

Aus dem Zentrum für operative Medizin, Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie

Direktor: Prof. Dr. M. Rothmund

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

**In vitro VEGF-Sekretion von malignen  
Schilddrüsenzelllinien:  
Einfluss von Wachstumsfaktoren und Untersuchung der  
Postrezeptorsignaltransduktion.**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von:

Vera Carina Geyer, geb. Scharrenbach aus Andernach  
Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg  
am 08.05.2008

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan:	Prof. Dr. M. Rothmund
Referent:	Prof. Dr. A. Zielke
Korreferent:	Prof. Dr. H. P. Elsässer
2. Korreferent:	Prof. Dr. R. Moll

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Zielsetzung .....	1
1.1 Einleitung .....	1
1.2 Zielsetzung.....	10
2. Material und Methoden.....	11
2.1 Zelllinien .....	11
2.1.1 XTC .....	11
2.1.2 HTC+/HTC- .....	12
2.2 Kultivierung .....	12
2.3 Stimulationsversuche.....	13
2.3.1 Vorversuch .....	13
2.3.2 Suspensionsherstellung der Wachstumsfaktoren und Effektoren der Signaltransduktion ...	14
2.3.3 Stimulationsversuche mit Wachstumsfaktoren .....	16
2.3.4 Versuchsaufbau mit Effektoren der Signaltransduktion .....	17
2.4 Quantitative Bestimmung von VEGF .....	18
2.5 Auswertung .....	21
2.6 Chemikalien und Verbrauchsmittel .....	22
2.7 Wachstumsfaktoren .....	23
2.8 Signaltransduktionseffektoren .....	23
3. Ergebnisse.....	25
3.1 Stimulation mit Wachstumsfaktoren .....	25
3.1.1 XTC .....	26
3.1.2 HTC+ .....	27
3.1.3 HTC- .....	28
3.1.4 Gegenüberstellung von HTC+ und HTC- .....	29
3.2 Signaltransduktion .....	30
3.2.1 XTC .....	31
3.2.2 HTC+ .....	32
3.2.3 HTC- .....	34
3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und tabellarische Darstellung .....	36
3.3.1 Wachstumsfaktoren.....	36
3.3.2 Signaltransduktion.....	37
4. Diskussion .....	38
5. Zusammenfassung .....	44
6. Literatur.....	46
7. Anhang .....	49
Originalmesswerte .....	49
Verzeichnis meiner akademischen Lehrer in Marburg .....	55
Danksagungen.....	56

## **1. Einleitung und Zielsetzung**

### **1.1 Einleitung**

Malignome der Schilddrüse sind die häufigsten endokrinen Neoplasien mit einer Inzidenz von 2/100000 Erkrankungen jährlich (Hoffmann et al., 1999). Trotzdem machen sie sowohl bei der Frau als auch beim Mann nur maximal 1% aller malignen Tumoren aus. Ungefähr 90% der malignen Schilddrüsentumore sind differenzierte Tumoren (Shaha, 2004), die ihrerseits noch einmal in papilläre und follikuläre Karzinome unterteilt werden. Während die papillären Karzinome vorwiegend in Lymphknoten metastasieren, finden sich Metastasen follikulärer Karzinome häufig in Lunge und Knochen.

Die Prognose bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist größtenteils gut. Die 10-Jahres-Überlebensrate wird für Patienten in den USA mit 93% bei papillären, 85% bei follikulären und 14% für undifferenzierte/anaplastische Karzinome beschrieben (Hundahl et al., 1998). Die Prognose ist abhängig vom Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung und individuellen Risikofaktoren (Shaha, 2004). Die standardisierte Therapie besteht aus der chirurgischen Schilddrüsenentfernung (Thyreoidektomie), der Lymphknotenextirpation und einer adjuvanten Radiojodtherapie. Letztere basiert auf dem Prinzip, dass alle jodverstoffwechselnden Zellen, also auch die differenzierten Schilddrüsentumorzellen,  $^{131}\text{I}$  aufnehmen und dann durch die Strahlung zunächst am Zellwachstum gehemmt und schließlich zerstört werden. Anschließend folgt eine hochdosierte lebenslange Substitution mit  $\text{T}_4$ , um die endogene TSH Produktion und somit gegebenenfalls die Stimulation von verbliebenen Metastasen zu verhindern. Trotz dieser Therapiemöglichkeiten beträgt die Mortalitätsrate für die ca. 10% Patienten in der Hochrisikogruppe (Patienten älter als 45 Jahre, organüberschreitendes Tumorwachstum, schlechte Differenzierung der Tumoren) bei einer retrospektiven Studie von Shaha an 1038 Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ca. 46%, so dass neue Therapieansätze wünschenswert sind.

