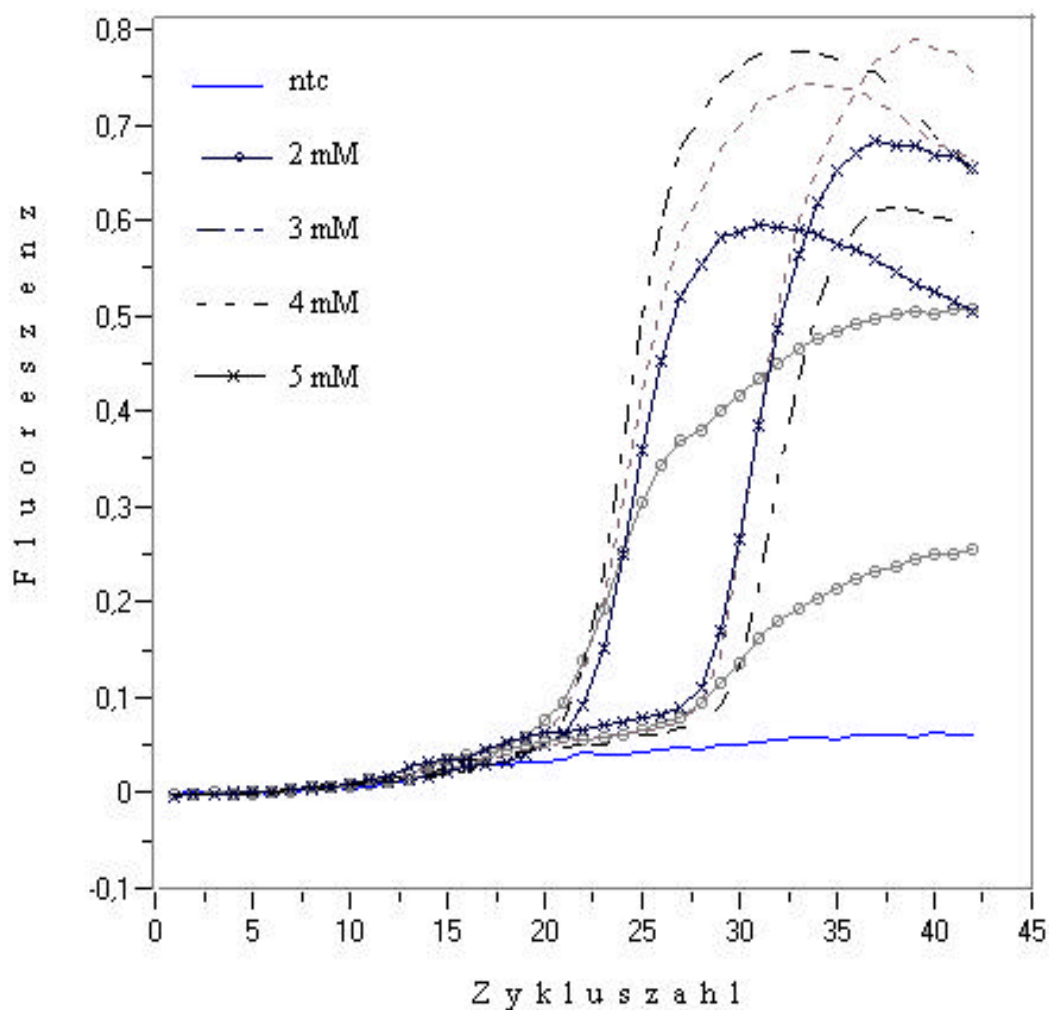


Abb. 4.8: Bestimmung der optimalen MgCl_2 -Konzentration für die Real-Time PCR auf GAPDH
Dargestellt ist die Fluoreszenz der Hybridisierungssonden in Abhängigkeit von der Zykluszahl und der gewählten MgCl_2 -Konzentration für 10^4 bzw. 10^2 GAPDH-Kopien.

Abb. 4.8 zeigt die Ermittlung der optimalen MgCl_2 -Konzentration für die eingesetzten Primer und Sonden auf GAPDH. Als Template fungierte der generierte GAPDH-Plasmidstandard, der in einer Konzentration von 10^4 (nach ca. 20 PCR-Zyklen detektierbar) bzw. 10^2 Kopien (detektierbar nach ca. 30 PCR-Zyklen) eingesetzt wurde. Die höchste Effizienz der Real-Time PCR wird bei einer MgCl_2 -Konzentration von 3 mM beobachtet. Bei dieser Konzentration erfolgt der Anstieg der Fluoreszenz der Sonden im Vergleich zu den übrigen Salzkonzentrationen bei einer niedrigeren Zykluszahl. Des Weiteren ist die Zunahme der Fluoreszenz im Verlauf der PCR bei dieser Salzkonzentration am stärksten ausgeprägt und erreicht das höchste Fluoreszenzniveau. Mit der bestimmten MgCl_2 -Konzentration von 3mM wurde in einem weiteren Lauf eine Verdünnungsreihe für GAPDH durchgeführt. In der anschließenden Analyse wurde die Effizienz der PCR errechnet, die ein Maß für die Güte der PCR ist (s. Punkt 3.3.3.6). Die in Abb. 4.9 dargestellte Verdünnungsreihe für GAPDH hat eine Effizienz von 1.98.

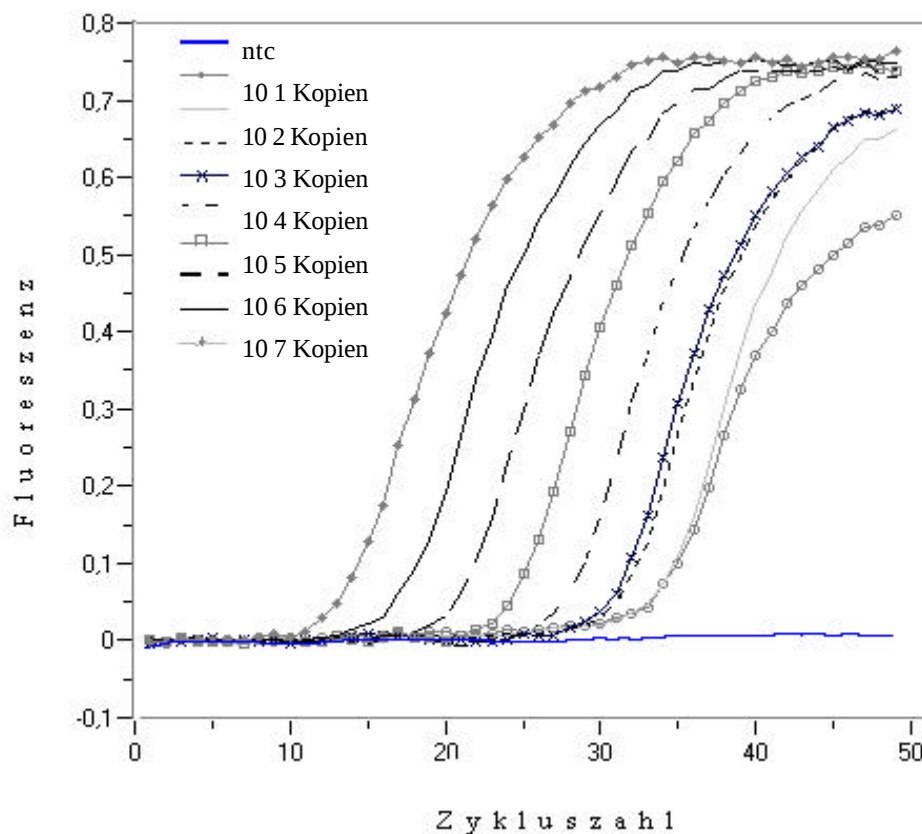


Abb. 4.9: Ermittlung der PCR-Effizienz für die Real-Time PCR auf GAPDH

Dargestellt ist das "Baseline Adjustment" für die Zunahme der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl. Die Verdünnungsreihe umfaßte eine Kopienbreite von 10^7 bis 10^1 Kopien, wobei 10^1 und 10^2 Kopien als Duplikate in die Real-Time PCR eingesetzt wurden.

Erfolgt die Auswertung der Real-Time PCR über die "Fit Points"-Methode, die vor allem dann zum tragen kommt, wenn die Quantifizierung in einem Kopienbereich von weniger als 1000 Kopien erfolgt, so bietet das "Analysis" Modul eine alternative Form der Darstellung (s. Abb. 4.10). Aus der angegebenen Standardkurve kann neben dem Schnittpunkt mit der Y-Achse die Steigung der Geraden abgelesen werden, über die des Weiteren die Effizienz der PCR errechnet werden kann. Ein weiterer Parameter, als Maß für die Qualität der PCR, ist der PCR-Fehler ("error"). Im Falle einer optimalen PCR sollte er kleiner 0,3 sein. In dieser Real-Time PCR beträgt er 0,122.

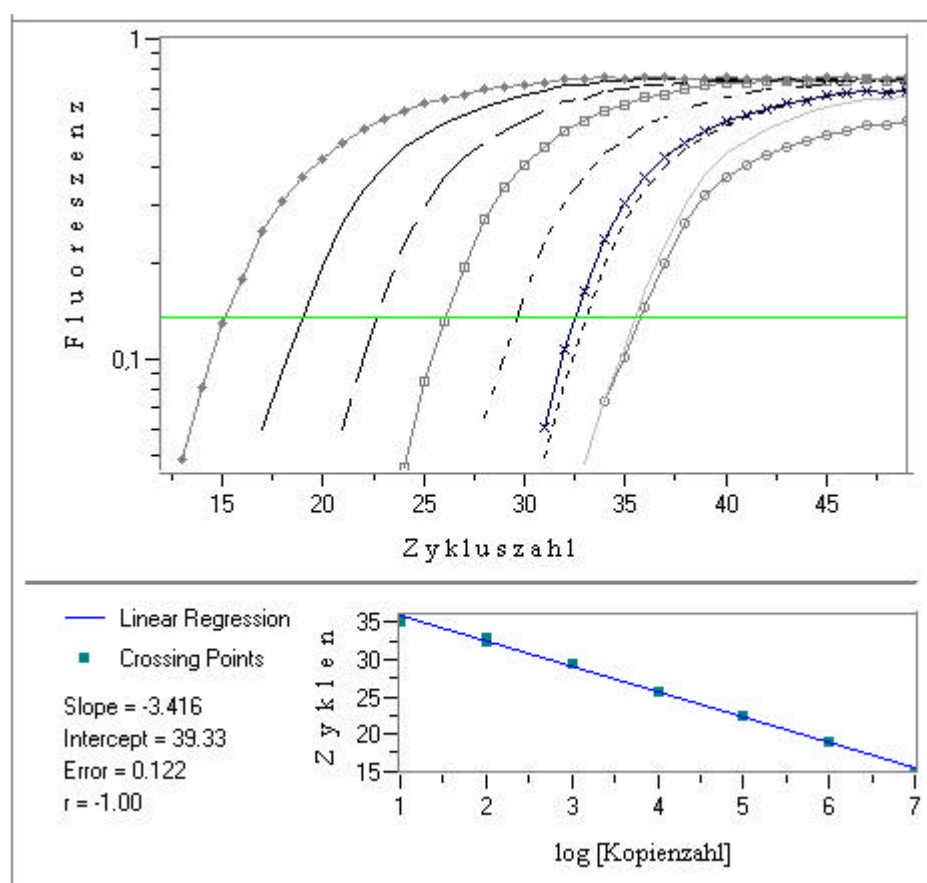


Abb. 4.10: Auswertung der Real-Time PCR über die "Fit Points"-Methode:

(Legende siehe Abb. 4.9)

oberes Fenster: Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl mit Darstellung der "Noise Band"; von links nach rechts: 1×10^7 bis 1×10^1 Kopien GAPDH-Plasmid;

unteres Fenster: $\log[\text{Kopienzahl}]$ gegen die berechneten G_c -Werte; lineare Regression der Steigung; Schnittpunkt mit der Y-Achse und Angabe des PCR-Fehlers

Die PCR-Amplifikate der Verdünnungsstufe 10^3 bis 10^7 wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und nach gelelektrophoretischer Auftrennung unter dem UV-Schirm detektiert. In Abb. 4.11 wird die aufgetragene Verdünnungsreihe gezeigt. Die resultierenden PCR-Produkte zeigen alle eine Größe von 250 bp. Dieser Wert entspricht der durch die Primer festgelegten Fragmentgröße.

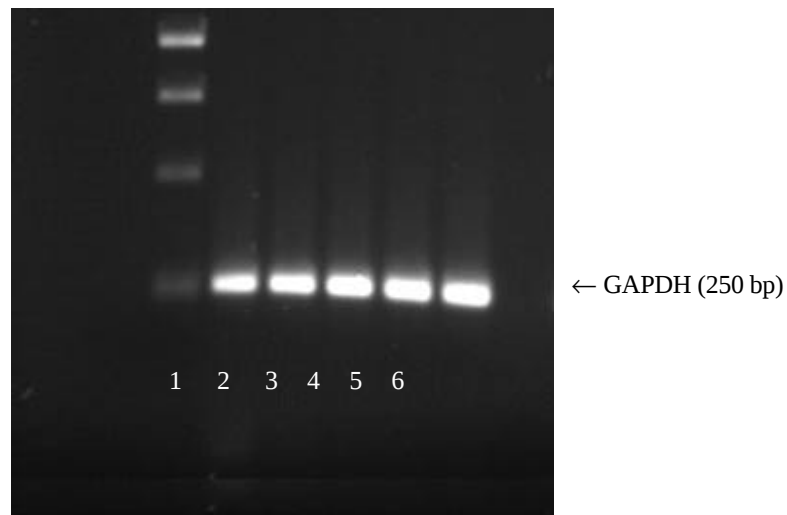


Abb. 4.11: Standardkurve zur Real-Time PCR auf GAPDH

Bande 1: 1 kb Basenpaarleiter	Bande 2: 1×10^3 Kopien
Bande 3: 1×10^4 Kopien	Bande 4: 1×10^5 Kopien
Bande 5: 1×10^6 Kopien	Bande 6: 1×10^7 Kopien

4.4.3 Optimierung der Real-Time PCR auf hNIS

Im Gegensatz zur LightCycler PCR auf GAPDH wurden zur Etablierung der Real-Time PCR auf hNIS mehrere Primer synthetisiert, die in verschiedenen Kombinationen, zusammen mit einem spezifischen Hybridisierungsprobenpaar, ausgetestet wurden. Zur Bestimmung des optimalsten Primerpaares wurden folgende Kombinationen in die Real-Time PCR eingesetzt:

F/R F1/R F2/R F/R1 F1/R1 F2/R2

Dazu wurde in einer ersten PCR eine Annealingtemperatur von 60°C sowie eine MgCl_2 -Konzentration von 3,5 mM gewählt. Je 0,5 μM Primer wurden in die PCR eingesetzt. Diese erste PCR lässt erkennen, dass die eingesetzte Primerkombination F1/R bzw. F2/R am ehesten einen steilen Anstieg der Kurve zeigen, der sich über alle Verdünnungsstufen innerhalb des PCR-Laufes fortsetzt (s. Abb. 4.12).

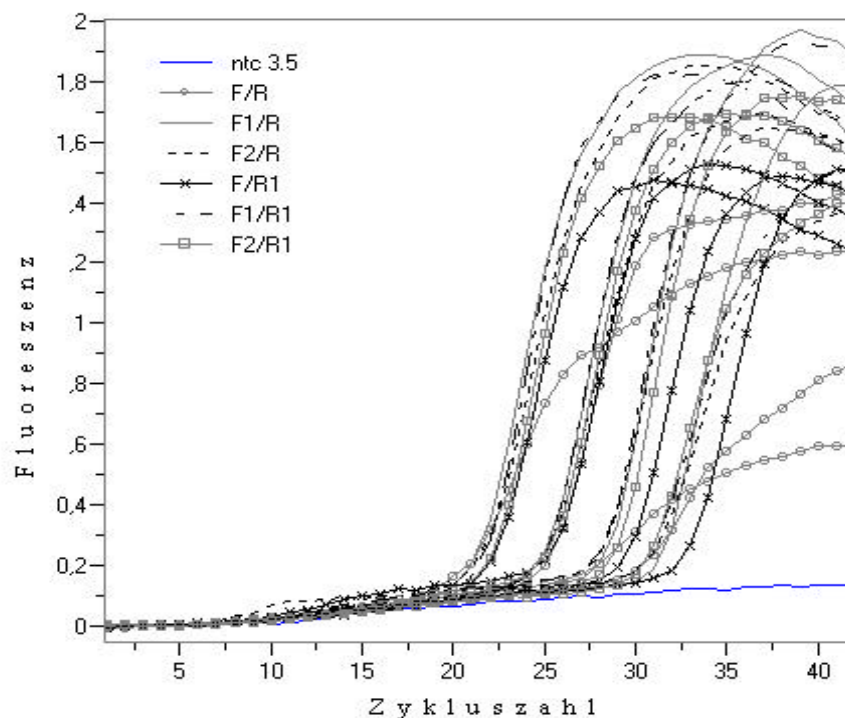


Abb. 4.12: Real-Time PCR aller möglichen Primerkombinationen auf hNIS bei einer konstanten Salzkonzentration von 3,5 mM MgCl_2

Dargestellt sind von links nach rechts die jeweiligen Standardkurven für jede Primerkonzentration bei 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 Kopien hNIS-Plasmid

Da bei höheren MgCl_2 -Konzentrationen ($> 3\text{mM}$) die PCR-Puffer Mischung des öfteren im Verlauf der Real Time PCR ausflockt, wurde in einem zweiten Lauf überprüft, in wie weit eine Reduktion der MgCl_2 -Konzentration von 3,5 auf 3 mM einen Einfluss auf die Effizienz der PCR für die Primerpaare F1/R und F2/R hat.

Anhand von Abb. 4.13 wird erkennbar, dass es erst im Bereich von 10^1 Kopien zu einem geänderten Expressionsprofil der eingesetzten Primerpaare kommt. Es wird ersichtlich, dass nur die Primerkombination F1/R bei einer MgCl_2 -Konzentration von 3 mM in einem Bereich von 10^1 Kopien ein optimales PCR-Signal hervorbringt.

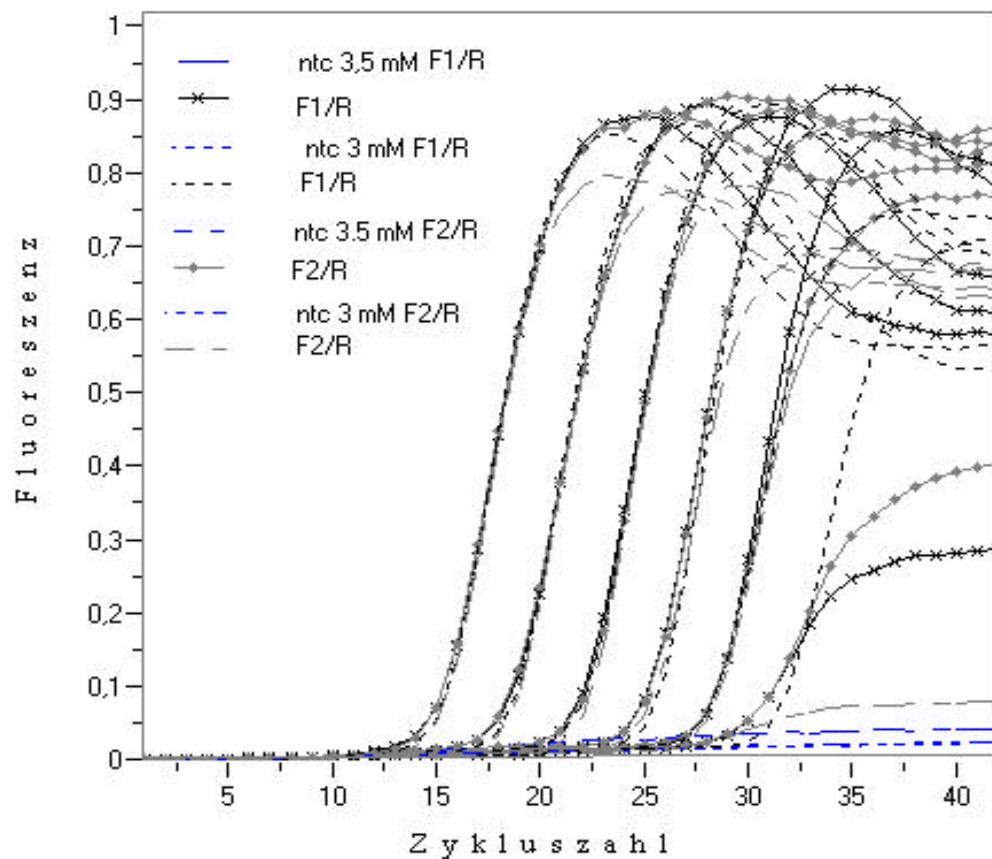


Abb. 4.13: "Baseline Adjustment" für die Primerkombinationen F1/R und F2/R bei einer MgCl_2 -Konzentration von 3 bzw. 3,5 mM

Darstellung der Standardkurven für beide Primerkombinationen und der jeweiligen MgCl_2 -Konzentration; von links nach rechts 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 und 10^1 hNIS-Plasmidkopien

In einem abschließenden Lauf wurde die Effizienz der PCR mittels einer Verdünnungsreihe von 10^6 bis 10^1 Kopien für das generierte hNIS-Plasmid ermittelt. Die Auswertung, dargestellt in Abb. 4.14 und Abb. 4.15, ergibt eine PCR-Effizienz von 1,97. Der Fehler der PCR beträgt 0,0357.