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom ist die Hauptvariante des undifferenzierten Schilddrüsenkarzinoms. Daneben zählt zu dieser Gruppe noch das bereits sehr viel

selteneres Plattenepithelkarzinom sowie noch seltener Sarkome oder Metastasen anderer Tumoren. Die undifferenzierten Karzinome nehmen nicht am Jodumsatz teil und entgehen somit einer Radiojodtherapie. Verglichen mit den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen haben anaplastische Schilddrüsenkarzinome eine sehr schlechte Prognose mit einer mittleren Lebenserwartung von im Median 6 Monaten nach Diagnosestellung. Sie sind meist inoperabel, da sie bereits bei Diagnosestellung in Nachbarstrukturen, wie zum Beispiel die Luftröhre, infiltriert haben. Die externe Radiatio oder eine zytotoxische Therapie mit Doxorubicin, ggf. kombiniert mit Cisplatin, sind als palliative Therapie möglich.

Die kritische TumorgroÙe, bis zu der sich die Tumorzellen durch Diffusion aus der Umgebung ernähren können, beträgt etwa 2mm im Durchmesser. Um weiter an Größe zunehmen zu können, benötigt der Tumor eigene BlutgefäÙe, die ihm eine ausreichende Versorgung an Nährstoffen und Entsorgung von Abfallprodukten gewährleisten können (Folkman, 1971).

Physiologische/normale GefäÙneubildung (Angiogenese) findet beim Menschen im Rahmen der embryonalen Entwicklung, des Plazentawachstums und der Wundheilung statt. Angiogenese ist aber auch an der Entstehung verschiedener Krankheiten, wie zum Beispiel der Proliferativen Retinopathie, der rheumatischen Arthritis und Tumorstadium beteiligt (Ferrara, 2000). Bereits 1971 wurde vermutet, dass Tumore einen löslichen Botenstoff freisetzen, der die in der Nähe liegenden ruhenden Endothelzellen aktiviert, ein GefäÙnetz zu bilden, das ca. 1mm pro Tag wächst (Folkman, 1971).

Zahlreiche Studien lassen darauf schließen, dass VEGF (Vascular endothelial growth factor) einer der wichtigsten proangiogenen Faktoren ist. VEGF ist ein 34 – 46 kDa schweres hitzestabiles Glykoprotein, das sowohl in vitro als auch in vivo zu einer Vermehrung der Endothelzellen führt und die GefäÙdurchlässigkeit steigert. Es gibt, soweit bekannt, beim Menschen 5 verschiedene Varianten: VEGF-A, -B, -C, -D und -E, die alle an einem Genort verschlüsselt sind. VEGF-A ist die am besten charakterisierte Variante, die in mindestens 5 verschiedenen Isoformen vorkommt: VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, VEGF-A<sub>165</sub>, VEGF-A<sub>189</sub> und VEGF-A<sub>206</sub>. Diese unterscheiden

sich hauptsächlich in ihrem Bindungsverhalten zu Heparin, das wiederum vermutlich ihre Diffusionsfähigkeit in den extrazellulären Raum beeinflusst (Breier, 2000).

VEGF ist auch als VPF (*Vascular permeability factor*) bekannt, basierend auf dessen Fähigkeit, die Gefäßwanddurchlässigkeit zu steigern. Dvorak vermutete 1986, dass dies ein entscheidender Schritt für die Angiogeneese im Zusammenhang mit Tumoren und Wundheilung ist (Dvorak, 1986). VEGF konnte 1989 sequenziert werden und zeigte hochgradige Ähnlichkeiten mit der Familie der PDGF (*platelet derived growth factor*)-Wachstumsfaktoren (Leung et al., 1989; Keck et al., 1989). Mit Hilfe von Knock-out Mäusen, die genetisch so verändert waren, dass sie kein VEGF mehr bilden konnten, wurde die zentrale Rolle von VEGF in der fetalen und plazentaren Angiogeneese gezeigt. Diese Mäuse zeigten alle am 11.

Schwangerschaftstag einen letalen Ausgang und wiesen schwere kardiovaskuläre Defekte sowie eine gestörte Entwicklung des Dottersackes und der Plazenta auf (Reynolds et al., 2001).

Die Bedeutung von VEGF in der Angiogeneese der Tumoren konnte 1993 verdeutlicht werden. Im Jahr zuvor war es gelungen, monoklonale Antikörper gegen VEGF zu synthetisieren. Diese zeigten in Nacktmäusen einen deutlich hemmenden Effekt auf das Wachstum von drei verschiedenen Tumorarten: Leiomyosarkom, Glioblastoma multiforme und Rhabdomyosarkom. Die Wachstumsverzögerung lag in diesen Fällen zwischen 70% und 95% (Kim et al., 1993).

Auch Schilddrüsentumore gehören zu den Tumoren, die VEGF überexprimieren und deren Angiogeneese vermutlich entscheidend von VEGF beeinflusst wird. Soh et al. verglichen 1997 verschiedene Schilddrüsentumorzelllinien mit normalem Schilddrüsenengewebe. Dabei konnte gezeigt werden, dass in vitro sowohl der VEGF-mRNA Spiegel als auch das sezernierte VEGF bei den Tumorzellen höher war als beim Normalgewebe. Bereits 1995 vermuteten Viglietto et al., dass die erhöhten VEGF Spiegel in Schilddrüsentumoren positiv mit der Aggressivität der Tumoren korrelieren.

Einen direkten Zusammenhang von VEGF und dem Wachstum von Schilddrüsentumoren konnten Soh et al. 2000 beweisen. Um die Funktion von VEGF aufzuheben, wurden in diesem in vivo Experiment VEGF-neutralisierende

monoklonale Antikörper zweimal wöchentlich den FTC-133-tumorzelltragenden Mäusen gespritzt. Während die Tumoren der Kontrollgruppe an Größe zunahmen, hemmte der VEGF-neutralisierende Antikörper das Tumorwachstum um mehr als 98% (Soh et al., 2000).

Das Wachstum und die biologische Aktivität von Schilddrüsenzellen werden durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren beeinflusst. Überexpression von Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von bösartigen Tumoren. Nun ergibt sich die Frage, ob diese Wachstumsfaktoren auch die VEGF-Produktion der Schilddrüsentumorzellen beeinflussen und somit die Angiogenese der Tumore fördern.

Der wichtigste Wachstumsfaktor und Hauptregulator der normalen Schilddrüsenzelle ist das in der Hypophyse sezernierte Thyreoideastimulierende Hormon (TSH). Es steuert die Jodaufnahme in die Zelle, dessen Verarbeitung und somit die funktionelle Aktivität. Es ist bekannt, dass die Suppression von TSH das Risiko eines Schilddrüsentumorrezidives vermindert, die Tumorprogression herabsetzt und das Langzeitüberleben der Patienten verbessert (Clark et al., 1981). Hill et al. beschrieben 1974 unter TSH-Suppression in 13% der Patienten mit einem papillären und in 33% der Patienten mit einem follikulären Schilddrüsentumor eine signifikante Tumorregression. Eine andere Studie zeigte, dass Patienten mit einem papillären Schilddrüsenkarzinom, die mit einer TSH-Suppression behandelt wurden, eine Rezidivrate von weniger als 20% hatten. Die Vergleichsgruppe ohne TSH-Suppression hingegen hatte eine Rezidivrate von mehr als 40% (Mazzaferri et al., 1977).

Der Einfluss von TSH auf das Wachstum von Schilddrüsentumoren wurde näher untersucht. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass TSH sowohl die Proliferation von malignen Schilddrüsenzellen als auch die Invasion durch eine künstliche Basalmembran fördert (Duh et al., 1995). Zudem konnte gezeigt werden, dass TSH bei malignen Schilddrüsenzellen, im Gegensatz zu benignen, die VEGF-Sekretion steigert (Soh et al., 1996).

Der Einfluss von Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) auf Schilddrüsenzellen ist ebenfalls recht gut untersucht. EGF bindet an einen eigenen Rezeptor, eine Tyrosin Kinase, die ihrerseits wieder das Proteinkinase C (PKC) System stimuliert (Duh et al.,

1995). So besteht ein zum Teil gemeinsamer Signaltransduktionsweg von TSH und EGF. Auch wenn in einer immunhistochemischen Färbung keine Unterschiede in der Verteilung von EGF und seinem Rezeptor zwischen benignem und malignem Schilddrüsengewebe gesehen wurde, so konnte doch gezeigt werden, dass differenzierte Tumore der Schilddrüse mehr EGF binden als normale Schilddrüsenzellen (van der Laan et al., 1995; Duh et al., 1995). Bereits 1983 wurde der Einfluss von EGF auf Schilddrüsenzellen vom Schwein in vitro untersucht. Dort zeigte sich eine Stimulation des Zellwachstums bei einer gleichzeitigen Hemmung differenzierter Zellfunktionen, wie Jodaufnahme und Verarbeitung. Auch bei Costimulation von TSH und EGF blieb die Jodverarbeitung gehemmt (Westermarck et al., 1983). Hoelting zeigte, dass EGF Wachstum und Invasion in menschlichen Schilddrüsentumorzellen in vitro und in vivo verstärkt (Hoelting et al., 1994).