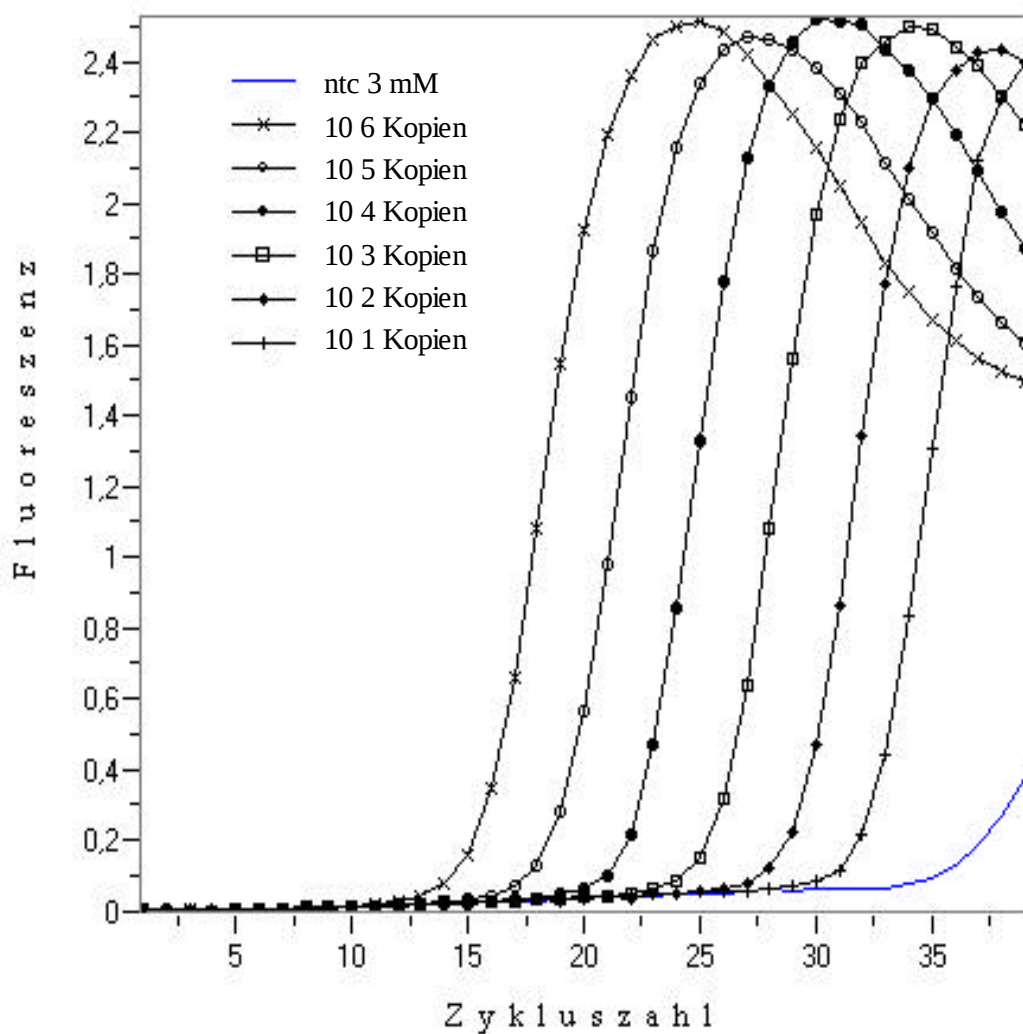


Abb. 4.14: "Baseline Adjustment" der Standardkurve für das hNIS-Plasmid

Darstellung der Zunahme der Fluoreszenz über die Zykluszahl in einem Kopienbereich von 10^6 bis 10^1 hNIS-Kopien

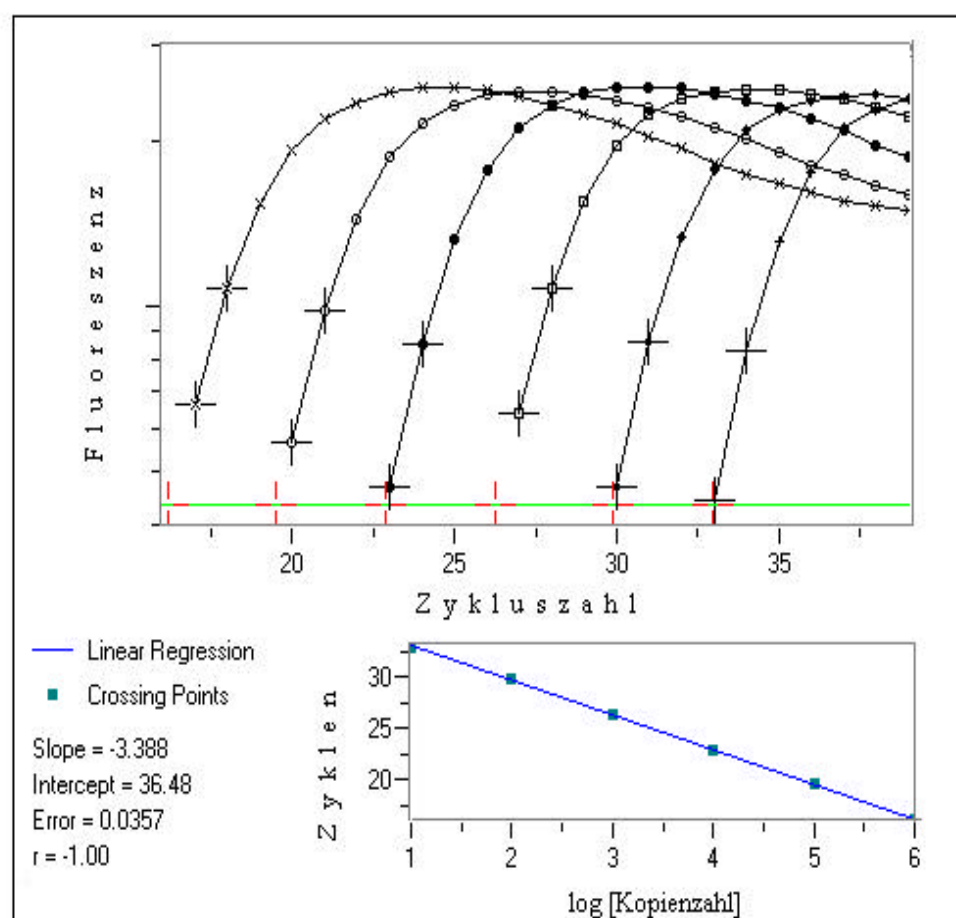


Abb. 4.15: Auswertung der Standardkurve nach der "Fit Points"-Methode

(Legende siehe Abb. 4.14)

Oberes Fenster: Analysis Mode mit "Noise Band"

Unteres Fenster: Standardkurve dargestellt als Logarithmus der Kopienzahl über die Zykluszahl; Angabe der Steigung, des Schnittpunktes mit der Y-Achse und dem PCR-Fehler

Auch hier wurden die Amplifikate des Real-Time Laufes auf einem 2% Agarosegel aufgetragen und nach erfolgter Auftrennung unter dem UV-Schirm detektiert (s. Abb. 4.16).

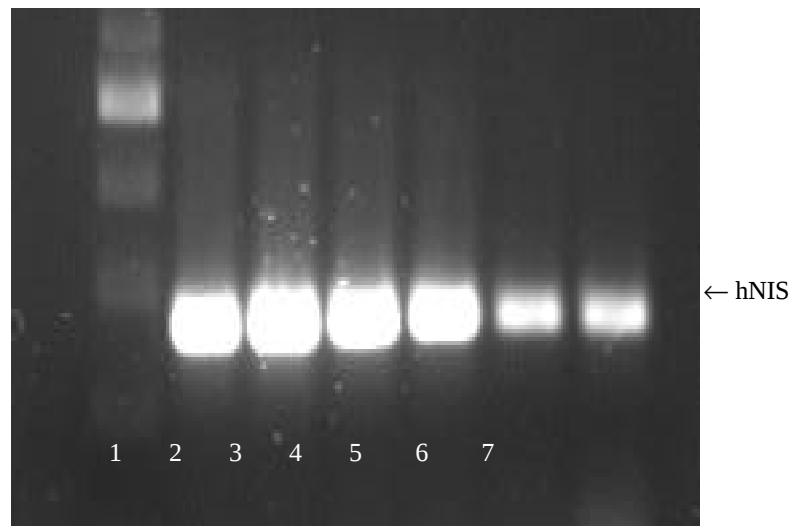


Abb. 4.16: Gelelektrophoretische Auftrennung der im Real-Time Lauf generierten hNIS-Standardkurve auf einem 2% Agarosegel

Bande 1: 1 kb Basenpaarleiter

Bande 2: 10^6 Kopien hNIS

Bande 3: 10^5 Kopien hNIS

Bande 4: 10^4 Kopien hNIS

Bande 5: 10^3 Kopien hNIS

Bande 6: 10^2 Kopien hNIS

Bande 7: 10^1 Kopien hNIS

4.4.4 Ermittlung der Inter- und Intra-Assayvariationskoeffizienten für die Real-Time PCR auf hNIS

Bevor mit der Untersuchung der Expression von hNIS am LightCycler begonnen wurde, erfolgte zunächst die Bestimmung der Inter- und Intra-Assayvariationskoeffizienten für die Real-Time PCR auf hNIS. Zur Bestimmung der Koeffizienten des Intra-Assays wurden in einem Lauf 10 Wiederholungen von jeweils 50, 100 und 1000 hNIS-Kopien mitgeführt. Während in Abb. 4.17 das "Baseline Adjustment" zur Bestimmung des Intra-Assayvariationskoeffizienten von 1000 Kopien dargestellt ist, sind in Abb. 4.18 die ermittelten Kopien zur Bestimmung der Intra-Assayvariation graphisch dargestellt.

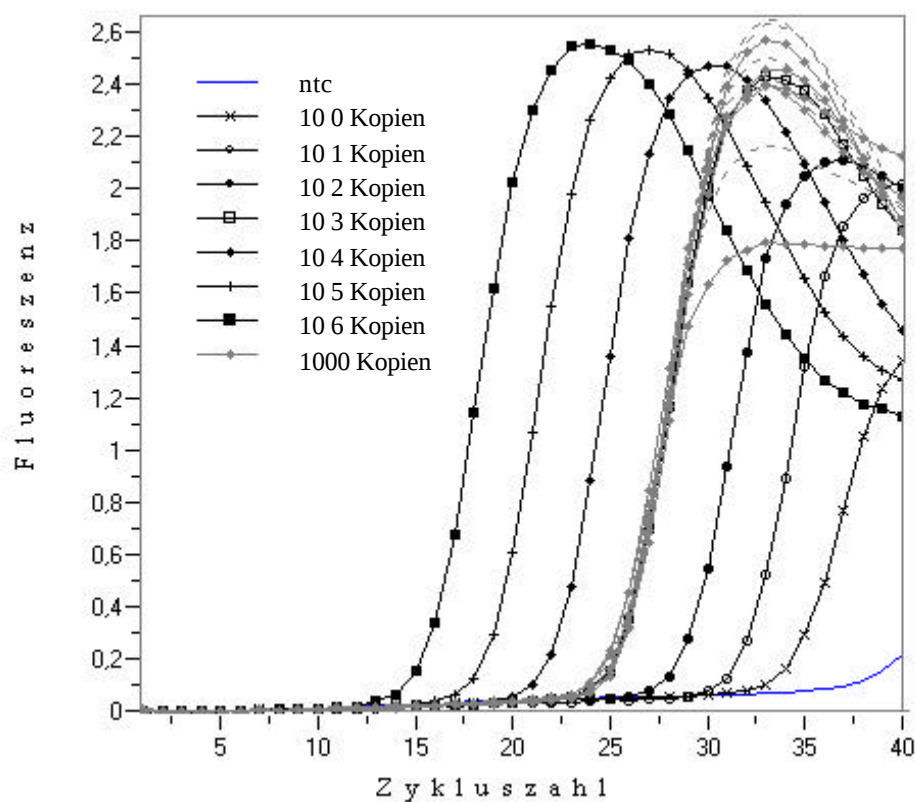


Abb. 4.17: "Baseline Adjustment" zur Bestimmung des Intra-Assayvariationskoeffizienten für 1000 Kopien hNIS-Plasmid

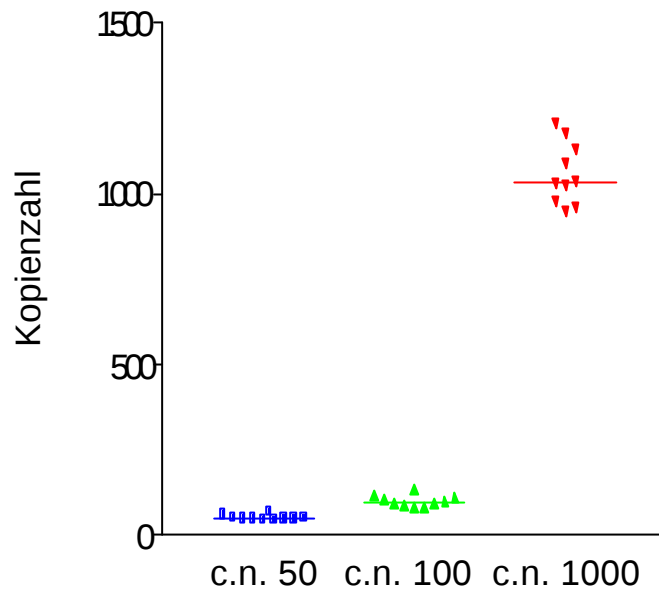


Abb. 4.18:
Darstellung der Kopienzahl zur
Bestimmung des Intra-Assayvaria-
tionskoeffizienten der Real-Time PCR
auf hNIS
c.n. = Kopienzahl (copy number)

Zur Ermittlung der Inter-Assayvarianz wurden 10 Real-Time Läufe durchgeführt, in denen neben einer Standardkurve 50, 100 und 1000 Kopien hNIS in Form von Triplikaten eingesetzt wurden (s. Abb. 4.19).

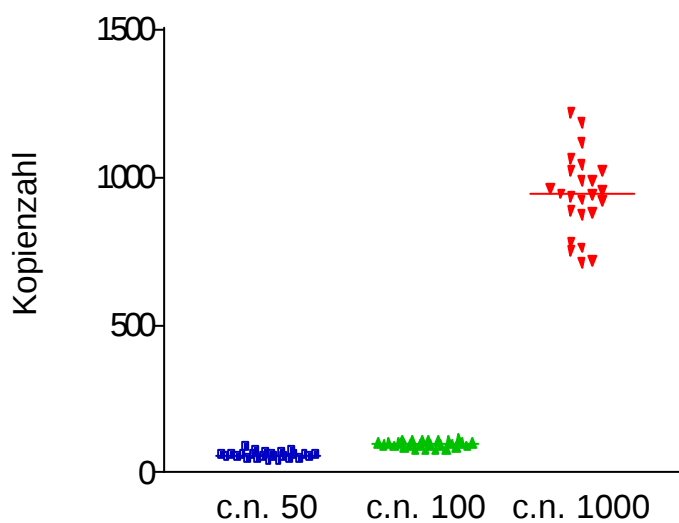


Abb. 4.19:
**Inter-Assayvariationskoeffizient von 10
unabhängigen Real-Time PCR-Läufen
mit Triplikaten von jeweils 50, 100 und
1000 hNIS-Plasmidkopien**
c.n. = Kopienzahl (copy number)

In Tab. 4.5 sind nachstehend die ermittelten Variationskoeffizienten sowohl für den Intra- als auch für die durchgeführten Inter-Assay-Läufe zusammengefasst. Die Berechnung der jeweiligen Varianz erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism® Version 3.0.

	Variationskoeffizient des Intra-Assays (%)	Variationskoeffizient des Inter-Assays (%)
50 Kopien (c.n. 50)	14,43	18,33
100 Kopien (c.n.100)	17,63	11,20
1000 Kopien (c.n.1000)	8,45	12,14

Tab. 4.5: Ermittelte Intra – und Inter-Assayvariationskoeffizienten zur Real-Time PCR auf hNIS

Wie bei näherer Betrachtung von Tab. 4.5 ersichtlich wird, nimmt die Varianz mit steigender Kopienzahl innerhalb eines Real-Time Laufes identischer Proben ab. In allen drei Fällen liegt der Variationskoeffizient deutlich unter 20%.

Dies gilt auch für die durchgeführten Inter-Assay-Läufe, jedoch mit weniger Deutlichkeit. Dies kann jedoch darauf zurückgeführt werden, dass für jeden Inter-Assay eine neue Standardkurve mitgeführt werden musste und demnach innerhalb der einzelnen PCR-Läufe kleinere Schwankungen aufgetreten sind.

4.4.5 Einfluss von Forskolin und bTSH auf die Expression des Symporters

Um folgende Expressionsstudien durchführen zu können, wurden aus operativ entferntem Schilddrüsengewebe Thyreozyten isoliert (s. Punkt 3.4), die nach entsprechender Kultivierung zu 1×10^6 Zellen/ml im 6-well-Format ausgesät wurden. Nach einer Adaptationszeit von ca. 24 Std. wurden die Zellen mit Forskolin bzw. bTSH stimuliert (s. Punkt 3.5).

Die im folgenden dargestellten Daten wurden zusammengetragen aus Stimulationsansätzen zehn verschiedener Thyreozytenkulturen, die dann unter Anwendung der GraphPad Prism[®] Software statistisch ausgewertet wurden.

4.4.5.1 Konzentrationsabhängigkeit für Forskolin

Als ein möglicher Faktor zur Steigerung der Expression von hNIS könnte Forskolin betrachtet werden. Forskolin ist ein Stimulator der Adenylatcyclase und stimuliert durch die Generierung von cAMP die Expression des TSH-Rezeptors.

In diesem ersten Experiment wurde die Konzentrationsabhängigkeit der Expression von hNIS auf Forskolin hin untersucht. Dazu wurden die im 6-well Format ausgesäten Thyreozyten für 24 Std. mit 0,1; 1,0; 10 und 15 μ M Forskolin stimuliert. Da Forskolin in DMSO gelöst wurde, wurden zur unstimulierten Basalprobe 10 μ l DMSO gegeben, um Einflüsse des Lösungsmittels auf die Expression ausschließen zu können.

Als Ergebnis kann postuliert werden, dass die Symporterexpression abhängig ist von der Menge an dargereichtem Forskolin (s. Abb. 4.20; Abb. 4.21). Eine maximale Stimulation wird bei 10 μ M Forskolin erreicht.

Des Weiteren folgt die Abhängigkeit der Expression einer Sättigungskinetik, denn nach Zugabe von 15 μ M Forskolin kommt es zu keiner weiter gesteigerten Expression. Während, bezogen auf alle 10 Experimente, der Stimulationsfaktor bei einer Dosis von 10 μ M Forskolin 2,7 beträgt, so reduziert er sich nach einer 24-stündigen Inkubation mit 15 μ M Forskolin auf 1,3.