Bis zu ungefähr einem Drittel in seinem Aminosäureaufbau mit EGF identisch ist TGF- $\alpha$  (Transformierender Wachstumsfaktor- $\alpha$ ), das ebenfalls an den EGF-Rezeptor bindet (Hoelting et al., 1995, Haugen et al., 1993). Es lässt bei follikulären Schilddrüsentumorzellen einen ähnlichen Effekt beobachten wie EGF (Hoelting et al., 1995). Auch lassen sich bei malignen Zellen höhere Spiegel an TGF- $\alpha$  nachweisen als bei Normalgewebe.

Die Expression des EGF-Rezeptors sowie von EGF und TGF- $\alpha$  konnten in immunhistochemischen Untersuchungen in Schilddrüsenkarzinomen als prognostisch schlechter Faktor und in eher aggressiven Formen der Karzinome beobachtet werden (Akslen et al., 1995, Gorgoulis et al., 1992).

Insulinähnlicher Wachstumsfaktor-1 (IGF-1) ist ein wichtiger Kofaktor bei der Proliferation und der differenzierten Funktion der normalen Schilddrüsenzelle (Zielke, 1997). Es wird von benignen und malignen Schilddrüsenzellen gebildet und entfaltet seine Wirkung auto- und parakrin (Duh et al., 1995).

Ein weiterer Wachstumsfaktor, der von Schilddrüsentumorzellen produziert wird, ist der basische Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF). Er hat einen starken gefäßneubildenden Effekt (Duh et al., 1995).



Auch eine Überexpression von Hepatozytenwachstumsfaktor (HGF) und dessen Rezeptor konnte in Schilddrüsentumorzellen nachgewiesen werden und HGF scheint dort eine Wachstumsstimulation und einen Schutz vor dem programmierten Zelltod (Apoptose) zu verursachen (Ruco et al., 2001). Zudem konnte gezeigt werden, dass HGF in papillären Schilddrüsentumorzellen eine zeitlich proportionale Zunahme der VEGF-Sekretion bewirkt (Scarpino et al., 2003).

Plazentarer Wachstumsfaktor (PIGF) wird sowohl in Schilddrüsen- als auch in Keimzelltumoren produziert. PIGF ist ein eng strukturverwandter Wachstumsfaktor zu VEGF, der ebenfalls Neoangiogenese einleiten kann (Ziche et al., 1997).

Bei einer anaplastischen Schilddrüsenzelllinie konnten die beiden Varianten des PDGF-Rezeptors nachgewiesen werden. Wurden sie mit PDGF (*platelet derived growth factor*) stimuliert, so resultierte ein Wachstum der Zellen daraus (Heldin et al., 1991).

Transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wird als negativer Regulator für das Wachstum von Schilddrüsenzellen angesehen. Es inhibiert den wachstumsstimulierenden Effekt von TSH, EGF und IGF-1 bei benignen Zellen, Schilddrüsenadenomen und Basedowzellen (Grubeck-Loebenstein et al., 1989).

Das TSH einen stimulierenden Effekt auf die VEGF Sekretion von Schilddrüsenkarzinomzellen hat konnte im Prinzip bereits gezeigt werden (Soh et al., 1996). Unklar war hier bislang die Postrezeptorsignaltransduktion des TSH-Rezeptors.

Das von TSH ausgelöste Signal kann dabei grundsätzlich zwei verschiedene Hauptwege beschreiten. Entweder über eine Adenylatcyclase (AC) zur Proteinkinase A (PKA) oder über eine Phospholipase C zur Proteinkinase C (PKC).

Der TSH-Rezeptor ist ein an G-Proteine gekoppelter membranständiger Rezeptor mit 7 Transmembrandomänen. Während das N-terminale Ende extrazellulär und das C-terminale Ende intrazellulär gelegen ist, scheint die transmembranöse Region besonders wichtig für die Signaltransduktion über G-Proteine zu sein (Führer et al., 1999).

Im ersten Fall verändert der TSH-Rezeptor nach Bindung von TSH seine Struktur dergestalt, dass das G-Protein Gs aktiviert wird. Dadurch wird die  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins abgespalten und stimuliert die AC. Die katalytische Einheit der AC wiederum verwandelt ATP in cAMP, welches dann die PKA stimuliert (Clark OH et al., 1997). Im anderen Fall wird nach TSH Bindung das G-Protein Gp aktiviert. Wieder spaltet sich die entsprechende  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit ab und aktiviert in diesem Fall die PLC- $\beta$ . Diese katalysiert die Umwandlung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP3) und 1,2-diacylglycerol (DG). Während IP3 zunächst den intrazellulären Calciumspiegel erhöht, aktiviert DG zusammen mit dem erhöhten Calciumspiegel die PKC (Duh et al., 1995).

Experimentelle Agonisten und Antagonisten des TSH-Rezeptors und der daran anschließenden Signaltransduktionskaskade sind bekannt und können genutzt werden, um Hinweise auf den beschrifteten Signaltransduktionsweg nach der Stimulierung zu erlangen.

Zu den Agonisten des Signaltransduktionsweg via PKA gehört Choleratoxin. Es aktiviert selektiv Gs. 8-Br-cAMP entfaltet seine Wirkung analog zu cAMP und Forskolin aktiviert direkt die katalytische Einheit von PKA. ddA (2'5'-dideoxyadenosin) dagegen verhält sich antagonistisch zu cAMP und ist somit als Antagonist des PKA-Weges zu betrachten. Als Agonist zum PKC-Weg kann TPA (12-O-tetradecanylphorbol-13-acetat) eingesetzt werden, welches sich analog zu DAG verhält. Stauroporin wirkt direkt antagonistisch zu PKC.

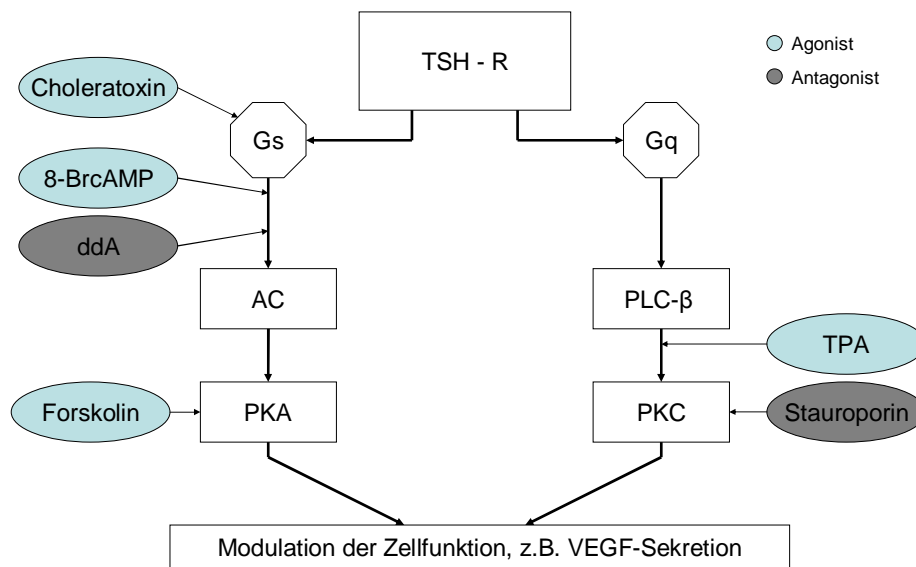


Abbildung 1: Schematische Darstellung der zwei Signaltransduktionswege des TSH-Rezeptors: links über G-Protein Gs zur Adenylatcyclase und zu PKA; rechts über G-Protein Gq zur Phospholipase C- $\beta$  und zu PKC. Ferner sind die Wirkungsorte der experimentellen Agonisten und Antagonisten schematisch dargestellt.

Von den beiden bekannten Signaltransduktionswegen des TSH-Rezeptors werden die verschiedenen biologischen Wirkungen des TSH mit unterschiedlichen Schwerpunkten vermittelt. So verläuft die TSH vermittelte Signaltransduktion des Jodstoffwechsels zum Beispiel über die PKA, während die Vermittlung der Zellproliferation von benignen und malignen Schilddrüsenzellen *in vitro* hauptsächlich über die PKC verläuft (Hoelting et al., 1993; Goretzki et al., 1986).

Der durch TSH vermittelte Effekt auf die VEGF-Sekretion von Schilddrüsenkarzinomzellen ist bislang noch nicht untersucht worden.