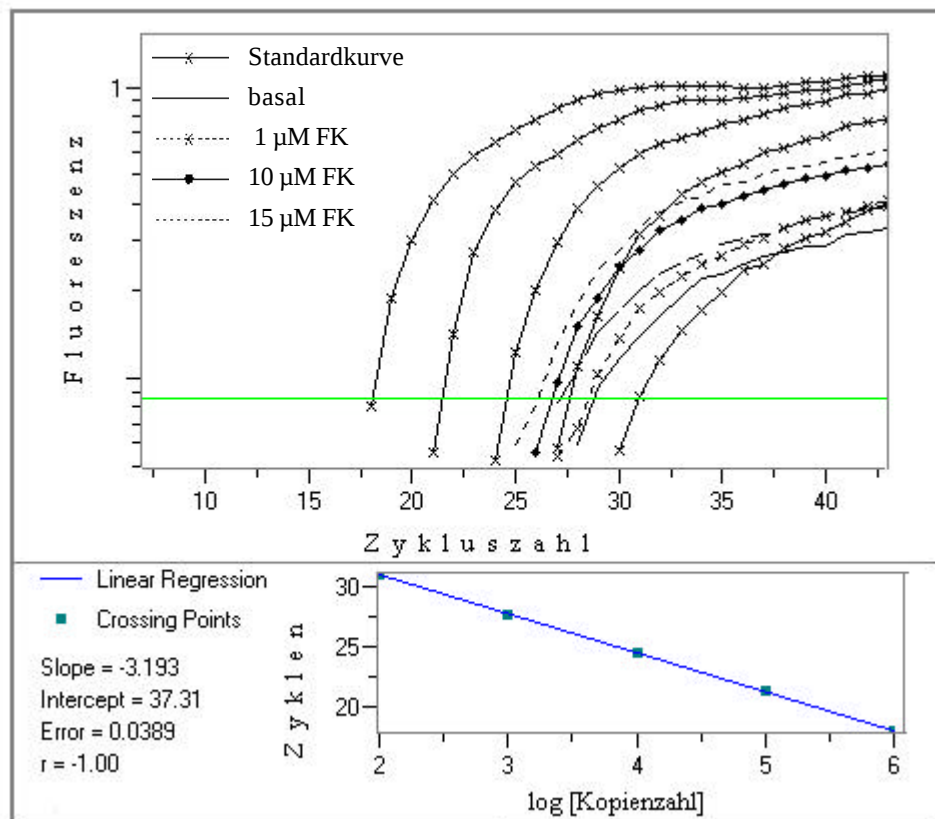


Abb. 4.20: "Analysis Mode" und Standardkurve zur Expression des humanen Symporters in Abhängigkeit von Forskolin (FK)

Oberes Fenster: von links nach rechts Standardkurve von 10^6 bis 10^2 Kopien, sowie die korrespondierenden Kurven für den Basalwert, 1 μ M, 10 μ M und 15 μ M Forskolin (FK)

Unteres Fenster: Standardkurve inklusive Regression, Steigung und PCR-Fehler

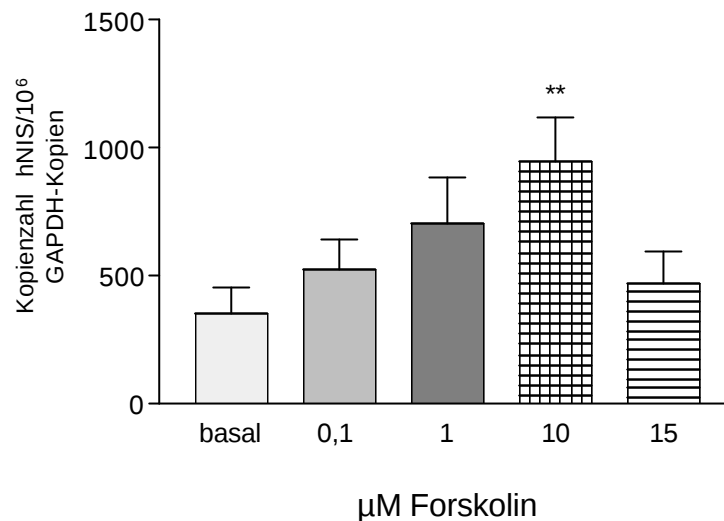


Abb. 4.21: Konzentrationsabhängigkeit von Forskolin auf die Expression von hNIS

Dargestellt ist die gemessene Kopienzahl von hNIS bezogen auf 1 Mio GAPDH-Kopien

(n = 10)

** = $p < 0.005$ vs. Basalwert

4.4.5.2 Konzentrationsabhängigkeit für bTSH

Ein weiterer potenter Stimulator der hNIS-Genexpression ist bTSH (bovines Thyrotropin). Nach der Bindung von TSH an seinen spezifischen TSH-Rezeptor, kommt es intrazellulär zur Freisetzung von cAMP (s. Abb. 1.1), welches seinerseits an der Bereitstellung von Energie zur Translokation von Jodid in die Follikel beteiligt ist.

In diesem Experiment wird die Änderung des Expressionsverhaltens bei drei verschiedenen bTSH-Konzentrationen untersucht. Primäre Thyreozyten wurden mit 0,1; 1,0 bzw. 10 mU/ml bTSH stimuliert. Nach 24 Std. erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA (s. Punkt 3.6.2) mit anschließender cDNA-Synthese (s. Punkt 3.6.5), sowie die Quantifizierung der Stimulationsansätze am LightCycler.

Auch hier zeigt sich eine bestehende Konzentrationsabhängigkeit zwischen der Expression von hNIS und der dargereichten Menge an bTSH (s. Abb. 4.22). Nach Zugabe von 10 mU/ml bTSH kann eine vierfach gesteigerte hNIS-Expression beobachtet werden.

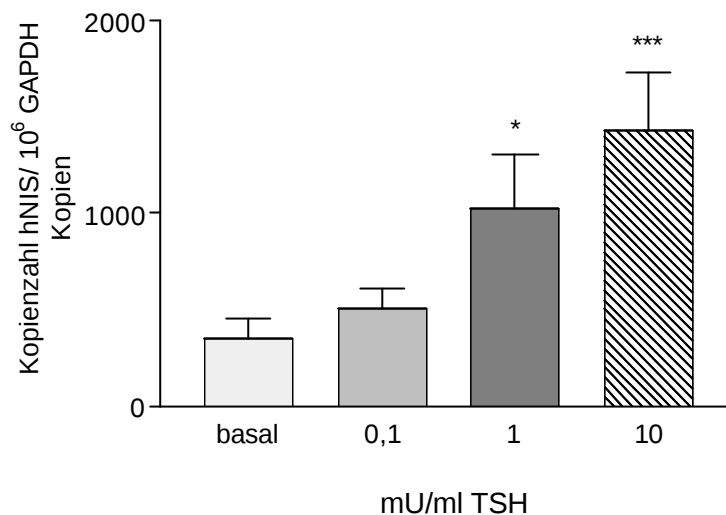


Abb. 4.22: hNIS-Expression in Abhängigkeit von der eingesetzten bTSH-Konzentration

Dargestellt ist die hNIS-Kopienzahl bezogen auf 1 Mio GAPDH-Kopien; (n = 10)

* $p < 0,05$ vs. Basalwert

*** $p < 0,0005$ vs. Basalwert

4.4.5.3 Zeitabhängigkeit für Forskolin und bTSH

Nachdem sowohl für Forskolin als auch für bTSH eine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden konnte, sollte zusätzlich eine mögliche Zeitabhängigkeit untersucht werden. Dazu wurden abermals 1×10^6 Thyreozyten im 6-well Format ausgesät.

Die eingesetzte Konzentration an bTSH bzw. Forskolin entsprach der Dosis, bei der die deutlichsten Stimulationseffekte gemessen wurden. Folglich wurde die Zeitabhängigkeit der Symporterexpression bei einer Dosis von 10 μ M Forskolin bzw. 10 mU/ml bTSH aufgenommen.

Sowohl für bTSH als auch für Forskolin kann eine Zeitabhängigkeit postuliert werden, die ihr Maximum nach 24 Std. erreicht (s. Abb. 4.23).

Der Stimulationsfaktor für bTSH wird nach 24 Std. mit 5,3 angegeben, der sich nach weiteren 24 Std. Inkubation auf 3,2 reduziert.

24 Std. nach Zugabe von 10 μ M Forskolin zu primären, humanen Thyreozyten kommt es zu einer gesteigerten Expression des Symporters. Der errechnete Stimulationsfaktor liegt bei 4,0. Zum Zeitpunkt 48 Std. Inkubation reduziert sich dieser Faktor um 0,8 auf einen Wert von 3,2.

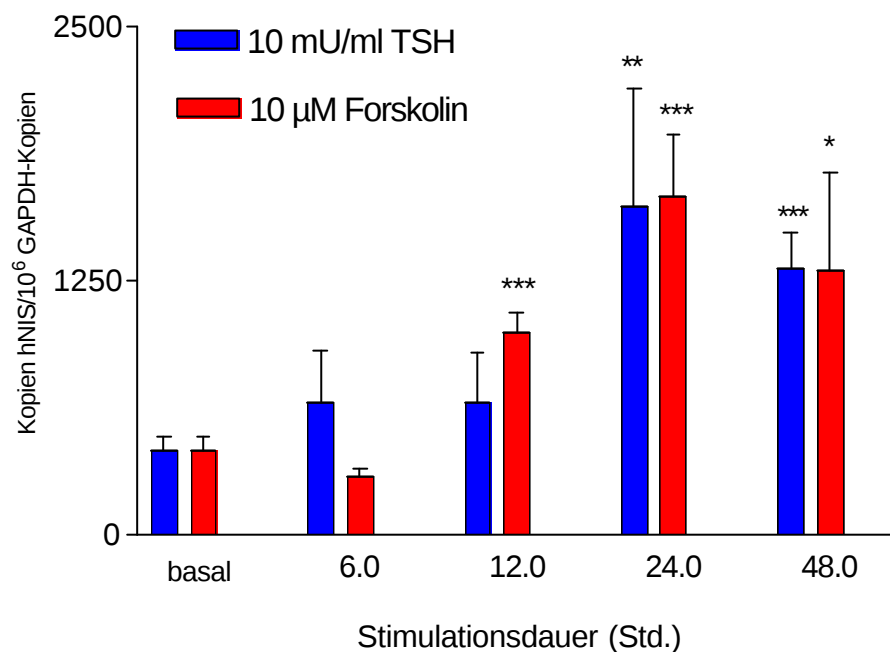


Abb. 4.23: Zeitabhängigkeit zur Expression von hNIS durch Forskolin bzw. bTSH

Dargestellt ist die Änderung der Kopienzahl von hNIS bezogen auf 1 Mio GAPDH-Kopien über eine Stimulationsdauer von 6–48 Std.; (n = 10)

* $p < 0,05$ vs. Basalwert

** $p < 0,005$ vs. Basalwert

*** $p < 0,0005$ vs. Basalwert

4.4.6 Einfluss von TGF- β 1 und TNF-a auf die Expression des Symporters

Zur Darstellung der Inhibition der Symporterexpression wurde der Einfluss von TGF- β 1 und TNF-a untersucht. Während TGF- β 1 ein potenter Inhibitor des Wachstums und der DNA-Synthese in Schilddrüsen ist, wird TNF-a aus Makrophagen bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen freigesetzt. In Homologie zur Durchführung der Stimulationsexperimente mit bTSH und Forskolin wurden auch hier 1×10^6 Zellen im 6-well-Format ausgesät und entsprechend stimuliert. Um mögliche Inhibitionseffekte besser erfassen zu können, wurden die Thyreozyten mit bTSH für 24 Std. vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Wachstumshormon inkubiert (TGF- β 1: 1 bzw. 10 ng/ml; TNF-a: 10 bzw. 75 ng/ml). Nach 48 Std. Inkubation erfolgte eine Isolierung der RNA mit anschließender cDNA-Synthese, sowie der Quantifizierung der Expressionsspiegel am LightCycler.

Als Ergebnis kann formuliert werden, dass die Expression des Symporters sowohl durch die Zugabe an TGF- β 1 als auch TNF-a inhibiert wird. Dabei folgt die Inhibition in beiden Fällen einer Konzentrationsabhängigkeit (s. Abb.4.24). Während durch die Zugabe von 10 ng/ml TNF-a die Expression des Symporters um 45 % reduziert wird, so beträgt der Expressionsfaktor bei einer Dosis von 75 ng/ml TNF-a 0,07. Für TGF- β 1 ergeben sich Expressionsfaktoren von 0,73 bei einer Dosis von 1 ng/ml TGF- β 1 bzw. 0,2 nach der Zugabe von 10 ng/ml.

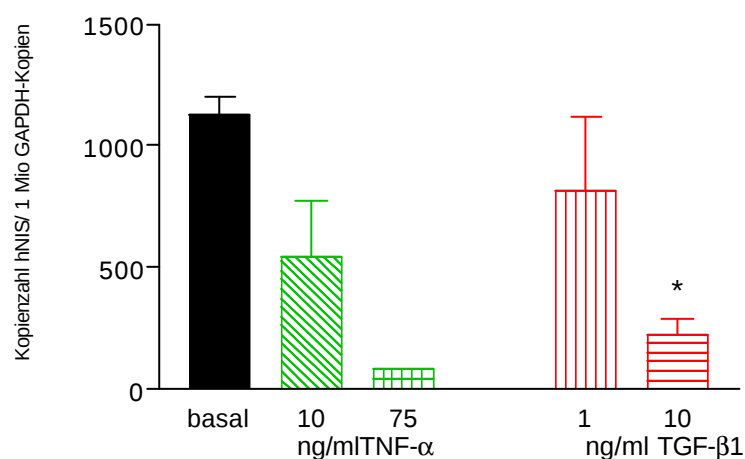


Abb. 4.24: Inhibition der hNIS-Expression nach Zugabe von TGF- β 1 bzw. TNF-a

Dargestellt ist die hNIS-Kopienzahl bezogen auf 1 Mio GAPDH-Kopien; (n = 3)

* p < 0,05 vs. Basalwert

4.5 Studien zur Aufnahme von Jodid

Ein weiteres Ziel der Promotionsarbeit zur Charakterisierung des humanen Symporters waren Untersuchungen zur $^{125}\text{Jodid}$ -Aufnahme in mit hNIS transfizierten Zellen. Neben der Kinetik zur Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$, sollte zusätzlich der Einfluss diverser Inhibitoren auf die Jodidaufnahme untersucht werden.

4.5.1 Transfektion der Zelllinie FTC236 bzw. CHO mit dem "full length"-Symporter

Zu Beginn der Untersuchungen zur Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$ wurden sowohl FTC236-Zellen als auch CHO-Zellen stabil mit dem "full length"-Konstrukt des humanen Symporters transfiziert (s. Punkt 3.7.2). Nach erfolgreicher Selektion von G418-positiven Klone wurden diese im Verlauf einer "limiting dilution" so weit verdünnt, dass im Fall der CHO-Zellen sieben Einzelklone resultierten, während für die transfizierte FTC236-Zelllinie fünf Einzelklone erfolgreich isoliert werden konnten.

Aus diesen Einzelklonkulturen wurde, nach erfolgreicher Kultivierung, Gesamt-RNA isoliert (s. Punkt 3.6.2). Die jeweiligen hNIS-Expressionsspiegel wurden, nach Umschreibung in cDNA (s. Punkt 3.6.4), in einer Real-Time PCR ermittelt.

Die Klone, die eine hohe Kopienzahl für das hNIS-Transkript aufwiesen, wurden des Weiteren in die im folgenden beschriebenen Studien zur $^{125}\text{Jodidaufnahme}$ eingesetzt. In Abb. 4.25 ist das "Baseline Adjustment" für die mit hNIS transfizierten CHO-Klone dargestellt.

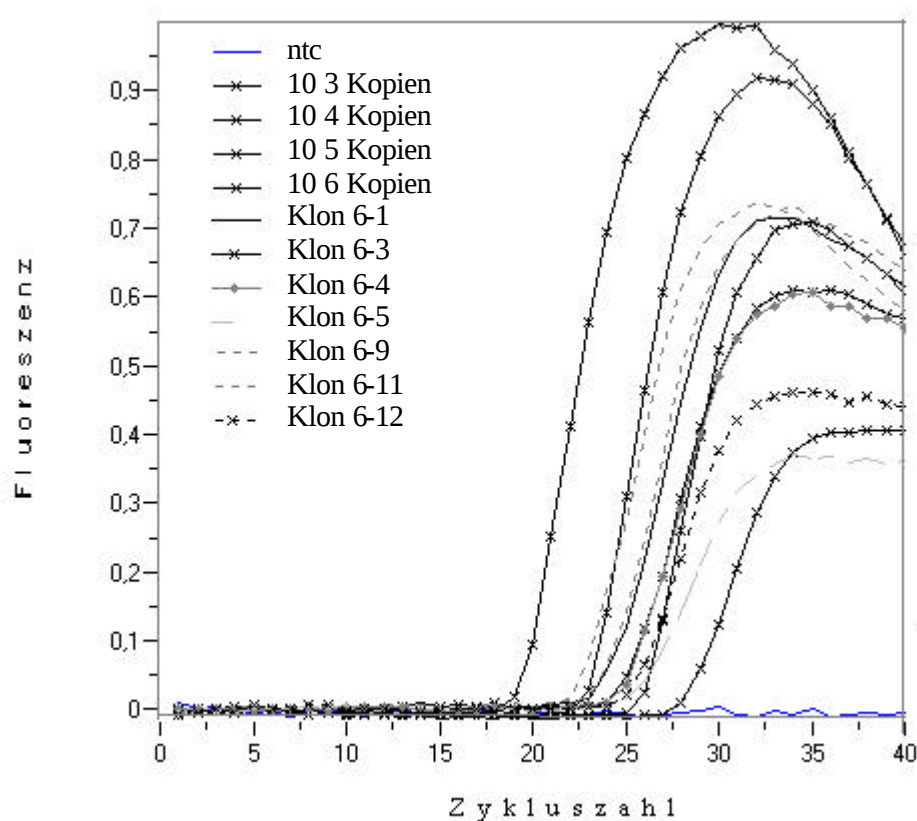


Abb. 4.25: Überprüfung der transfizierten CHO-Klone auf die Expression des Symporters zur Auswahl geeigneter Klone für die 125 Jodidaufnahmestudien
 Dargestellt ist von links nach rechts die Standardkurve für hNIS von 1×10^6 bis 1×10^3 Kopien, sowie die erfolgreich mit hNIS transfizierten und selektierten CHO-Klone.

In Abb. 4.26 ist das "Baseline Adjustment" der Real-Time PCR zur Auswahl geeigneter mit hNIS transfizierter FTC236-Klone dargestellt.

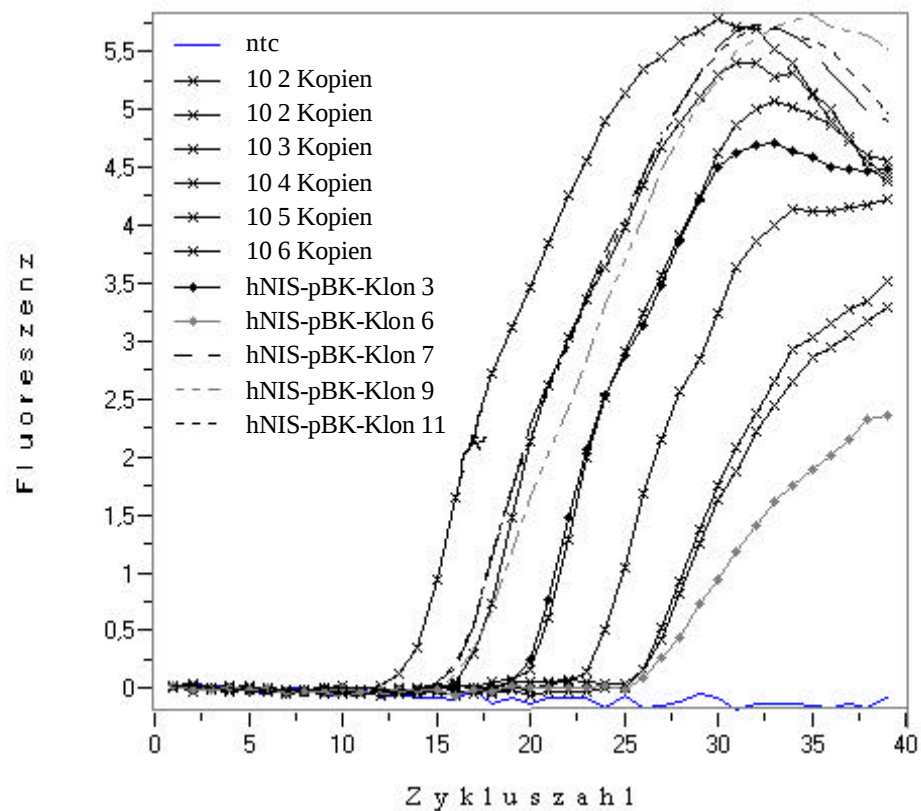


Abb. 4. 26: Überprüfung der FTC236-hNIS-pBK-Klone 3, 6, 7, 9 und 11 zur Ermittlung der Klone mit dem höchsten hNIS-Expressionsspiegel

Dargestellt ist von links nach rechts die Standardkurve von 10^7 bis 10^1 hNIS-Kopien, sowie die einzelnen hNIS-pBK-Klone.

Zur Durchführung der ¹²⁵Jodidaufnahmestudien wurden die FTC236-hNIS-pBK-Klone 6, 7 und 11 ausgewählt. Bei den transfizierten CHO-Zellen wurden die Klone 6-1 und 6-11 zur Durchführung der Jodidaufnahmestudien ausgewählt.