Es ist jedoch wichtig das proangiogene Zusammenspiel von TSH und VEGF in Schilddrüsenkarzinomzellen näher zu kennen. So wird zum Beispiel nach erfolgter operativer Therapie eines gut differenzierten Schilddrüsentumors eine Langzeit TSH-Suppression bei Patienten durchgeführt, um das Wachstum und die Progression des Tumors zu minimieren. Hierzu gibt es jedoch keine prospektiv, randomisierten Studien, die diesen Effekt näher untersuchen. Lediglich retrospektiv muss man einen positiven Effekt der TSH-Suppression postulieren (McGriff NJ et al., 2002). Da die TSH-Suppression jedoch auch nicht ohne Nebenwirkungen ist und

man zum Beispiel den Verdacht auf einen prothrombotischen Effekt (McDonald KH et al., 2004) und bei postmenopausalen Frauen eine Minderung der Knochendichte nach einer mindestens drei Jahre lang erfolgten TSH-Suppression beobachten konnte (Chen CH et al., 2004), sollte man diese Therapie weiter hinterfragen und genauer untersuchen.

Zudem ist es wichtig zu wissen, über welchen Signaltransduktionsweg des TSH-Rezeptors die proangiogenen Informationen vermittelt werden, um eine spezifischere Therapie zu finden und somit eventuell die TSH-Suppression in der Zukunft unterlassen zu können.

Welche Bedeutung dem TSH-Rezeptor und den hierüber vermittelten Informationen bezüglich der VEGF-Sekretion zukommt ist bislang noch nicht untersucht worden und soll mit dieser Arbeit beantwortet werden. Da verschiedene Schilddrüsentumorzellen jedoch mit zunehmender Entdifferenzierung keinen TSH-Rezeptor mehr exprimieren, stellt sich hier die Frage nach möglicherweise alternativen Wegen zur Stimulation der VEGF-Sekretion. Hierbei bietet sich der Vergleich einer TSH-Rezeptor-positiven und -negativen Zelllinie an. Diese Möglichkeit besteht in der follikulären Schilddrüsenzelllinie HTC -, die stabil mit einem TSH-Rezeptor transfiziert wurde (Derwahl et al., 1993).

## 1.2 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der VEGF-Sekretion von drei verschiedenen malignen Schilddrüsenzelllinien in vitro.

Zum einen soll der Einfluss der Wachstumsfaktoren TSH, EGF, TGF- $\alpha$ , IGF-1, bFGF, HGF, PIGF, PDGF und TGF- $\beta$  auf die VEGF-Sekretion beobachtet werden. Hierbei soll der potenteste oder das Spektrum der potentesten Wachstumsfaktoren zur Stimulation der VEGF-Sekretion herausgearbeitet werden. Besondere Beachtung wird hierbei dem Einfluss eines funktionellen TSH-Rezeptors auf die VEGF-Sekretion von TSH-Rezeptor-positiven und -negativen Zelllinien zukommen.

Zum anderen erfolgt eine Analyse der TSH-gesteuerten VEGF-Sekretion durch Beeinflussung verschiedener Punkte der Signaltransduktionskaskade des TSH-Rezeptors mit stimulierenden und inhibierenden Substanzen.

Abschließend wird die Koinkubation der Zelllinien mit TSH und den Mediatoren der Signaltransduktionskaskade erfolgen, um den oben ermittelten Effekt bestätigen oder widerlegen zu können. Hierbei stellt sich insbesondere die Frage, ob ein spezieller Weg der Signaltransduktion zur Vermittlung der proangiogenen Information bevorzugt wird und selektiv beeinflusst werden kann, um hieraus neue therapeutische Ansätze zur Behandlung der gut differenzierten Schilddrüsenkarzinome zu finden.

## 2. Material und Methoden

Drei verschiedene maligne Schilddrüsenzelllinien (XTC, HTC+, HTC-) wurden in vitro mit Wachstumsfaktoren (TSH, EGF, TGF- $\alpha$ , IGF-1, bFGF, HGF, PlGF, TGF- $\beta$ ) stimuliert und ihre VEGF-Sekretion mittels Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) aus dem Zellüberstand ermittelt.

Ferner wurde die Postrezeptorsignaltransduktion des TSH-Rezeptors unter Stimulation und unter Inhibition mit Hilfe des VEGF-ELISA untersucht.

### 2.1 Zelllinien

Die drei verwendeten Zelllinien entstammten der Arbeitsgruppen-eigenen Zellbank.

#### 2.1.1 XTC

XTC ist eine gut differenzierte Schilddrüsenzelllinie, die aus einer Metastase eines Hürthlezzell-Schilddrüsenkarzinoms gewonnen wurde (Zielke et al., 1998).

Hürthlezzell-Schilddrüsenkarzinome sind eine Variante des follikulären Schilddrüsenkarzinoms. Es wird vermutet, dass diese Variante des follikulären Schilddrüsenkarzinoms eher zur Transformation zu undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen neigt (McDonald et al., 1991).

Es konnte gezeigt werden, dass die XTC-Zelllinie sowohl in vitro als auch in einem in vivo Modell mit Nacktmäusen humanes Thyreoglobulin sezerniert. Ferner konnte nach einer Stimulation von 10mU/ml TSH in vitro über 4 Stunden ein Anstieg des intrazellulären cAMP beobachtet werden. Auch die Fähigkeit zur Migration und Invasion in eine Basalmembran in vitro und die Metastasierung in vivo (in Lymphknoten, Lunge und Leber) konnten gezeigt werden (Zielke et al., 1998).

Verglichen mit normalen Schilddrüsenzellen, einer follikulären (FTC-133), einer papillären (TPC-1) und einer medullären (MTC-1.1) Schilddrüsenkarzinomzelllinie, die alle einen vergleichbar hohen basalen, also unstimulierten, VEGF-Spiegel sezernierten, ließ die XTC Zelllinie einen noch höheren VEGF-Spiegel beobachten (Soh et al., 1996).

In einem weiteren Experiment mit der XTC-Zelllinie zeigte sich ein deutlich stärkeres Ansprechen der Zellen in Bezug auf Thyreoglobulinsekretion, Adhäsion, Migration und Invasion auf TSH als auf EGF (Zielke et al., 1999).

### 2.1.2 HTC+/HTC-

1993 gelang es, eine menschliche folliculäre Schilddrüsenzelllinie (HTC-), die keinen eigenen Rezeptor für TSH besaß, mit einem solchen Rezeptor stabil zu transfizieren. In diesen transfizierten Zellen (HTC+) konnte sowohl mRNA des Rezeptors nachgewiesen als auch der TSH-Rezeptor selbst identifiziert werden. Ferner zeigten diese Zellen nach Stimulation mit TSH einen dosisabhängigen Anstieg der intrazellulären cAMP Konzentration mit einem Maximum bei 10mU/ml TSH. Verglichen mit dem hohen Differenzierungsgrad der XTC Zelllinie zeigen die HTC+/- Zellen zwar auch Thyreoglobulin-mRNA, jedoch keine Immunreaktivität für Thyreoglobulin. Auch eine Speicherfunktion für Jod konnte nach Stimulation mit TSH nicht nachgewiesen werden (Derwahl et al., 1993).

## 2.2 Kultivierung

Die Tumorzellen, die als einschichtiger Zellrasen den Boden der 250ml großen Gewebekulturflaschen bedeckten, wurden bei 37°C und 5% P<sub>CO2</sub> kultiviert. Die Zellen wurden in DMEM/HAM'S F12 (1:1) Medium ohne L-Glutamin (*full growth medium* = FGM) gehalten, das mit 10% fetalem Kälber Serum (FCS) und einer 1:100 verdünnten Lösung aus Penicillin und Streptomycin (10000I.E. und 10000µg/ml) versetzt war.

Bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80% erfolgte das Passagieren der Zellen. Nach der Aspiration des FGM wurde hierzu zunächst ein Waschschriff mit PBS w. Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4ml einer 0,25% Lösung aus Trypsin/EDTA abgelöst, in 20ml Wachstumsmedium aufgenommen, in 50ml große Polypropylen-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des liquiden Anteils wurde das Pellet in 4ml FGM resuspendiert und je 2ml in 250ml große Kulturflaschen gegeben, welche abschließend wieder mit 25ml FGM aufgefüllt wurden.

## 2.3 Stimulationsversuche

### 2.3.1 Vorversuch

Um optimale Bedingungen für die eigentlichen Stimulationsversuche zu ermitteln, wurden zunächst in einem Pilotversuch die geeignete Zellzahl und Inkubationsdauer mit den Wachstumsfaktoren bestimmt, um in den optimalen Sensitivitätsbereich des angewendeten Messverfahrens zu gelangen. Diese Versuche wurden mit XTC-Zellen unter der Stimulation von TSH durchgeführt, da hier bereits bewiesen werden konnte, dass dies zu einer signifikanten Erhöhung von VEGF führt (Soh et al., 1996).

Die Zellen werden dazu nach den unten (2.3.2) beschriebenen Bedingungen in unterschiedlichen Zellkonzentrationen und Inkubationszeiten mit 10mU/ml TSH stimuliert (vgl. Tabelle 2.3.1).