4.5.2 Basale Jodidaufnahme ausgewählter Klone

Für die über Real-Time PCR ausgewählten Klone wurde in einem Vorversuch die Fähigkeit zur Jodidaufnahme überprüft.

Jeweils 100.000 Zellen/well folgender Klone wurden im 12-well-Format ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% wachsen gelassen:

CHO	FTC236
CHO-Klon 6-11	FTC236-hNIS-PBK Klon 6
CHO-Klon 6-1	FTC236-hNIS-pBK-Klon 7
	FTC236-hNIS-pBK-Klon 11

Die nicht transfizierten CHO- bzw. FTC236-Zellen dienten als Negativkontrolle. Vor Zugabe von 0,5 μCi Na^{125}J wurden die Zellen, wie unter Punkt 3.7.3 beschrieben, behandelt. Nach erfolgter Inkubation wurde, das in die Zellen gelangte, sowie an die Membran gebundene $^{125}\text{Jodid}$ mit Trichloressigsäure präzipitiert und im β -Counter gemessen.

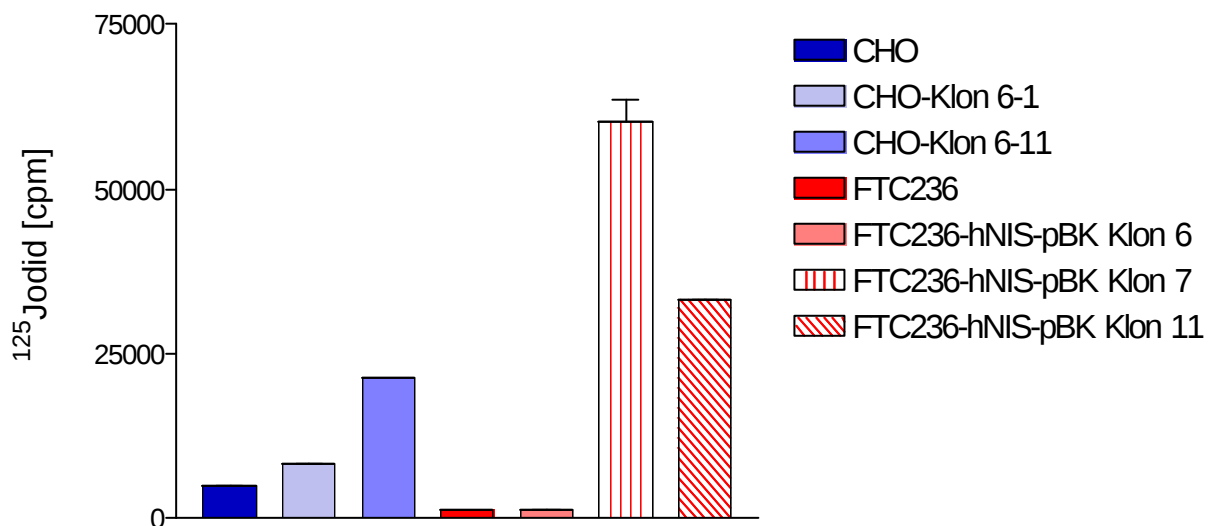


Abb. 4.27: Basale Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$ der mit hNIS transfizierten Zelllinien, sowie den korrespondierenden Negativkontrollen. (n = 3)

Die Aufnahme von ^{125}J odid in die mit dem "full length"-Konstrukt transfizierten Zellen ist unterschiedlich hoch (s. Abb. 4.27). Dies ist darauf zurückzuführen, dass die isolierten Einzelklone das DNA-Vektor-Konstrukt mit unterschiedlicher Effizienz exprimieren. Für weitere Untersuchungen wurde für die CHO-Linie der CHO-Klon 6-11 ausgewählt, während für die FTC236-Zellen die Klone 7 und 11 näher untersucht wurden.

4.5.3 Zeitabhängigkeit zur Aufnahme von ^{125}J odid

Zu Beginn der Studien zur Aufnahme von ^{125}J odid erfolgte eine Untersuchung der Kinetik zur Aufnahme des Radioisotops. Dazu wurden jeweils 100.000 Zellen der Klone CHO, CHO-Klon 6-11, FTC236 und FTC236-hNIS-pBK Klon 7 im 12-well Format ausgesät. Nach entsprechender Vorbehandlung der Zellen wurde diesen $0,5\ \mu\text{Ci Na}^{125}\text{J}$ angeboten und zu den Zeitpunkten 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min die Aktivität der ^{125}J odid-Aufnahme nach TCA-Fällung im β -Counter bestimmt.

Während für die Kontrollansätze keine Aufnahme von ^{125}J odid erfolgte, folgt die Aufnahme von ^{125}J odid in den transfizierten Zellen einer Sättigungskinetik, wie in Abb. 4.28 dargestellt.

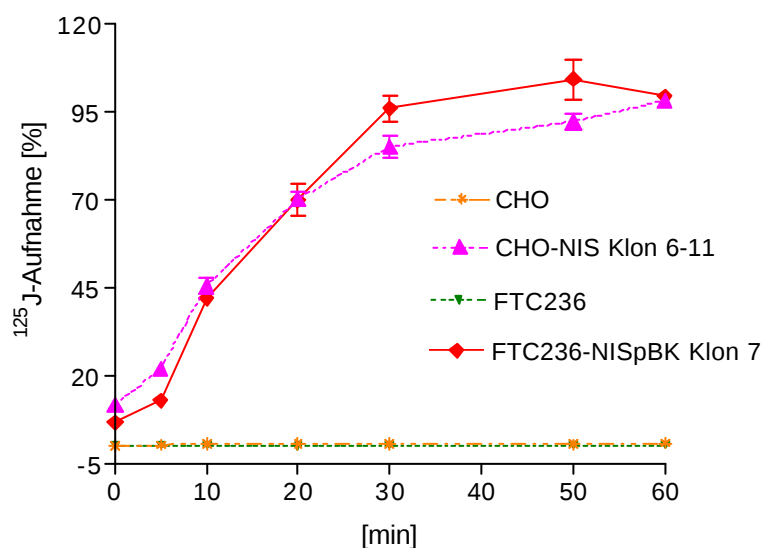


Abb. 4.28: Zeitabhängigkeit zur Aufnahme von ^{125}J odid im CHO-Klon 6-11 bzw. FTC236-hNIS-pBK Klon 7.

Dargestellt ist die prozentuale Aufnahme von ^{125}J odid über die Zeit in Minuten. ($n = 3$)

4.5.4 Inhibition der Aufnahme von Jodid

Nach der Bestimmung der basalen Aufnahme von ^{125}J odid sowie der Aufnahme der Kinetik, wurde der Einfluss möglicher Inhibitoren auf die ^{125}J odid-Aufnahme überprüft. Zur Berechnung der prozentualen Aufnahme wurde die maximal gemessene Aktivität der ^{125}J odid-Aufnahme in den transfizierten Zellen ohne Inhibitor gleich 100% gesetzt.

4.5.4.1 Einfluss von unmarkiertem Natriumjodid auf die Aufnahme von ^{125}J odid

In einem ersten Experiment wurde den Zellen eine Kombination aus Na^{125}J (0,5 μCi) und unmarkiertem "kaltem" Natriumjodid (NaJ) in verschiedenen Konzentrationen (0 / 0,1 / 1,0 / 10 / 100 mM) angeboten. Nach einer Einwirkzeit von 1 Std. wurden die Zellen intensiv mit HEPES-Puffer gewaschen, um überschüssige Radioaktivität zu entfernen, bevor das aufgenommene ^{125}J odid über eine TCA-Fällung aus den Zellen herausgelöst wurde. Für den CHO-Klon 6-11 konnte gezeigt werden, dass mit steigender Konzentration an unmarkiertem NaJ die ^{125}J odid-Aufnahme deutlich sinkt (s. Abb. 4.29). Nach Zugabe von 1 mM bzw. 10 mM NaJ reduziert sich die Aufnahmefähigkeit von ^{125}J odid um ca. 60%. Wird die Dosis an NaJ auf 100 mM erhöht, so entspricht die ^{125}J odid-Aufnahme dem Basalwert der Negativkontrolle.

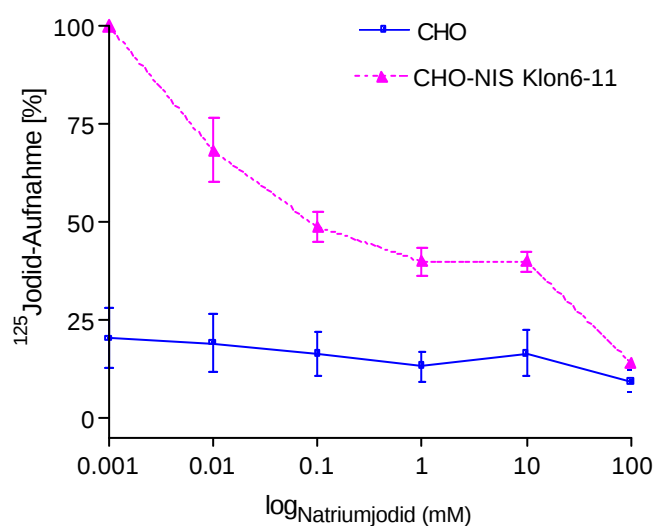


Abb. 4.29:

Konzentrationsabhängige Inhibition der Aufnahme von ^{125}J odid des CHO-Klones 6-11 nach Zugabe von "kaltem" NaJ

Dargestellt ist die prozentuale Aufnahme von ^{125}J odid in Abhängigkeit von der angebotenen Natriumjodidkonzentration. (n = 3)

Im Fall der mit hNIS transfizierten FTC236-Zellen kann ebenfalls eine konzentrationsabhängige Inhibition durch "kaltes" NaJ beschrieben werden. Eine Dosis von 0,1 mM NaJ führt in diesen Zellen bereits zu einer reduzierten 125 Jodid-Aufnahme von nur 10%. Eine Steigerung der NaJ-Konzentration führt zu einer weiteren Reduktion, die der basalen Aufnahme der Kontrollpopulation (unbehandelte FTC236-Zellen) entspricht (s. Abb. 4.30).

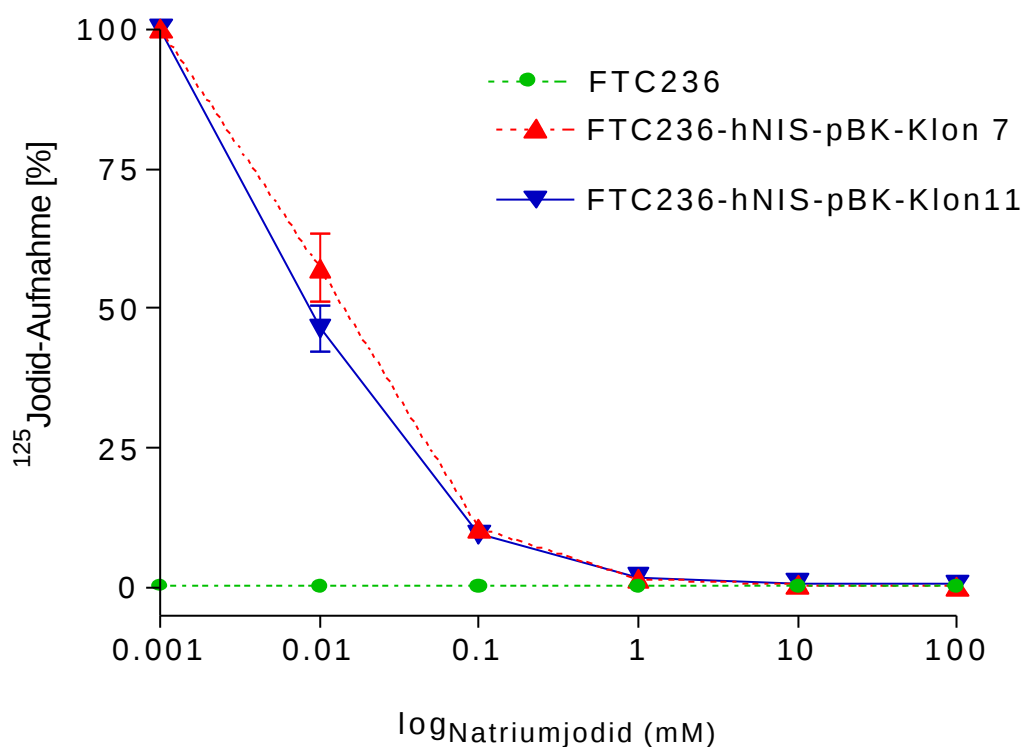


Abb. 4.30: Einfluss der Natriumjodidkonzentration auf die Aufnahme von 125 Jodid in mit hNIS transfizierten FTC236-Zellen.

Dargestellt ist die prozentuale Aufnahme von 125 Jodid in Abhängigkeit von der eingesetzten Salzkonzentration. (n = 3)

4.5.4.2 Einfluss von Perchlorat auf die Jodidaufnahme

Ein potenter Inhibitor zur Aufnahme von Na^{125}J ist Natriumperchlorat (NaClO_4). Aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zwischen Jodid und Perchlorat konkurrieren beide um identische Bindungsstellen zur Translokation der Moleküle ins Zellinnere. Diese Art der Konkurrenz um eine Bindungsstelle wird auch als kompetitive Hemmung bezeichnet. Die Wirkung von Perchlorat auf die Aufnahme von ^{125}J odid wird mittels einer Konzentrationsabhängigkeit untersucht. In Abb. 4.31 wird die kompetitive Hemmung der ^{125}J odid-Aufnahme durch NaClO_4 für den CHO-Klon 6-11 dargestellt. Auch hier folgt die Inhibition durch Perchlorat einer Konzentrationsabhängigkeit. Nach Zugabe von $0,1 \mu\text{M}$ Na-Perchlorat sinkt die Aufnahme von ^{125}J odid um ca. 50%. Das bedeutet, dass genauso viele Perchloratmoleküle an hNIS binden wie ^{125}J odidmoleküle. Nach Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Perchlorat sind alle Bindungsstellen am Symporter blockiert, so dass kein ^{125}J odid in die Zelle aufgenommen werden kann.

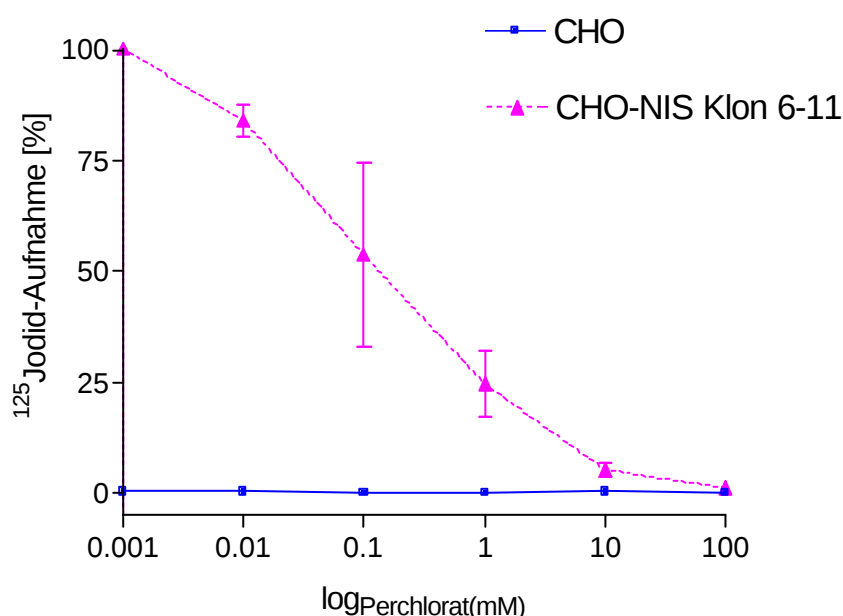


Abb. 4.31: Kompetitive Hemmung der ^{125}J odid-Aufnahme im CHO-Klon 6-11 nach Zugabe von Perchlorat (NaClO_4)

Dargestellt ist die prozentuale Aufnahme von ^{125}J odid in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration an NaClO_4 . (n = 3)

In den mit hNIS transfizierten FTC236-Zellen wird auch eine kompetitive Hemmung der ^{125}J -Aufnahme beobachtet, die abermals einer Konzentrationsabhängigkeit folgt (s. Abb. 4.32). Bei Zugabe von 10 μM Perchlorat zu 0,5 μCi Na^{125}J sinkt die Aufnahmefähigkeit des Ions um bis zu 90%. Eine Erhöhung der Perchloratkonzentration auf 100 μM resultiert in einer vollständigen Inhibition der ^{125}J -Aufnahme. Im Vergleich zum CHO-Klon 6-11 erfolgt die Reduktion der Aufnahmefähigkeit jedoch weniger schnell.

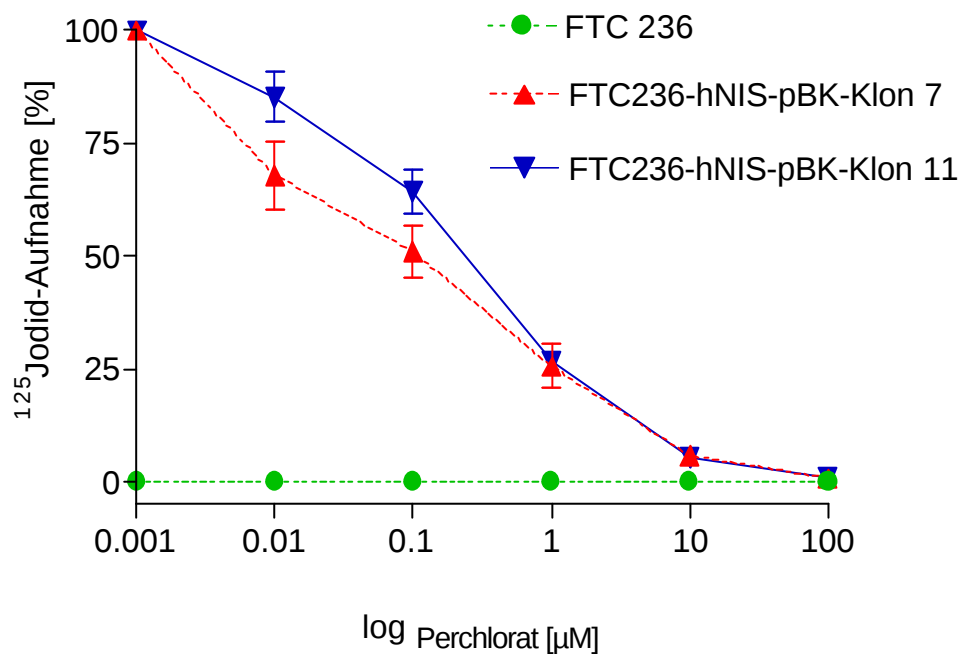


Abb. 4.32: Kompetitive Hemmung der ^{125}J -Aufnahme durch NaClO_4 im FTC236-hNIS-pBK-Klon 7 bzw. 11.

Dargestellt ist die prozentuale Aufnahme von ^{125}J in Abhängigkeit von der eingesetzten Perchloratkonzentration. (n = 3)

4.5.4.3 Quabain: Ein Inhibitor der Jodidaufnahme ?

Ein weiterer möglicher Inhibitor zur Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$ könnte Quabain sein. Quabain blockiert die Na^+/K^+ -ATPase, wodurch die zur Aufnahme von Jodid benötigte Energie nicht mehr freigesetzt werden kann und somit die Translokation der Ionen unterbunden wird.

Zur Untersuchung der Wirkungsweise von Quabain wurde eine Konzentrationsabhängigkeit bezüglich der $^{125}\text{Jodidaufnahme}$ durchgeführt. Wie in Abb. 4.33 dargestellt, folgt die Inhibition der $^{125}\text{Jodidaufnahme}$ durch Quabain im CHO-Klon 6-11 einer Konzentrationsabhängigkeit. Im Vergleich zur Hemmung durch NaJ geht die Reduktion der $^{125}\text{Jodid}$ -Aufnahme unter Einfluss von Quabain viel langsamer von statten. Während nach Zugabe von 0,1 mM NaJ nur noch 50% der markierten Moleküle in die Zelle aufgenommen werden können, so werden nach Zugabe von 0,1 mM Quabain immerhin noch 75% der markierten Jodidmoleküle aufgenommen.

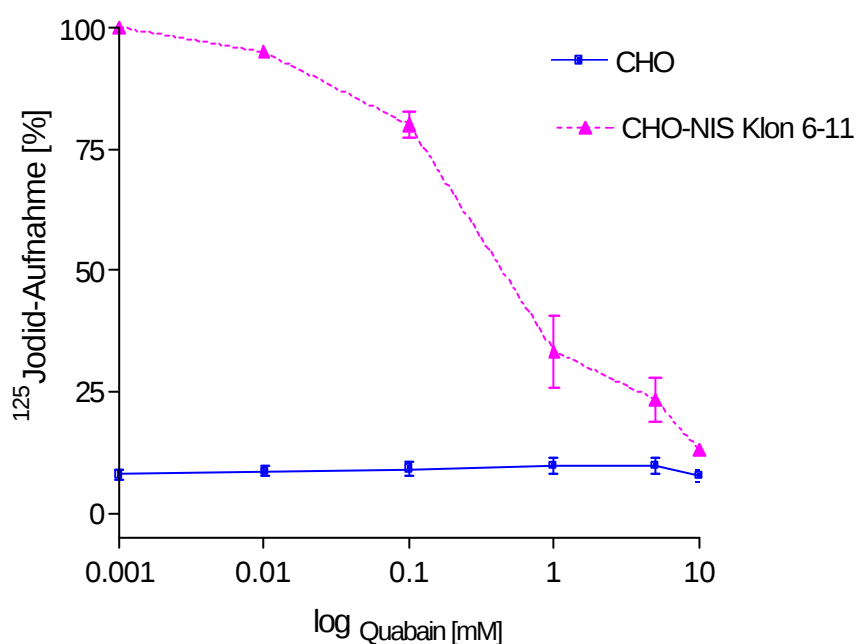


Abb. 4.33: Inhibition der $^{125}\text{Jodid}$ -Aufnahme in transfizierten CHO-Zellen durch Quabain.

Dargestellt ist die prozentuale Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$ in Abhängigkeit von der eingesetzten Quabainkonzentration. (n = 3)

Eine nähere Betrachtung der Abb. 4.34, bezüglich der Inhibition der Jodidaufnahme durch Quabain in den mit hNIS transfizierten FTC236-Zellen, zeigt eine kleine Diskrepanz zwischen den eingesetzten Klonen 7 und 11. Während sich beide bei der Untersuchung der Inhibition durch NaJ bzw. durch NaClO_4 durchaus ähnlich verhalten, kommt es beim Klon FTC236-hNIS-pBK 11 nach Zugabe von 0,01 mM Quabain zu einer fast 60%-igen Reduktion der ^{125}J odidaufnahme, während die Aufnahme für Klon 7 annähernd unverändert bleibt. Beide zeigen bei steigender Zugabe von Quabain jedoch eine Reduktion der Jodidaufnahmefähigkeit. Nach einer Dosis von 5 mM Quabain zeigen beide Klone eine reduzierte Aufnahmefähigkeit von ca. 10%. Eine weitere Erhöhung der Quabain-Konzentration führt im Klon FTC236-hNIS-pBK 7 zu einer vollkommenen Hemmung der ^{125}J odidaufnahme.

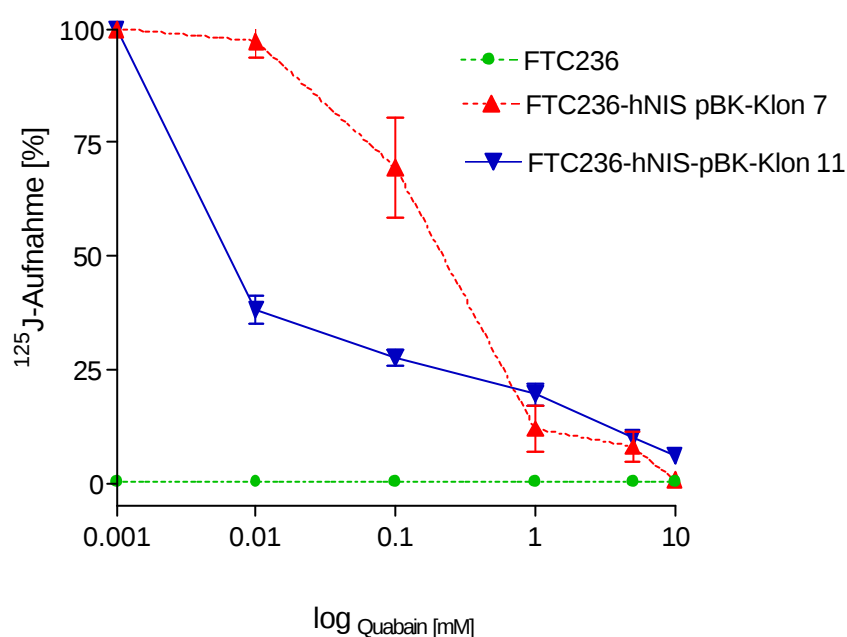


Abb. 4.34: Inhibition der ^{125}J odidaufnahme in transfizierten FTC236-Zellen durch Quabain.

Dargestellt ist die prozentuale Aufnahme von ^{125}J odid in Abhängigkeit von der eingesetzten Quabainkonzentration. (n = 3)

4.6 Immunhistochemie

In einem weiteren Experiment sollte, unter der Anwendung immunhistochemischer Methoden, hNIS in den erfolgreich mit dem "full length"-Konstrukt transfizierten Zelllinien nachgewiesen werden. Dazu wurden die Zellen auf "culture slides" ausgesät. Nach erfolgter Fixierung mit Paraformaldehyd und einer Inkubation mit dem monoklonalen hNIS-Antikörper 2.2 erfolgte eine Färbung mit FastRed (s. Punkt 3.10), welche lichtmikroskopisch bewertet und abschließend fotografiert wurde. Anhand der Abbildungen 4.35 und 4.36 wird erkennbar, dass in beiden, mit hNIS transfizierten Zelllinien, der humane Symporter nachweisbar ist.

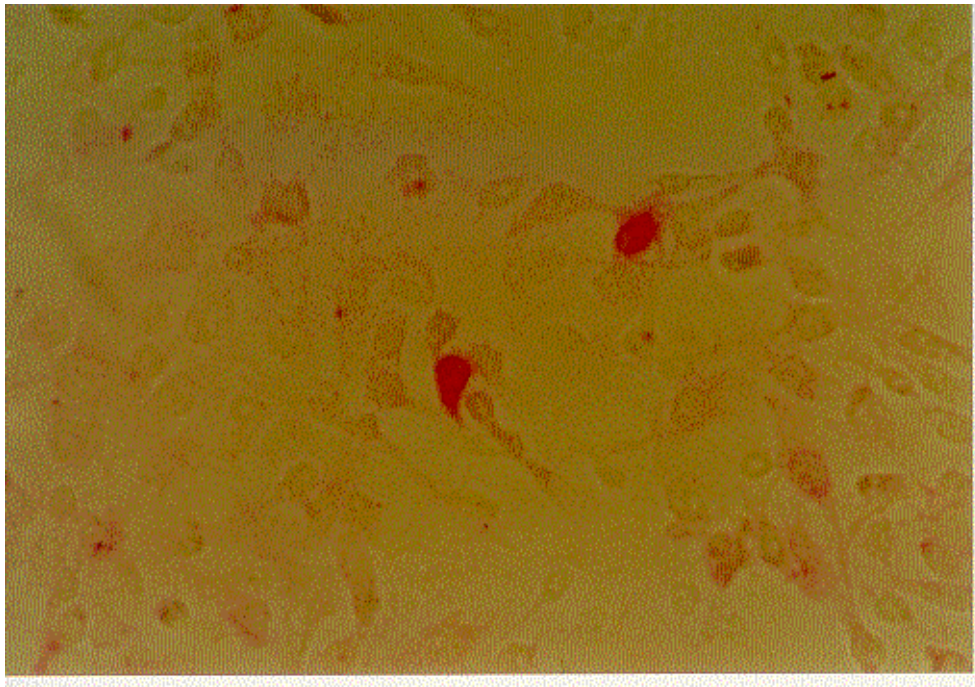


Abb. 4.35: Immunhistologischer Nachweis von hNIS in transfizierten CHO-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 2.2.

Dargestellt ist die positive Anfärbung des Symporters mit Fast Red.

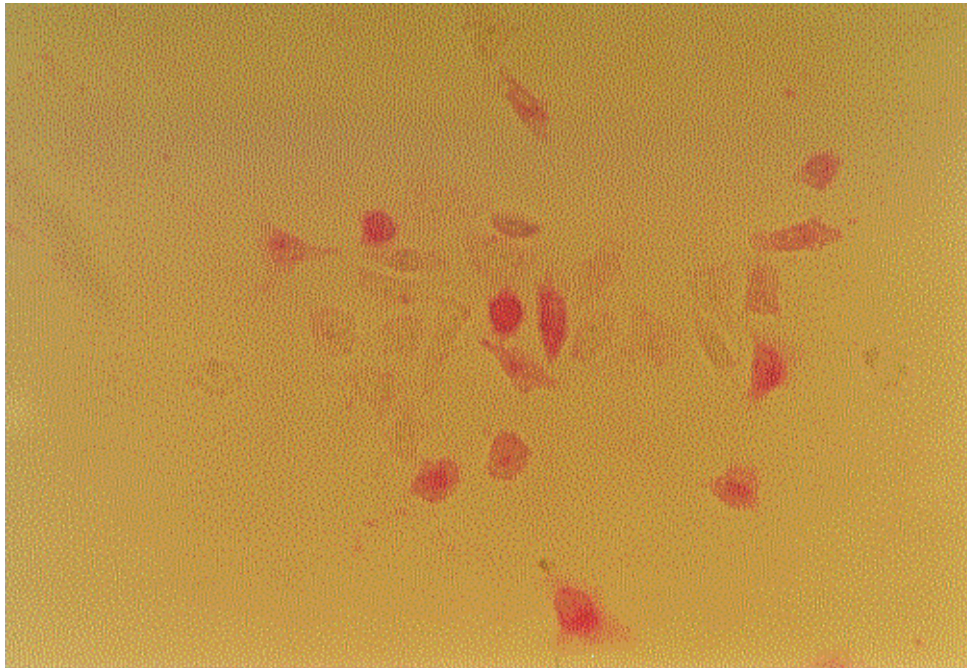


Abb. 4.36: Immunhistochemischer Nachweis des Symporters in transfizierten FTC236-Zellen.
Dargestellt ist die positive Reaktion auf den monoklonalen Antikörper 2.2 nach einer Färbung mit Fast Red.

4.7 Immunpräzipitation des [^{35}S]-Methionin-markierten CHO-hNIS-Klon 6-11

Nach der Überprüfung der funktionellen Aktivität des Symporters, sollte des Weiteren untersucht werden, ob sich der Klon für den Nachweis von Antikörpern eignet. Der erfolgreich mit dem "full length"-Konstrukt des Symporters transfizierte CHO-Klon 6-11 wurde mit [^{35}S]-Methionin markiert. Nach der unter Punkt 3.8.1 beschriebenen Markierung erfolgte eine Autoradiographie von 8 Schilddrüsenseren sowie 8 Normalseren (s. Punkt 3.8.2).

3 dieser 8 Schilddrüsenseren (H129, H68, H18) zeigten eine positive Reaktion auf den [^{35}S]-Methionin-markierten CHO-Klon 6-11 (s. Abb. 4.37). Diese Bindung bestätigt die Existenz von Autoantikörpern gegen hNIS.

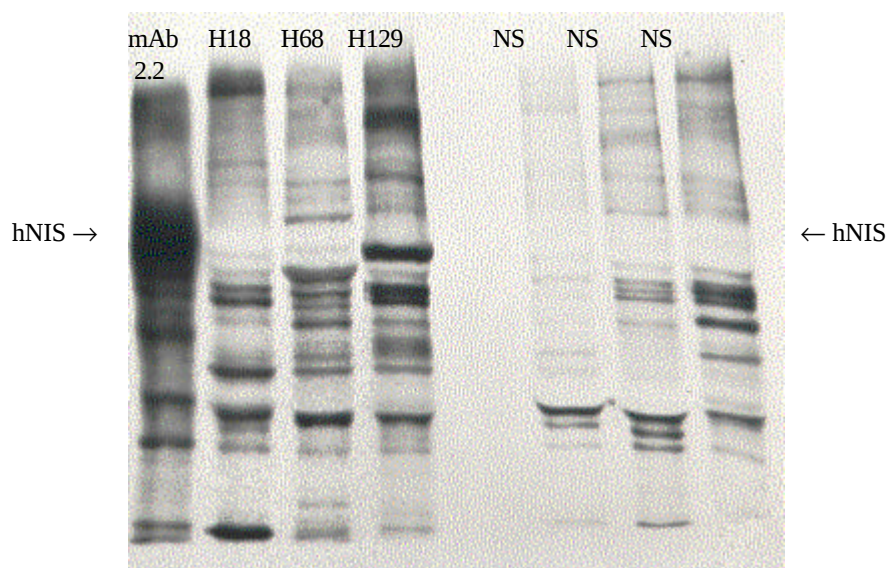


Abb. 4.37: Autoradiographie nach erfolgreicher Immunpräzipitation.

Dargestellt ist von links nach rechts der monoklonale Antikörper 2.2, die Schilddrüsenseren H18, 68 und 129, sowie drei Normalseren (NS) als Negativkontrolle.

4.8 Rolle von hNIS-Antikörpern bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen

Da mit dem CHO-NIS Klon 6-11 eine Immunreaktivität nachgewiesen werden konnte, sollte die Rolle von Autoantikörpern zu hNIS in Patientenseren, die an Hashimoto Thyreoiditis oder aber Morbus Basedow erkrankt sind, näher untersucht werden. Um eine Vielzahl an Seren testen zu können, wurde zur Entwicklung eines Radioligandenassay der "full length"-Klon des humanen Symporters kloniert (s. Punkt 3.7.1). Nach erfolgter Klonierung wurde der Einbau durch einen Verdau mit *SalI* und *HindIII* überprüft (Abb. 4.38), sowie die Nukleotidsequenz bestimmt.

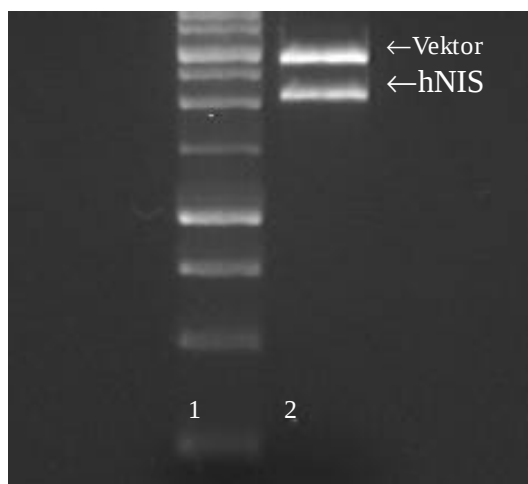


Abb. 4.38: Kontrollverdau zur Klonierung des "full length"-Symporters in den pGEM-4Z-Vektor

Bande 1: 1kb Basenpaarleiter

Bande 2: fl hNIS (verdaut mit *SalI*/*HindIII*)

Die Bindungsfähigkeit des hNIS-Antikörpers wurde über eine Immunpräzipitation ausgetestet. Dazu wurden 20 Seren mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen, sowie 15 Normalseren getestet. Das anschließende SDS-Polyacrylamid-Gel ergab eine positive Immunreaktivität in Seren von 3 Patienten mit Hashimoto's Thyreoiditis und 1 Patienten mit Morbus Basedow. Wie in Abb. 4.39 gezeigt, existierte eine sehr starke Bindung an hNIS, während es zu keiner Reaktion mit dem Kontrollprotein GLUT-2 kommt. Dies bestätigte, dass das durch *in vitro* Transkription und Translation produzierte Antigen in die Antikörperdetektion eingesetzt werden kann.

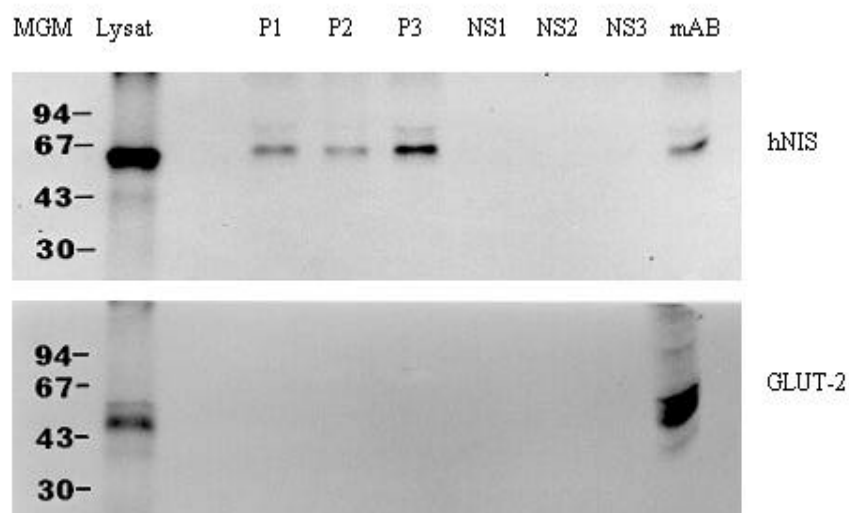


Abb. 4. 39: Immunpräzipitation von hNIS und GLUT-2 mit Seren von Patienten mit Morbus Basedow (P1), Hashimoto Thyreoiditis (P2,P3) und Normalpersonen (N1-N3). Die monoklonalen Antikörper mAB-hNIS 2.2 und GLUT-2 dienen als Positivkontrolle.

Im folgenden wurden 177 Seren von Morbus Basedow Patienten, 72 Seren von Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis und 165 Seren von Normalpersonen in einem Radioligandenassay untersucht.

Dazu wurden die Seren als Doppelwerte im 96-well-Format mit [35 S]-Methinoin-markiertem hNIS inkubiert und abschließend, wie unter Punkt 3.8.1, beschrieben im β -Counter gemessen.

In Abb. 4.40 ist die Verteilung der hNIS Autoantikörpertiter dargestellt. Bei einem eingestellten Grenzbereich, der 95,2% der Perzentile an Normalpersonen entspricht, zeigten 19 von 177 (10,7%) Patienten mit Morbus Basedow und 15 von 72 (20,8%) Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis positive hNIS-Antikörper. Dieser "Cut-off" wurde so gewählt, dass er ungefähr der Grenzschwelle entspricht, die für den Nachweis von TPO-Antikörpern mittels Radioligandenassay verwendet wird. Diese Daten zeigen erstmals, dass die Prävalenz von Autoantikörpern gegen humanes NIS deutlich niedriger liegt, als nach den Studien mit murinem NIS zu vermuten war.

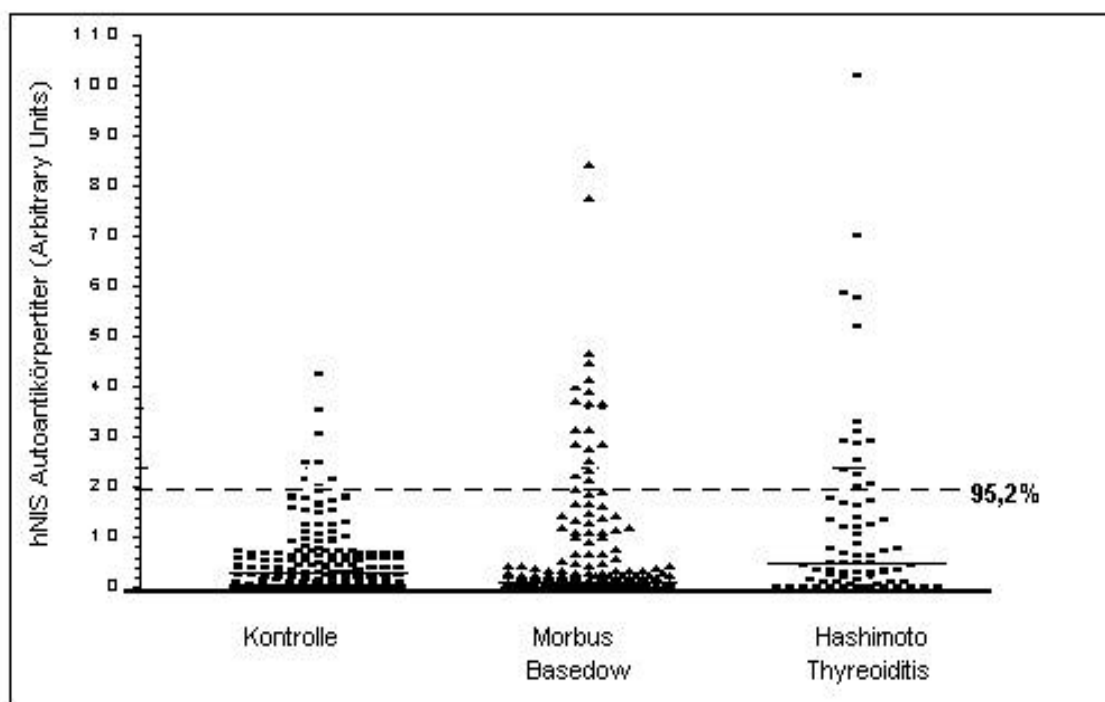


Abb. 4.37: Verteilung des hNIS Autoantikörpertiter bei Patienten und Normalpersonen

Die dargestellten hNIS-Antikörper Titer werden als Arbitrary Units (AUs) ausgedrückt. Die gestrichelte Linie definiert den Grenzwert (95,2 der Perzentile der Normalpersonen).

5. Diskussion

Der humane Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) ist das Schlüsselmolekül für die Jodidaufnahme in Schilddrüsenzellen. Über ihn gelangt das für die Synthese der beiden Schilddrüsenhormone T3 und T4 essentielle Jodid in die Schilddrüsenfollikel. Der Symporter ist lokalisiert an der basolateralen Membran der Follikelzellen und transportiert Jodid entgegen seines elektrochemischen Gradienten in die Thyreozyten (Carrasco, 1993). Die treibende Kraft für diesen Transport stammt aus einem transmembranen Natriumgradienten, der die dazu benötigte Energie aus einer Quabain-sensitiven Na^+/K^+ -ATPase bezieht (Eskandari, 1997). Über einen apikalen Chlorid-Jodid-Transporter, dem Pendrin, gelangt das aufgenommene Jodid ins Kolloid, dem eigentlichen Ort der Hormonsynthese (Scott, 1999; Bidart, 2000; Royaux, 2000).

Aufgrund dieser Merkmale kommt dem Symporter eine besondere Rolle bei der Differenzialdiagnose sowie möglichen Therapieansätzen bei der Behandlung von gutartigen bzw. bösartigen Schilddrüsenerkrankungen zu (Filetti, 1999; Shen, 2001). Die meisten bisher verfügbaren Daten über die Regulation von NIS waren in primären Zellkulturen oder Zelllinien der Ratte oder der Maus gewonnen worden. Es war deshalb unklar, inwieweit diese Ergebnisse auf humane Thyreozyten übertragen werden können. Insofern waren die hier dargestellten Untersuchungen über das Expressionsverhalten des humanen Symporters von besonderer Wichtigkeit.

Ein primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung einer Methode zum quantitativen Nachweis der Genexpression des humanen Natrium-Jodid-Symporters. Dabei sollten grundlegende Mechanismen der Regulation des Expressionsverhaltens sowie die funktionelle Aktivität des Symporters untersucht und erste Daten über die Rolle von hNIS bei verschiedenen Schilddrüsenerkrankungen gewonnen werden.

Es ist in der vorliegenden Arbeit erstmals gelungen, an primären, humanen Thyreozytenkulturen, die aus operativ entferntem Schilddrüsengewebe isoliert wurden, das Expressionsverhalten des Symporters zu beschreiben. Zunächst galt es eine Methode zu etablieren mit deren Hilfe eine schnelle, quantitative Messung der mRNA-Expression von hNIS ermöglicht wird. Neben einer hohen Spezifität sollte diese Methode zudem äußerst sensitiv sein. Angewendet wurde die konventionelle Methode des Northern Blots, die mit zwei neuen Techniken, der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR und der Real-Time PCR verglichen wurde. Sowohl mittels Northern Blot Analyse wie auch mittels kompetitiver, semiquantitativer RT-PCR konnten stimulationsabhängige Unterschiede in der hNIS Genexpression erfaßt werden.

Beide Methoden sind allerdings sehr arbeits- und zeitintensiv. Dies ist zum einen auf das aufwendige Blotten der RNA mit anschließender Hybridisierungsreaktion und zum anderen auf die notwendigen Standardisierungsversuche in der RT-PCR zurückzuführen, die in jedem Experiment meist mehrere Ansätze notwendig machten bis die eigentliche Messung stattfinden konnte (Aust, 1996; Seissler, 2000). Bei beiden Methoden erfolgt lediglich eine Messung der relativen Bandenintensitäten, so dass nur semiquantitative Aussagen ermöglicht werden.

Eine neue Methode, bei der innerhalb der logarithmischen Phase der Polymerasenkettenreaktion (PCR) quantifiziert wird, ist die Real-Time PCR. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz dieser innovativen Technologie die Messung von nur wenigen mRNA Kopien des zu untersuchenden Genes ermöglicht wird, wodurch die bis zur Entwicklung dieser Technik angewandten Methoden des Northern Blots bzw. der Endpunktmessung in Form der RT-PCR deutlich übertroffen werden (Bustin, 2000). Mehrere Studien, in denen unter anderem die mRNA-Expression von Zytokinen bestimmt worden ist, konnten zeigen, dass die Real-Time Detektion der PCR-Amplifikate in der logarithmischen Phase der PCR sehr genaue Werte der initialen Targetmolekülnzahl zu liefern vermag (Blaschke, 2000; Pfaffl, 2000; Yin, 2001). Um einen optimalen PCR-Nachweis zu etablieren, wurden verschiedene Primer- und Sondenpaare sowie Pufferbedingungen ausgetestet. Wie die vorliegenden Variationskoeffizienten für die durchgeführten Inter- und Intraassays belegen, ist es durch die durchgeführten Optimierungsschritte gelungen, sowohl für den humanen Symporter wie auch für GAPDH einen mRNA-Nachweis mit hoher Sensitivität bei gleichzeitiger hoher Reproduzierbarkeit zu etablieren. Bei 50 nachzuweisenden Kopien lag der Interassay-Variationskoeffizient bei 18,33% und bei 1000 Kopien lediglich bei 11,20%. Ähnlich gut lagen die Koeffizienten für die Intraassay-Variation (für 50 Kopien 14,4% bzw. bei 8,45% für 1000 Kopien). Im Fall der Northern Blot Analyse bzw. der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR sind, nach den in dieser Arbeit beschriebenen Erfahrungen, die Variationen deutlich größer. Zudem ist der Bereich von 50 Kopien bei beiden Methoden nur noch schwer zu erfassen.

Die Real-Time PCR erfolgt durch den Einsatz zweier spezifischer Hybridisierungssonden, die zusammen mit denen für eine PCR notwendigen Oligonukleotidprimer in den PCR-Ansatz gegeben werden. Nach der Bindung der beiden Hybridisierungsproben, die sich in relativer Nähe zueinander befinden, kommt es zum Fluoreszenzresonanzenergietransfer (FRET), wodurch in jeder Annealingphase Licht definierter Wellenlänge freigesetzt wird, welches direkt proportional zur Konzentration des Amplifikationsprodukts ist.

Da bei der hier angewendeten Methode, im Gegensatz zur SYBR Green I Technik, vier Oligonukleotide eingesetzt werden, die spezifisch an das Template binden, wird die Spezifität der PCR deutlich erhöht (Bustin, 2000; Pfaffl, 2000; Yin, 2001). Eine Amplifikation genomischer DNA konnte durch eine intensive DNase-Behandlung sowie durch den Einsatz Exon-Intron-spannender Primer und Sonden für das GAPDH- und das hNIS-Fragment ausgeschlossen werden. Dies wurde auch durch die Analyse der Fragmentgröße nach der Real-Time PCR in einem Ethidiumbromidgel belegt, die jeweils nur eine Bande der vorausgerechneten Größe zeigten. Im Gegensatz zur Northern Blot Analyse bzw. zur kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR bedurfte es bei der Real-Time PCR lediglich zweier Läufe, um die Symporterexpression quantifizieren zu können. Bis zum Erhalt der Ergebnisse der jeweiligen Versuchsreihe mußte eine Arbeitszeit von nur ca. 4 Stunden einkalkuliert werden. Dies macht diese Methode besonders interessant für Bestimmungen direkt aus Operations- oder Biopsiematerial. Nach eigenen vorläufigen Untersuchungen kann mit der hier dargestellten hNIS-PCR aus dem Material einer Feinnadelbiopsie eines Schilddrüsenknotens mit vermindertem Uptake in der Schilddrüsenszintigraphie die Expression von hNIS-mRNA quantifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte große Bedeutung für die Differenzialdiagnose und die Therapie zwischen differenzierten und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen besitzen (Arturi, 1998).

Zur Quantifizierung der Symporterexpression erfolgte eine Normalisierung der hNIS-PCR-Resultate auf das "house keeping"-Gen GAPDH. GAPDH wurde gewählt, da dieses Genprodukt konstitutiv exprimiert wird und nur einer geringen Regulation unterworfen wird. Es ist somit in idealer Weise für Studien geeignet, in denen stimulatorische bzw. inhibitorische Effekte verschiedener Agenzien ausgetestet werden (Gorzelnjak, 2001). Zur Berechnung der spezifischen hNIS-mRNA Konzentration wurde die hNIS-Kopienzahl pro 10^6 GAPDH-Kopien angegeben. Diese Kopien errechneten sich aus den jeweiligen mitgeführten externen Standardkurven für GAPDH bzw. für hNIS. Eine alternative Darstellung der Ergebnisse ist die Angabe von Stimulations- bzw. Inhibitionsfaktoren, die sich aus dem Verhältnis von behandelter zu unbehandelter (basaler) Probe ergeben. Beide Formen erlauben Aussagen über die spezifische Regulation der Expression eines bestimmten Gens.

Da die Angabe in absoluten Kopienzahlen pro definierter Konzentration an GAPDH Molekülen einen besseren Vergleich zwischen verschiedenen Studien erlaubt, wurde diese Darstellungsform in der vorliegenden Studie gewählt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der hNIS mRNA-Expression in primären, humanen Thyrozytenkulturen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene Gewebe eine basale hNIS-Expression zeigten, die sich in einem Kopienbereich von 83-593 Kopien/ 10^6 GAPDH-Kopien bewegt. Ein Unterschied in der Reinheit und in der Viabilität der Thyrozyten aus verschiedenen Geweben konnte nicht beobachtet werden. Da die Schilddrüsenzellen aus Strumagewebe isoliert worden sind, könnte der unterschiedliche mRNA-Gehalt auf lokale Inhomogenitäten des Schilddrüsenorgans zurückzuführen sein.

Alle drei angewandten Methoden zeigten, dass durch die Zugabe von bTSH bzw. von Forskolin die Expression des humanen Symporters um den Faktor 2-5 gesteigert wird. Die hier erzielten Daten stehen in Übereinstimmung mit einer einzigen Studie, die sich bisher mit der Regulation des humanen Symporters befaßt hat. Mit Hilfe von Northern Blot Analysen konnte die Arbeitsgruppe um Saito in Thyrozyten von Patienten mit Morbus Basedow eine Steigerung der hNIS-Expression um den Faktor 2,3 bzw. 2,5 nach Zugabe von TSH bzw. von Forskolin nachweisen (Saito, 1998).

In weiterführenden Experimenten wurde sowohl für bTSH als auch für Forskolin die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der hNIS-Regulation untersucht. Eine Dosis von 10 mU/ml bTSH führte zu einer maximalen Stimulation um den Faktor 4,0. Die Untersuchung bezüglich des Einflusses von Forskolin resultierte in einer maximalen Stimulation von 2,7 nach Zugabe von 10 μ M Forskolin für 24 Std.. Eine Erhöhung der Forskolinkonzentration auf 15 μ M führte zu einer Reduktion der Expressionsrate auf 1,3. Diese an primären, humanen Thyrozyten erzielten Daten stehen im Einklang mit denen, die in Studien verschiedener Arbeitsgruppen mit FRTL-5 Zellen der Fischer Ratte beobachtet wurden (Kogai, 1997; Ajjan, 1998; Pekary, 1998). So zeigte die Arbeitsgruppe um Kogai 1997 in Northern Blot Analysen, dass 24 Stunden nach Zugabe von TSH zu FRTL-5 Zellen diese eine maximale NIS-mRNA-Expression zeigen, die sich in einem Stimulationsfaktor von 5,9 widerspiegelt. Nach Stimulation mit Forskolin wurde bei FRTL-5 Zellen eine Steigerung der NIS Expression um den Faktor 6,3 beschrieben.

Des weiteren konnte für beide Stimulanzen eine Zeitabhängigkeit nachgewiesen werden. Nach Inkubation von 10 mU/ml bTSH bzw. 10 μ M Forskolin wurde nach 24 Std. eine maximale Symporterexpression erreicht. Eine längere Stimulation (48 Std.) führte zu einer Reduktion der hNIS-Expression im Fall des bovinen TSH von 5,3 auf 3,2, während sich die Expression des Symporters nach Zugabe von Forskolin zum Zeitpunkt 48 Std. von 4,0 auf 3,2 reduzierte. Auch hier stimmen die erzielten Daten gut mit denen für die FRTL-5 Zellen und humanen Thyreozyten ermittelten Stimulationsindices überein (Kogai, 1997; Ajjan, 1998).

Da zahlreiche Daten daraufhin deuten, dass Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen wie der Hashimoto Thyreoiditis oder aber dem Morbus Basedow spielen, war es ein Anliegen dieser Arbeit den Einfluss von TGF- β 1 und TNF- α auf die Expression des Symporters genauer zu untersuchen. Viele Zytokine, die von Makrophagen, dendritischen Zellen, T-Zellen, B-Zellen, thyreoidalen Follikeln und aktivierten Endothelzellen produziert werden, stimulieren die Expression der MHC Klasse I und II Moleküle. Zudem haben sie einen Einfluß auf Adhäsionsmoleküle sowie kostimulierende Faktoren, die ihrerseits das Wachstum und die Funktion der thyreoidalen Follikel zu ändern vermögen (Ajjan, 1996). Frühere Studien haben gezeigt, dass Zytokine wie INF- γ , TNF- α , IL-1 und IL-6 die Aktivität der Jodidaufnahme in die Schilddrüsenfollikel sowie die anschließende Schilddrüsenhormonsynthese beeinflussen können (Zheng, 1992; Weetman, 1994; Ajjan, 1998 ; Morris, 1988).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Zugabe von TGF- β 1 bzw. TNF- α die Expression des humanen Symporters drastisch reduziert wird. Die resultierende Inhibition folgt einer Konzentrationsabhängigkeit, wobei nach Zugabe von 1 ng/ml TGF- β 1 die Expressionsrate auf 73% der basalen Rate reduziert wird. Eine Erhöhung der TGF- β 1-Konzentration auf 10 ng/ml führt zu einer weiteren Reduktion der Expressionsrate auf 20%. Diese suppressive Wirkung von TGF- β 1 war zuvor in einer Studie mit FRTL-5 Zellen beschrieben worden (Kawaguchi, 1997).

Bestätigt werden konnte zudem eine starke dosisabhängige Suppression bis auf 7% der basalen Werte nach Inkubation der humanen Thyreozyten mit TNF- α . Diese Befunde korrelieren sehr gut mit Ergebnissen mehrerer Studien am Rattenmodell (Kawaguchi, 1997; Ajjan, 1998; Pekary, 1998). Da TNF- α ebenfalls eine Hemmung der Genexpression der Schilddrüsenperoxidase und der Typ I 5'-Dejodinase besitzt (Sato, 1990; Tang, 1995), kann ein genereller suppressiver Effekt auf schilddrüsenspezifische Proteine vermutet werden.

Die vorliegenden Befunde zeigen, dass humanes NIS ähnlich wie der Rattensymporter reguliert wird. Die hohen Stimulationsfaktoren nach einer Inkubation mit bTSH bzw. Forskolin weisen darauf hin, dass der Adenylatcyclase-cAMP Signalweg maßgeblich an der Hochregulierung der mRNA-Expression des Symporters beteiligt ist. Die Signaltransduktionswege der TNF- α - und TGF- β 1-vermittelten Inhibition sind bisher unbekannt. Ob und welche Bedeutung die durch TGF- β 1 und TNF- α vermittelte starke Inhibition der hNIS-Expression in der Pathogenese verschiedener Schilddrüsenerkrankungen besitzt, muss in zukünftigen Studien geklärt werden.

In vorangehenden Studien war eine Rolle von hNIS bei der Entstehung von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen postuliert worden. Diese Hypothese stützte sich auf den Nachweis von Autoantikörpern bei Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis und Patienten mit Morbus Basedow (Raspe, 1995; Endo, 1996; Morris, 1997). In diesen Studien war allerdings rekombinantes NIS der Ratte bzw. rNIS-Peptide verwendet worden. Da wie bei anderen Autoimmun-erkrankungen beschrieben, Spezies-spezifische Unterschiede die Antikörperbindung beeinflussen können, sollte in der vorliegenden Arbeit das Auftreten von Autoantikörpern gegen humanes NIS untersucht werden. Wichtig war es den humanen Symporter in korrekter dreidimensionaler Struktur zu exprimieren, weil bei vielen Autoimmunerkrankungen die Antikörper Konformationsepitope erkennen. Nach der Klonierung des "full length" Symporters wurde zunächst die chinesische Hamsteroovarzelllinie CHO sowie die humane Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC236 mit dem cDNA-Vektor-Konstrukt transfiziert und anschließend charakterisiert. Es folgte eine Selektion der transfizierten CHO- bzw. FTC236-Zellen durch Bestimmung der Jodidaufnahme und dem immunhistologischen Nachweis der Symporterexpression mit einem monoklonalen NIS-Antikörper, dessen Spezifität zuvor von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen worden war (Castro, 1999).

Nach der Selektion von hNIS-positiven Klonen wurden diese kultiviert und in verschiedene Experimente zur Bestimmung der funktionellen hNIS-Aktivität eingesetzt. In einer ersten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme von 125 Jodid einen steilen Anstieg in den ersten 10 bis 20 Minuten zeigt und bereits nach ca. 45 Minuten ein Maximum erreicht. Die hier ermittelte Zeitabhängigkeit deckt sich in etwa mit Untersuchungen zur Zeitabhängigkeit der Jodidaufnahme in FRTL5-Zellen.

Während in unseren Zellen die halbmaximale Aufnahme von Jodid im humanen System nach ca. 12 Minuten erfolgte, wurde für den Rattensymporter bereits nach 5 Minuten die halbmaximale Aufnahme von radioaktivmarkiertem Jodid erreicht (Kosugi, 1996). Diese Unterschiede sind am ehesten auf die unterschiedliche Stärke der NIS-Expression nach der Transfektion zurückzuführen.

Die erfolgreich mit hNIS transfizierten Klone zeigten zudem eine klassische kompetitive Hemmung durch Perchlorat, welches auf Grund einer strukturellen Ähnlichkeit zu Jodid, um freie Bindungsstellen am Symporter konkurriert. Bereits nach Zugabe von 0,1 μM Perchlorat sinkt die Aufnahmefähigkeit für $^{125}\text{Jodid}$ um 50%, d.h., dass genauso viele Perchloratmoleküle an den Symporter binden wie $^{125}\text{Jodid}$ moleküle. Diese Hemmung durch Perchlorat folgt einer Konzentrationsabhängigkeit. Eine Erhöhung der Perchloratkonzentration auf 100 μM blockiert komplett die Aufnahme von $^{125}\text{Jodid}$ in den mit hNIS transfizierten Zelllinien.

Ein weiterer Inhibitor der Aufnahme von Jodid in Thyreozyten ist Quabain. Quabain blockiert die Na^+/K^+ -ATPase, wodurch die zur Aufnahme von Jodid benötigte Energie nicht mehr freigesetzt werden kann und somit die Translokation von Jodid in die Zelle unterbunden wird. Auch hier folgt die Inhibition der $^{125}\text{Jodid}$ aufnahme einer Konzentrationsabhängigkeit. Im Vergleich zur kompetitiven Hemmung der Aufnahme von radioaktivmarkiertem Jodid zu unmarkiertem Jodid und der Hemmung durch Perchlorat erfolgt die Inhibition durch Quabain deutlich langsamer, da zu Beginn noch genügend Energie in Form von ATP für den hNIS-abhängigen Jodidtransport zur Verfügung steht und erst nach dem Verbrauch der ATP-Moleküle der Einfluß des Quabains zum Tragen kommt.

Das die Funktion des Symporters von der Struktur des Proteins abhängig ist belegen die vorliegenden Daten, da die transfizierten Zellen den intakten Symporter in korrekter dreidimensionaler Struktur exprimieren. Dies konnte als Hinweis gewertet werden, dafür dass die transfizierten Zellen für den Nachweis von NIS-Autoantikörpern eingesetzt werden können.

In Anlehnung an die Arbeit von Ajjan und dessen Mitarbeiter, die 1998 ein CHO-hNIS-Konstrukt zur Detektion von Antikörpern in Patienten mit autoimmuner Thyreoiditis verwendet haben, wurde eine Immunpräzipitation mit dem CHO-Klon 6-11 durchgeführt. In der Autoradiographie zeigten 3 von 8 Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen eine positive Bindung von hNIS, welche bei Seren von Normalpersonen nicht nachgewiesen werden konnte.

Da die Methode der Immunpräzipitation mit der radioaktiven Markierung mit Methionin, den aufwendigen Waschschritten und der Detektion auf Autoradiographiefilmen sehr arbeitsaufwendig und für die Routine ungeeignet ist, galt es eine Methode zu entwickeln, mit deren Hilfe eine Vielzahl an Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen auf hNIS-Autoantikörpern getestet werden konnten. Da in Voruntersuchungen gezeigt werden konnte, dass für den Nachweis von Autoantikörpern die Proteinkonformation von enormer Wichtigkeit ist, wurde der "full-length" Symporter in einen entsprechenden Vektor kloniert, um eine Expression durch *in vitro* Transkription und Translation zu ermöglichen.

Für die Austestung der Güte der hNIS-Expression erfolgte die Bestimmung der Antikörperbindung mittels der Seren, die zuvor eine positive Immunreaktion mit dem CHO-hNIS-Klon 6-11 gezeigt hatten. Anschließend erfolgte die Etablierung eines Radioligandenassays, mit dem zum ersten Mal eine Testung einer Vielzahl von Patientenseren mit autoimmunen Schild-drüsenerkrankungen durchgeführt werden konnte.

Anhand eines Vergleiches zwischen der Immunreaktivität gegen hNIS und dem strukturell ähnlichen humanen Glukosetransportermolekül Glut-2 konnte gezeigt werden, dass der humane Symporter spezifisch von Autoantikörpern in den Seren von einigen Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen gebunden wird. Nach der Bestimmung des "Cut-offs" für den durchgeführten Test, der ähnlich, wie für die Detektion von TPO-Autoantikörpern, auf die 95. Perzentile der Normalpersonen eingestellt wurde, zeigten nur 10,7% (19 von 177) der Patienten mit dem Krankheitsbild des Morbus Basedow bzw. 20,8% (15 von 72) der Patientenseren mit Hashimoto Thyreoiditis einen positiven Antikörpernachweis im Radioligandenassay.

Die in dieser Arbeit erzielten Daten stehen im Gegensatz zu früheren Studien, die eine positive Antikörperreaktion gegen rNIS bei 63-84% der untersuchten Patientenseren mit Morbus Basedow bzw. bei 12-26% in Hashimoto-Patienten beschrieben haben (Endo, 1996; Morris, 1997). Diese Unterschiede könnten bedingt sein durch eine unterschiedliche Antigenpräparation, der Wahl des Detektionssystems aber auch durch die geringe Zahl von untersuchten Patienten, die in diesen Studien mitgeführt wurden (26-27 Patienten mit Morbus Basedow, 20-27 Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis, 10-20 Kontrollpersonen). Während die Arbeitsgruppe um Endo rNIS als Histidin-markierten Fusionsprotein exprimierten, erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Expression des humanen Symporters in einem *in vitro* Transkriptions- und Translationssystem (TNT-System, Promega).

Im Vergleich zur Isolation des hydrophoben Membranproteins aus *Escherichia coli* bietet das TNT-System einige bedeutende Vorteile. Es erlaubt die Produktion eines rekombinanten Antigens in einem Schritt, ohne weitere Aufreinigungsschritte durchlaufen zu müssen. Der Nachweis der Autoantikörper über Autoradiographie oder einem Radioligandenassay ist zudem sensitiver und spezifischer im Vergleich zu Western Blot Analysen oder ELISA Techniken. Dies konnte in mehreren Studien für andere Autoantigene nachgewiesen werden, so zum Beispiel für Insulin (Greenbaum, 1992), die Glutamatdecarboxylase (Grubin, 1994), die Tyrosinphosphatase IA-2 (Seissler, 1996; Payton, 1995) sowie den TSH-Rezeptor (Morgenthaler, 1996).

Obwohl eine Vielzahl der Antigene, die in prokaryotischen Expressionssystemen in einer inaktiven Form vorliegen, im TNT-System ihre funktionelle Konformation ausbilden können, muss beachtet werden, dass im vorliegenden Falle nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Konformation von hNIS nicht vollständig ausgebildet oder erhalten wird. Dies könnte einerseits durch die starke Hydrophobizität des Proteins und das Fehlen der Glykosylierung nach Expression durch die *in vitro* Transkription/Translation bedingt sein. Allerdings muss erwähnt werden, dass diese Einschränkungen auch für die Arbeiten von Endo und von Morris gelten, die rNIS in *E. coli* exprimiert haben bzw. rNIS-Peptide einsetzten.

Die Resultate unserer Untersuchung werden dadurch unterstützt, dass die von uns publizierten Daten etwa zeitgleich von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt wurden (Chin, 2000). Chin und Mitarbeiter konnten in einem Bioassay zeigen, dass von 481 untersuchten Patienten nur 14 Antikörper aufwiesen, welche die Jodidaufnahme erfolgreich blockieren konnten. Die Ergebnisse dieser beiden Studien belegen, dass spezifische Autoantikörper gegen humanes NIS bei Patienten mit Morbus Basedow und Hashimoto Thyreoiditis auftreten können. NIS-Antikörper sind allerdings im Vergleich zu den TPO-Antikörpern und den TSH-Rezeptorantikörpern nur bei einem geringen Prozentsatz der Fälle nachweisbar, so dass auf ihre Bestimmung im Rahmen der Routinediagnostik verzichtet werden kann. In speziellen Fragestellungen, wie z.B. bei Patienten, die trotz ausreichendem Schilddrüsenvolumen eine ausgeprägte Hypothyreose entwickeln, könnte der Nachweis der hNIS-Antikörper zusätzliche wichtige Informationen erbringen.

6. Zusammenfassung

Der humane Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) ist das Schlüsselmolekül für die Jodidaufnahme in die Schilddrüse. Über ihn gelangt das für die Biosynthese der Schilddrüsenhormone T3 und T4 essentielle Jodid in die Schilddrüsenfollikel. Der Symporter ist an der basolateralen Membran der Follikelzellen lokalisiert und transportiert Jodid entgegen seines elektrochemischen Gradienten in die Thyreozyten. Die treibende Kraft für diesen Transport stammt aus einer Quabain-sensitiven Na^+/K^+ -ATPase. Aufgrund dieser Merkmale kommt dem Symporter eine besondere Rolle bei der Differenzialdiagnose sowie möglichen Therapieansätzen bei der Behandlung von gutartigen bzw. bösartigen Schilddrüsenerkrankungen zu.

Da die meisten bisher verfügbaren Daten über die Regulation von NIS in Zelllinien der Ratte oder der Maus gewonnen wurden, war es unklar, inwieweit diese Ergebnisse auf humane Thyreozyten übertragen werden können. Insofern waren die hier dargestellten Untersuchungen über das Expressionsverhalten des humanen Symporters von besonderer Wichtigkeit.

Innerhalb dieser Arbeit ist es erstmals gelungen an primären, humanen Thyreozytenkulturen, die aus operativ entferntem Schilddrüsengewebe isoliert wurden, das Expressionsverhalten des Symporters zu beschreiben. In diesem Zusammenhang stand die Etablierung einer Methode mit deren Hilfe eine schnelle, quantitative Messung der mRNA Expression von hNIS ermöglicht wurde. Neben einer hohen Spezifität sollte die Methode zudem äußerst sensitiv. Ein Vergleich zwischen der Northern Blot Analyse, der kompetitiven, semiquantitativen RT-PCR und der Real-Time PCR am LightCycler ergab, dass lediglich die letztgenannte Methode der Real-Time PCR den gestellten Anforderungen zur Erfassung der Symporterexpression entsprach.

Im Anschluss an die Optimierung der Real-Time PCR, folgte die eigentliche Untersuchung der hNIS mRNA-Expression in humanen, primären Thyreozytenkulturen. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des Symporters durch die Zugabe von bTSH bzw. Forskolin stimuliert wird. Diese Stimulation folgt sowohl einer Zeit- als auch einer Konzentrationsabhängigkeit. Diese an primären, humanen Thyreozyten erzielten Daten stehen im Einklang mit Studien, die sich mit den FRTL5-Zellen der Fischer Ratte beschäftigten.

Da zahlreiche Daten im Ratten- bzw. Maussystem daraufhin deuten, dass Zytokine bzw. Wachstumsfaktoren einen Einfluss auf die Expression des Symporters haben, sollte dieser Einfluss auch im humanen System überprüft werden.

Für den humanen Symporter konnte gezeigt werden, dass auch hier durch die Zugabe von TGF- β 1 bzw. TNF- α die Expression des humanen Symporters drastisch reduziert wird. Die resultierenden Daten zum Einfluss von Stimulantien bzw. Inhibitoren auf die hNIS-Expression zeigen, dass der humane Natrium-Jodid-Symporter ähnlich wie der Rattensymporter reguliert wird. Die hohen Stimulationsfaktoren nach einer Inkubation mit bTSH bzw. Forskolin weisen darauf hin, dass der Adenylatcyclase-cAMP-Signalweg maßgeblich an der Hochregulation der hNIS mRNA-Expression beteiligt ist. Die Signaltransduktionswege der TNF- α - und TGF- β 1-vermittelten Inhibition sind bisher unbekannt. Da jedoch bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen die thyreoidalen Follikularzellen neben einer gesteigerten Zytokinproduktion eine geänderte Aufnahme von Jodid zeigen, kann vermutet werden, dass es einen Zusammenhang zwischen dem lokalen Zytokinmilieu und der Symporterexpression gibt.

Zur Untersuchung der Rolle des humanen Symporters bei der Entstehung autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen, wurde ein Radioligandenassay entwickelt, mit dessen Hilfe das Auftreten von hNIS-Autoantikörpern in Seren von Patienten mit Morbus Basedow, Hashimoto Thyreoiditis bzw. von Normalpersonen erfaßt werden sollte. Dazu wurde der "full length" Symporter in ein Vektorsystem eingebaut, auf seine funktionelle Aktivität hin überprüft und anschließend in einer *in vitro* Transkription und Translation in Protein übersetzt, welches in den Radioligandenassay eingesetzt wurde. Die resultierenden Daten stehen im Gegensatz zu früheren Studien, die eine positive Antikörperreaktion gegen rNIS bei 63-84% der untersuchten Patientenserum mit Morbus Basedow bzw. 12-26% in Hashimoto-Patienten beschrieben. Diese Unterschiede könnten bedingt sein durch die Wahl des Detektionssystems aber auch durch die Anzahl der in die Studien eingeflossenen Patientenproben.

Die Resultate unserer Untersuchung werden dadurch unterstützt, dass die hier publizierten Daten etwa zeitgleich von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt wurden (Chin, 2000).

Mit den hier in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen ist eine Beschreibung des humanen Symporters gelungen, die als Grundlage sicherlich Ausgangspunkte für weitere Untersuchungen sein werden.

7. Literaturverzeichnis

Ajjan RA, Watson PF, McIntosh RS, Weetman AP. 1996 Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol* **105**: 523-528.

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

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

Ajjan RA, Findlay C, Metcalfe RA, Watson PF, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP. 1998 The modulation of the human sodium iodide symporter activity by Graves' disease sera. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1217-1221.

Ajjan RA, Kemp EH, Waterman EA, Watson PF, Endo T, Onaya T, Weetman AP 2000 Detection of binding and blocking autoantibodies to the human sodium-iodide symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 2020-2027.

Arturi F, Russo D, Schlumberger M, Du Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, hiefari E, Suarez HG Filetti S. 1998 Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 2493-2496.

Aust G, Heuer M, Laue S, Lehmann I, Hofmann A, Heldin NE, Scherbaum WA. 1996 Expression of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) mRNA and protein in pathological thyroid tissue and carcinoma cell lines. *Clin Exp Immunol* **105**: 148-154.

Bidart JM, Mian C, Lazar V, Russo D, Filetti S, Caillou B, Schlumberger M. 2000 Expression of pendrin and the pendred syndorme (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 2028-2033.

Blaschke V, Reich K, Blaschke S, Zipprich S, Neumann C. 2000 Rapid quantitation of proinflammatory and chemoattractant cytokine expression in small tissue samples and monocyte-derived dendritic cells: validation of a new real-time PCR technology. *J Immunol Meth* **246**: 79-90.

Bustin SA. 2000 Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-193.

Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. 1998 Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: An immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 4102-4106.

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

Castro MR, Bergert ER, Beito TG, McIver BD, Goellner JR, Morris JC. 1999 Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: Immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 2957-2962.

Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Roche PC, Ziesmer SC, Jhiang SM, Goellner JR, Morris JC. 1999 Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer. *J Endocrinol* **163**: 495-504.

Cavalieri RR. 1997 Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid* **7**: 177-181.

Chin HS, Khoo DHC, Morgenthaler NG, Vassart G, Costagliola C. 2000 Rarity of anti Na⁺/I⁻ symporter (NIS) antibody with iodine uptake inhibiting activity in autoimmune thyroid disease (AITD). *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 3937-3940.

Dai G, Levy O, Carraco N. 1996 Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature* **379**: 458-460.

DeGroot LJ. 1966 Kinetic analysis of iodine metabolims. *J Clin Endocrinol* **26**: 149.

Endo T, Kogai T, Nakazato M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T. 1996 Autoantibody against Na^+/I^- symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochem Biophys Res Commun* **224**: 92-95.

Endo T, Kaneshige M, Nakazato M, Kogai T, Saito T, Onaya T. 1996 Autoantibody against thyroid iodide transporter in the sera from patients with Hashimoto's thyroiditis possesses iodide transport inhibitory activity. *Biochem Biophys Res Commun* **228**: 199-202.

Eng PHK, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE. 1999 Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* **140**: 3404-3410.

Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. 1997 Thyroid Na^+/I^- symporter: mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Bio Chem* **272**: 27230-27238.

Evans ES, Schooley RA, Evans AB, Jenkins CA, Taurog A. 1966 Biological evidence for extrathyroidal thyroxine formation. *Endocrinology* **78**: 983-1001.

Everett LA, Glaser B, Beck JC, Idohl JR, Buchs A, Heymann Ma, Adawi F, Hazani E, Baxevanis AD, Sheffield VC, Green ED. 1997 Pendred syndrome is caused by mutations in an putative sulphate transporter gene (PDS). *Nat Genet* **17**: 411-422.

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. 1999 Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Bio Techniques* **26**: 112-125.

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

Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson JL. 1999 Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **140**: 5705-5711.

Greenbaum CJ, Palmer JP, Kuglin B, Kolb H. 1992 Insulin autoantibodies measured by radioimmunoassay methodology are more related to insulin-dependent diabetes mellitus than those measured by enzyme-linked immunosorbent assay: results of the 4th international workshop on the standardization of insulin antibody measurement. *J Clin Endocrinol Metab* **74**: 1040-1044.

Gorzelnia K, Janke J, Engeli S, Sharma AM. 2001 Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* **33**: 625-627.

Grubin CE, Daniels T, Toivola B, et al. 1994 A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia* **37**: 344-350.

Harui N, Endo T, Ohmori M, Onaya T. 1999 Extracellular adenosine increases Na⁺/I⁻ symporter gene expression in rat thyroid FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol* **157**: 31-39.

Ibelgauf H. 1990 Gentechnologie von A bis Z. VCH Verlagsgesellschaft mbH Weinheim Studienausgabe: 337-339.

Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, De Young BR, Smanik PA, McCaughy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL. 1998 An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology* **139**: 4416-4419.

Joba W, Spitzweg C, Schriever K, Heufelder AE. 1999 Analysis of human sodium/iodide symporter, thyroid transcription factor-1, and paired-box-protein-8 gene expression in benign thyroid diseases. *Thyroid* **9**: 455-466.

Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyazaki A, Onaya T. 1997 Transforming growth factor- β 1 suppresses thyrotropin-induced Na^+/I^- symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* **7**: 789-794.

Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. 1997 Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **138**: 2227-2232.

Kopp P. 1999 Pendred's syndrome: Identification of the genetic defect a century after its recognition. *Thyroid* **9**: 65-69.

Kosugi S, Sasaki N, Hai N, Sugawa H, Aoki N, Shigemasa C, Mori T, Yoshida A. 1996 Establishment and characterization of a Chinese hamster ovary cell line; CHO-4J, stably expression a number of Na^+/I^- symporters. *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 339-345.

Kreuzer KA, Lass U, Bohn A, Landt O, Schmidt CA. 1999 LightCycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res* **59**: 3171-3174.

Levy O, De la Vieja A, Carrasco N. 1998 The Na^+/I^- symporter (NIS): Recent advances. *J Bioenerg Biomembr* **30**: 195-206.

Majerus PM, Coutrois PA. 1992 Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. *J Biol Buccale* **20**: 241-245.

Markitziu A, Lustmann J, Uzieli B, Krausz Y, Chisin R. 1993 Salivary and lacrimal gland involvement in a patient who undergone a thyroidectomy and was treated with radioiodine for thyroid cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **75**: 318-322.

Merke F. 1971 Geschichte der Ikonographie des endemischen Kropfes und Kretinismus. Huber, Bern.

- Morgenthaler NG, Tremble J, Huang G, Scherbaum WA, McGregor AM, Banga JP.** 1996 Binding of antithyrotropin receptor autoantibodies in Graves' disease serum to nascent, in vitro translated thyrotropin receptor: ability to map epitopes recognized by antibodies. *J Clin Endocrinol Metab* **80**: 2752-2755.
- Morris JC, Bergert ER, Bryant WP.** 1997 Binding of IgG from patients with autoimmune thyroid disease to rat sodium-iodide symporter peptides: Evidence for the iodide transporter as an autoantigen. *Thyroid* **7**: 527-534.
- Morris JC, Ranganathan G, Hay ID, Nelson RE, Jiang NS.** 1988 The effects of transforming growth factor beta on growth and differentiation in the continuous rat thyroid cell line, FRTL-5. *Endocrinology* **123**: 1385-1394.
- Mullis KB, Faloona F.** 1987 Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350.
- Orlando C, Pinzani P, Pazzagli M.** 1998 Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab* **36**: 255-269.
- Payton MA, Hawkes CJ, Christie MR.** 1995 Relationship of the 37,000 and 40,000-M(r) tryptic fragments of islet antigens in insulin-dependent diabetes to the protein tyrosine phosphatase-like molecule IA-2 (ICA512). *J Clin Invest* **96**: 1506-1511.
- Pekary AE, Hershman JM.** 1998 Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce Na⁺/I⁻ symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **139**: 703-712.
- Pfaffl M.** 2000 Development and validation of an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT-PCR using LightCycler SYBR Green I technology. *Biochemia* **3**: 13-16.

Raspé E, Costagliola S, Ruf J, Mariotti S, Dumont JE, Ludgate M. 1995 Identification of the thyroid Na^+/I^- cotransporter as a potential autoantigen in thyroid autoimmune disease. *Eur J Endocrinol* **132**: 399-405.

Rillema JA, Rowady DL. 1997 Characteristics of the prolactin stimulation of iodide uptake into mouse mammary gland explants. *Proc Soc Exp Biol Med* **215**: 366-369.

Rillema JA, Yu TX, Jhiang SM. 2000 Effects of prolactin on sodium iodides symporter expression in mouse mammary gland explants. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E769-E772.

Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED. 2000 Pendrin, the protein encoded by the pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and its regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology* **141**: 839-845.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T. 1997 Increased expression of the Na^+/I^- symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 3331-3336.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muratmatsu A, Onaya T. 1998 Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* **101**: 1296-1300.

Sato K, Satoh T, Shizume K, Ozawa M, Han DC, Imamura H, Tsushima T, Demura H, Kanaji Y, Ito Y, Obara T, Fujimoto Y, Kanaji Y. 1990 Inhibition of ^{125}I organification and thyroid hormone release by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and interferon- γ in human thyrocytes in suspension culture. *J Clin Endocrinol Metab* **70**: 1735-1743.

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karninski LP. 1999 The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* **21**: 440-443.

Seissler J, Morgenthaler NG, Achenbach P, et al. 1996 Combined screening for autoantibodies to IA-2 and antibodies to glutamic acid decarboxylase in first degree relatives to patients with IDDM. *Diabetologia* **39**: 1351-1356.

Seissler J, Wagner S, Schott M, Lettmann M, Feldkamp J, Scherbaum WA, Morgenthaler NG. 2000 Low frequency of autoantibodies to the human Na⁺/I⁻ symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 4630-4634.

Seissler J, Nguyen TB, Aust G, Steinbrenner H, Scherbaum WA. 2000 Regulation of the diabetes-associated autoantigen IA-2 in INS-1 pancreatic beta-cells. *Diabetes* **49**: 1137-1141.

Shen DHY, Kloos RT, Mazzaferri EL, Jhiang SM. 2001 Sodium iodide symporter in health and disease. *Thyroid* **5**: 415-425.

Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T. 1997 Iodide uptake and experimental ¹³¹I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na⁺/I⁻ symporter gene. *Endocrinology* **138**: 4493-4496.

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu KY, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. 1996 Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 339-345.

Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. 1997 Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* **138**: 3555-3558.

Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. 1998 Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1746-1751.

Spitzweg C, Joba W, Morris JC, Heufelder AE. 1999 Regulation of sodium iodide symporter gene in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* **9**: 821-830.

Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE. 1999 Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 4178-4184.

Stecher PG, Windholz M, Leahy DS. 1968 Der Merck Index. 8. Auflage., Merck Darmstadt: 569.

Strum JM, Phelps PC, McAtee MM. 1983 Resting human female breast tissue produces iodinated proteins. *J Ultrastruct Res* **84**: 130-139.

Suzuki K, Moriyama E, Mori-Aoki A, Kato R, Royaux I, Everett LA, Green ED, Kohn LD, Burman KD. 1999 Pendred syndrome gene, PDS, is an apical porter of iodide and its expression is tightly regulated by follicular thyroglobulin. 72nd Annual Meeting of the American Thyroid Association.

Tang KT, Braverman LE, De Vito W. 1995 Tumor necrosis factor- α and interferon- γ modulate gene expression of type I 5'-deiodinase, thyroid peroxidase, and thyroglobulin in FRTL-5 rat thyroid cells. *Endocrinology* **136**: 881-888.

Taurog A. 1996 Hormone synthesis: thyroid hormone metabolism. Aus Braverman LE, Utiger RD (Hrsg) The thyroid – a fundamental and clinical text. Lippincott-Raven, Philadelphia: 47-81.

Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zaho QH, Feng HD, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N. 2000 The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* **6**: 871-878.

Tonacchera M, Agretti P, Ceccarini G, Lenza R, Refetoff S, Santini F, Pinchera A, Chiovato L, Vitti P. 2001 Autoantibodies from patients with autoimmune thyroid disease do not interfere with the activity of the human iodide symporter gene stably transfected in CHO cells. *Eur J Endocrinol* **144**: 611-618.

Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, Miot F. 1997 Moderate doses of iodide *in vivo* inhibit cell proliferation and the expression of thyroidperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol* **131**: 195-203.

Weetman AP, McGregor AM. 1994 Autoimmune thyroid disease: Further developments in our understanding. *Endocrinol Rev* **15**: 788-830.

Weiss SJ, Philip NJ, Ambesi-Impimbato FS, Grollman EF. 1984 Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology* **114**: 1099-1107.

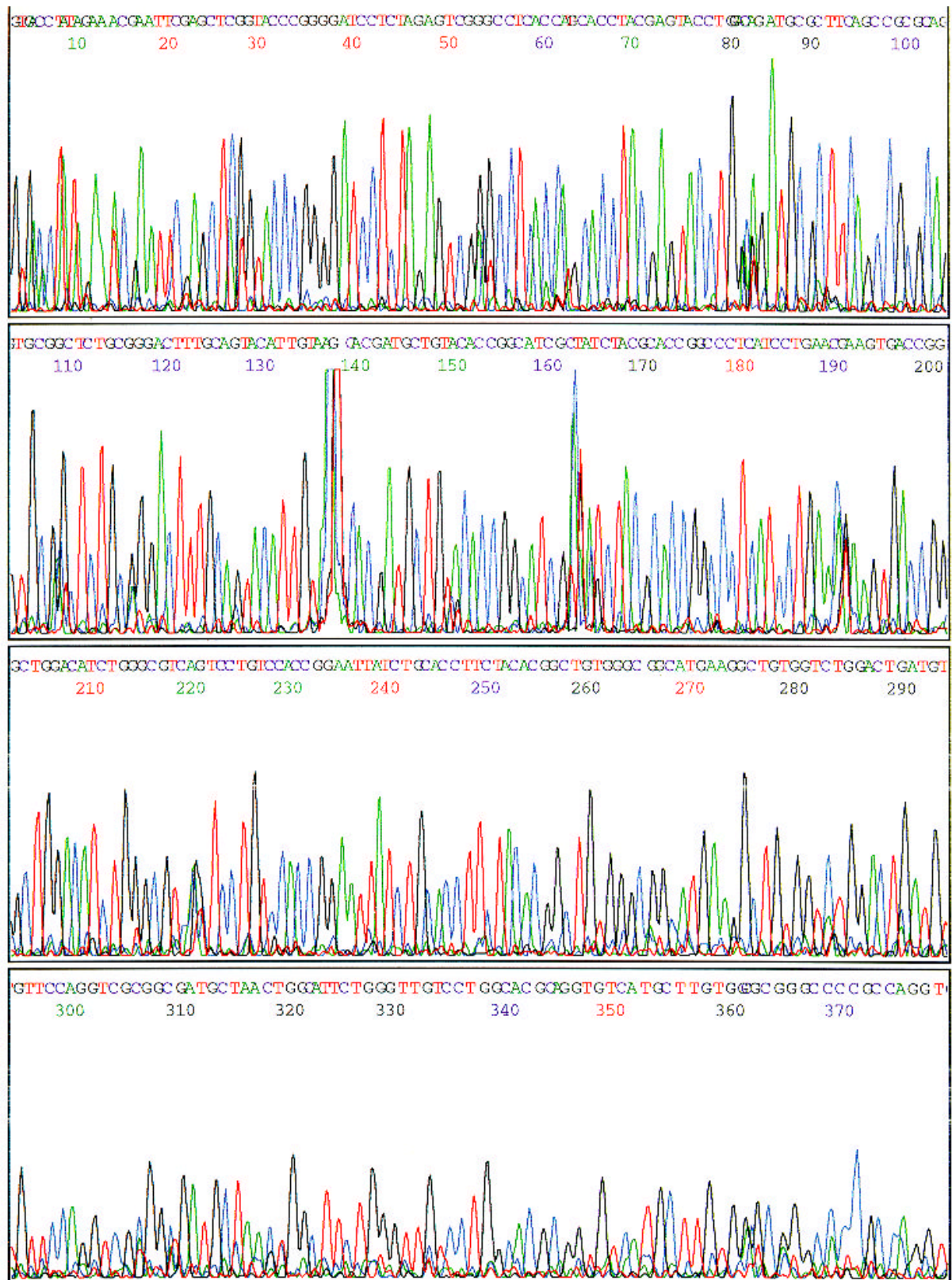
Wolff J, Chaikoff IL. 1948 Plasma inorganic iodide as homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem* **174**: 555-564.

Wolff J, Chaikoff IL, Goldberg RC, Meier JR. 1949 The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic iodide synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology* **45**: 504-513.

Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Van der Putten K, McCaughan G, Eris JM, Bishop GA. 2001 Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol* **79**: 213-221.

Zheng RQ, Abney ER, Chu CQ, Field M, Maini RN, Lamb JR, Feldmann M. 1992 Detection of *in vivo* production of tumor necrosis factor- α by human thyroid epithelial cells. *Immunology* **75**: 456-462.

Darstellung einer hNIS-Sequenz nach erfolgter Sequenzierung mit dem ABI Prism7700



Vergleich von Sequenzen einer cDNA-Datenbank für GAPDH und dem für diese Arbeit klonierten GAPDH-Fragment

GAPFRAG. SEQ	GCAGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCC	↙10	↙20	↙30	↙40	↙50
GAP-R. SEQ	GCAGGGGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCTCTGCCCCCTCTGCTGATGCCC	↗10	↗20	↗30	↗40	↗50
GAPFRAG. SEQ	CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAG	↙60	↙70	↙80	↙90	↙100
GAP-R. SEQ	CCATGTTTCGTCATGGGTGTGAACCATGAGAAGTATGACAACAGCCTCAAG	↗60	↗70	↗80	↗90	↗100
GAPFRAG. SEQ	ATCATCAGCAATGCCTCC TGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAA	↙110	↙120	↙130	↙140	↙150
GAP-R. SEQ	ATCATCAGCAATGCCTCC TGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAA	↗110	↗120	↗130	↗140	↗150
GAPFRAG. SEQ	GGTCATCCATGACAACCTT TGGTATCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCC	↙160	↙170	↙180	↙190	↙200
GAP-R. SEQ	GGTCATCCATGACAACCTT TGGTATCGTGGAAGGACTCATGACCACAGTCC	↗160	↗170	↗180	↗190	↗200
GAPFRAG. SEQ	ATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTG	↙210	↙220	↙230	↙240	↙250
GAP-R. SEQ	ATGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTG	↗210	↗220	↗230	↗240	↗250
GAPFRAG. SEQ	TGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTC CAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGG	↙260	↙270	↙280	↙290	↙300
GAP-R. SEQ	TGGCGTGATGGCCGCGGGGCTCTC CAGAACATCATCCCTGCCTCTACTGG	↗260	↗270	↗280	↗290	↗300
GAPFRAG. SEQ	CGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCA	↙310	↙320	↙330	↙340	↙350
GAP-R. SEQ	CGCTGCCAAGGCTGTGGGCAAGGTCATCCCTGAGCTGAACGGGAAGCTCA	↗310	↗320	↗330	↗340	↗350
GAPFRAG. SEQ	CTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTG	↙360	↙370	↙380	↙390	↙400
GAP-R. SEQ	CTGGCATGGCCTTCCGTGTCCCCACTGCCAACGTGTCAGTGGTGGACCTG	↗360	↗370	↗380	↗390	↗400
GAPFRAG. SEQ	ACCTGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGT	↙410	↙420	↙430	↙440	↙450
GAP-R. SEQ	ACC TGCCGTCTAGAAAAACCTGCCAAATATGATGACATCAAGAAGGTGGT	↗410	↗420	↗430	↗440	↗450
GAPFRAG. SEQ	GAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGC	↙460	↙470	↙480	↙490	↙500
GAP-R. SEQ	GAAGCAGGCGTCGGAGGGCCCCCTCAAGGGCATCCTGGGCTACACTGAGC	↗460	↗470	↗480	↗490	↗500
GAPFRAG. SEQ	ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTT	↙510	↙520	↙530	↙540	↙550
GAP-R. SEQ	ACCAGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACACCCACTCCTCCACCTTT	↗510	↗520	↗530	↗540	↗550
GAPFRAG. SEQ	GACGCTGGGGCTGGCA	↙560				
GAP-R. SEQ	GACGCTGGGGCTGGCA	↗560				

Sequenzvergleich zwischen dem klonierten hNIS-Fragment und der full length Sequenz aus einer cDNA-Bank

NNIS1R.SEQ	GGGCCTCACCAGCACCTACGAGTACCTGGAGATGCGCTTCAGCCGCGCAG	↖460	↖450	↖440	↖430	↖420
NIS.SEQ	GGGCCTCACCAGCACCTACGAGTACCTGGAGATGCGCTTCAGCCGCGCAG					
NNIS1R.SEQ	TGCGGCTCTGCGGGACTTTGCAGTACATTGTAGCCACGATGCTGTACACC	↖410	↖400	↖390	↖380	↖370
NIS.SEQ	TGCGGCTCTGCGGGACTTTGCAGTACATTGTAGCCACGATGCTGTACACC					
NNIS1R.SEQ	GGCATCGTAATCTACGCACCGGCCCTCATCCTGAACCAAGTGACCGGGCT	↖360	↖350	↖340	↖330	↖320
NIS.SEQ	GGCATCGTAATCTACGCACCGGCCCTCATCCTGAACCAAGTGACCGGGCT					
NNIS1R.SEQ	GGACATCTGGGCGTCGCTCCTGTCCACCGGAATTATCTGCACCTTCTACA	↖310	↖300	↖290	↖280	↖270
NIS.SEQ	GGACATCTGGGCGTCGCTCCTGTCCACCGGAATTATCTGCACCTTCTACA					
NNIS1R.SEQ	CGGCTGTGGGCGGCATGAAGGCTGTGGTC TGGAC TGATGTGTTCCAGGTC	↖260	↖250	↖240	↖230	↖220
NIS.SEQ	CGGCTGTGGGCGGCATGAAGGCTGTGGTC TGGAC TGATGTGTTCCAGGTC					
NNIS1R.SEQ	GTGGTGATGCTAAGTGGCTTCTGGGTTGTCTGGCAGCGGGTGT CATGCT	↖210	↖200	↖190	↖180	↖170
NIS.SEQ	GTGGTGATGCTAAGTGGCTTCTGGGTTGTCTGGCAGCGGGTGT CATGCT					
NNIS1R.SEQ	TGTGGGCGGGCCCCGCCAGGTGCTCACGC TGGCC CAGAACCACT CCCGGA	↖160	↖150	↖140	↖130	↖120
NIS.SEQ	TGTGGGCGGGCCCCGCCAGGTGCTCACGC TGGCC CAGAACCACT CCCGGA					
NNIS1R.SEQ	TCAACCTCATGGACTTTAACCCTGACCCGAGGAGCCGCTATACATTCTGG	↖110	↖100	↖90	↖80	↖70
NIS.SEQ	TCAACCTCATGGACTTTAACCCTGACCCGAGGAGCCGCTATACATTCTGG					
NNIS1R.SEQ	ACTTTTGTGGTGGGTGGCA	↖60	↖50			
NIS.SEQ	ACTTTTGTGGTGGGTGGCA					

Sequenzvergleich zwischen dem klonierten GAPDH-Fragment und dem dazugehörigen Kontrollfragment

```

      ↘70      ↘80      ↘90      ↘100     ↘110
CFGAP12R . SEQ  TGCCAGCCCCAGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTCA
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  TGCCAGCCCCAGCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGTGTCGCTGTTGAAGTCA
                ↗560 ↗550 ↗540 ↗530 ↗520
      ↘120     ↘130     ↘140     ↘150     ↘160
CFGAP12R . SEQ  GAGGAGACCACCTGGTGC TCAGTGTAGCC CAGGATGCCCTTGAGGGGGCC
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  GAGGAGACCACCTGGTGC TCAGTGTAGCC CAGGATGCCCTTGAGGGGGCC
                ↗510 ↗500 ↗490 ↗480 ↗470
      ↘170     ↘180     ↘190     ↘200     ↘210
CFGAP12R . SEQ  CTCCGACGCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTTCATCATATTTGGCAGGTT
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  CTCCGACGCCTGCTTCACCACCTTCTTGATGTTCATCATATTTGGCAGGTT
                ↗460 ↗450 ↗440 ↗430 ↗420
      ↘220     ↘230     ↘240     ↘250     ↘260
CFGAP12R . SEQ  TTTCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACCACTGACACGTTGGCAGTGGGGACA
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  TTTCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACCACTGACACGTTGGCAGTGGGGACA
                ↗410 ↗400 ↗390 ↗380 ↗370
      ↘270     ↘280     ↘290     ↘300     ↘310
CFGAP12R . SEQ  CGGAAGGCCATGCCAGTGAGCTTCCGTTTCAGCTCAGGGATGACCTTGCC
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  CGGAAGGCCATGCCAGTGAGCTTCCGTTTCAGCTCAGGGATGACCTTGCC
                ↗360 ↗350 ↗340 ↗330 ↗320
      ↘320     ↘330     ↘340     ↘350     ↘360
CFGAP12R . SEQ  CACAGCCTTGGCAGCGCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTCTGGAGAGCCC
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  CACAGCCTTGGCAGCGCCAGTAGAGGCAGGGATGATGTTCTGGAGAGCCC
                ↗310 ↗300 ↗290 ↗280 ↗270
      ↘370     ↘380     ↘390     ↘400
CFGAP12R . SEQ  CGCGGCCATCACGCCACAGTTTCCCGAGGGGCCATCC-----
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  CGCGGCCATCACGCCACAGTTTCCCGAGGGGCCATCCACAGTC TTCTGG
                ↗260 ↗250 ↗240 ↗230 ↗220

CFGAP12R . SEQ  -----
GAPFRAG . SEQ  GTGGCAGTGATGGCATGGACTGTGGTCATGAGTCTTCCACGATACCAA
                ↗210 ↗200 ↗190 ↗180 ↗170
      ↘410     ↘420
CFGAP12R . SEQ  -----TAAGCAGTTGGTGGTGCAGG
                |||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  GTTGTTCATGGATGACCTTGGCCAGGGGTGCTAAGCAGTTGGTGGTGCAGG
                ↗160 ↗150 ↗140 ↗130 ↗120
      ↘430     ↘440     ↘450     ↘460     ↘470
CFGAP12R . SEQ  AGGCATTGCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTCATACTTCTCATGGTTTACA
                |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  AGGCATTGCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTCATACTTCTCATGGTTTACA
                ↗110 ↗100 ↗90 ↗80 ↗70

      ↘480     ↘490     ↘500
CFGAP12R . SEQ  CCCATGACGAACATGGGGGCATCAGCA
                |||||||||||||||||||
GAPFRAG . SEQ  CCCATGACGAACATGGGGGCATCAGCA
                ↗60 ↗50 ↗40

```

Sequenzvergleich zwischen dem hNIS-Fragment und dem für die kompetitive RT-PCR notwendigem Kontrollfragment

CFN1I5FW.SEQ	↙120	↙130	↙140	↙150	↙160
NIS.SEQ	↗410	↗400	↗390	↗380	↗370
CFN1I5FW.SEQ	↙170	↙180	↙190	↙200	↙210
NIS.SEQ	↗360	↗350	↗340	↗330	↗320
CFN1I5FW.SEQ	↙220	↙230	↙240		
NIS.SEQ	↗310	↗300	↗290	↗280	↗270
CFN1I5FW.SEQ					
NIS.SEQ	↗260	↗250	↗240	↗230	↗220
CFN1I5FW.SEQ					
NIS.SEQ	↗210	↗200	↗190	↗180	↗170
CFN1I5FW.SEQ	↙250	↙260	↙270	↙280	↙290
NIS.SEQ	↗160	↗150	↗140	↗130	↗120
CFN1I5FW.SEQ	↙300	↙310	↙320	↙330	↙340
NIS.SEQ	↗110	↗100	↗90	↗80	↗70
CFN1I5FW.SEQ	↙350	↙360	↙370	↙380	↙390
NIS.SEQ	↗60	↗50	↗40	↗30	↗20
CFN1I5FW.SEQ	↙400	↙410			
NIS.SEQ	↗10				

Danksagung

Allen voran danke ich Herrn Prof. Dr. Werner Scherbaum für die freundliche Aufnahme am Deutschen Diabetes Forschungsinstitut in Düsseldorf und für die Bereitstellung des Themas.

Ganz herzlich möchte ich Herrn Prof. Dr. Fritz Kreuzaler für die Übernahme des Koreferats danken.

Herrn PD Dr. Jochen Seissler danke ich für die sorgfältige und intensive Betreuung der Arbeit.

Herrn PD Dr. Joachim Feldkamp danke ich für die Anstellung als wissenschaftliche Angestellte während der Niederschrift der Arbeit.

Ein besonderer Dank geht an die technischen Angestellten

Frau Ulrike Wohlrab

Frau Cordula Wünsche

Frau Melanie Klucken

die zur Durchführbarkeit der Versuche beigetragen haben und für ein entspanntes und ausgeglichenes Arbeitsverhältnis gesorgt haben.

Des Weiteren bedanke ich mich recht herzlich bei Frau PD Dr. Gabriele Aust für die sehr lehrreiche Zeit in Leipzig, die einen wesentlichen Teil meiner Arbeit ausmacht.

Meinen Eltern danke ich für die moralische und finanzielle Unterstützung, ohne die mir das Studium der Biologie nicht möglich gewesen wäre .

Nicht vergessen möchte ich meine beiden Nichten Paula und Antonia, die für die nötige Ablenkung und Zerstreuung sorgten.

Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Lebensgefährten Hans-Dieter Becker für die moralische Unterstützung während der Arbeit und vielem mehr bedanken. Ohne Ihn wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Sandra Katharina Wagner

19.09.1971

in Langerwehe geboren

ledig

Schulische Ausbildung

1978 – 1982

Kath. Grundschule in Langerwehe

1982 – 1991

Städt. Rurtalgymnasium in Düren

Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

10/91 – 12/97

Studium der Biologie an der RWTH Aachen

Diplomprüfung in Mikrobiologie, Molekularbiologie und Biochemie

Diplomarbeit "Konkurrenz von Kohlenwasserstoff-verwertenden

Bakterien im Mikrokosmos" am Lehrstuhl für Angewandte Mikrobiologie,

Prof. U. Kliner, Abschluss des Studiums als Diplom-Biologin

Berufliche Tätigkeiten

01/98 – 12/00

Wissenschaftliche Angestellte am Deutschen Diabetes Forschungsinstitut in
Düsseldorf

seit 01/01

Wissenschaftliche Angestellte in der MNR-Klinik, Abt. für
Endokrinologie der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Köln, im Februar 2002