Tabelle 2.3.1 Versuchsbedingungen im Vorversuch zur Ermittlung der optimalen Zellzahl und Inkubationsdauer

Zellen/Kavität	Messzeitpunkt	Messzeitpunkt	Messzeitpunkt
1x10 <sup>5</sup> Zellen	6 Stunden	12 Stunden	24 Stunden
1x10 <sup>6</sup> Zellen	6 Stunden	12 Stunden	24 Stunden

### Ergebnis:

Da der sensitivste Messbereich des nachfolgend beschriebenen VEGF-ELISA bei einer optischen Dichte (OD) von 0,1 bis 1 liegt (Herstellerangaben), liegt die optimale Kondition 1x10<sup>6</sup> Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit einer OD von 0,510 (vgl. Tabelle 2.3.2).

Tabelle 2.3.2 Messergebnisse (optische Dichte im VEGF-ELISA) nach 6,12 und 24 Stunden Inkubation von 10<sup>5</sup> und 10<sup>6</sup> Zellen XTC unter Stimulation von 10mU/ml TSH zur Ermittlung der optimalen Zellzahl und Inkubationsdauer.

	Optische Dichte nach 6 Stunden	Optische Dichte nach 12 Stunden	Optische Dichte nach 24 Stunden
1x10 <sup>5</sup> Zellen	0,104	0,109	0,140
1x10 <sup>6</sup> Zellen	0,183	0,298	0,510



### 2.3.2 Suspensionsherstellung der Wachstumsfaktoren und Effektoren der Signaltransduktion

Um ein wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren und damit einen möglichen Wirkverlust der Wachstumsfaktoren, die in suspensierter Form bei -20°C gelagert werden mussten, zu vermeiden, wurden die Wachstumsfaktoren als Vorbereitung zu den Stimulationsversuchen nach den entsprechenden Produktinformationen zunächst in ihren entsprechenden Lösungsmitteln suspendiert, weiter verdünnt, aliquotiert und gelagert (vgl. Tabelle 2.3.2a).

Tabelle 2.3.2a Lösungsmittel und Konzentrationen der Aliquots der Wachstumsfaktoren, die bei -20°C gelagert wurden.

Wachstumsfaktor	Konzentration der Aliquots	Lösungsmittel
TSH	1000mU/ml	H5-Medium
EGF	1µg/ml	10mM Essigsäure + 0,1% FCS
TGF-α	10µg/ml	PBS + 0,1% FCS
IGF-1	10µg/ml	Aqua (steril)
bFGF	5µg/ 200µl	PBS + 0,1% FCS
HGF	10µg/ml	PBS + 0,1% FCS
PIGF	10µg/ml	PBS + 0,1% FCS
PDGF	0,25µg/ml	4mM Salzsäure + 0,1% FCS
TGF-β	1ng/µl	4mM Salzsäure + 0,1% FCS

Die nach den entsprechenden Produktinformationen suspendierten Effektoren der Signaltransduktion (vgl. Tabelle 2.3.2b) konnten alle dunkel bei +4°C gelagert werden. Die Stocklösungen mussten daher nicht weiter verdünnt und aliquotiert werden.

Tabelle 2.3.2b Lösungsmittel und Konzentration der Stocklösung der Effektoren der Signaltransduktion, die dunkel bei +4°C gelagert wurden.

Effektor d. Signaltransduktion	Konzentration der Lösung	Lösungsmittel
Choleratoxin	100µg/ml	Aqua (steril)
8-Br-cAMP	100µg/ml	0,1 M Natronlauge
TPA	100µg/ml	DMSO
Forskolin	100µg/ml	DMSO
Stauroporin	10µg/ml	DMSO
ddA	100µg/ml	DMSO

### 2.3.3 Stimulationsversuche mit Wachstumsfaktoren

Zu Beginn der Stimulationsversuche wurde das FGM bei einer ca. 80% Konfluenz der Zellen in den 250ml großen Gewebekulturflaschen nach einem Waschschrift mit PBS w.  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  zunächst für 24 Stunden durch serumfreies Medium mit 0,648g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin ersetzt. Dieses Medium war mit einer Hormonmischung aus Rinderinsulin (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), humanem Transferrin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Somatostatin (10ng/ml), Glycyl-L-histidyl-L-lysinacetat (2ng/ml) und Hydrocortison (0,36ng/ml) angereichert worden (H5-Medium).

Die Zellen wurden dann nach einem Waschschrift mit 25ml PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  mit 4ml 0,02% EDTA Lösung aus ihren Kulturflaschen abgelöst, in 20ml PBS w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  aufgenommen und 5 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Nach Verwerfen des liquiden Anteils wurde der Zelleniederschlag in 1ml H5-Medium resuspendiert.

0,1ml der Zellsuspension wurde zu einer 0,01%tigen Trypanblaulösung gegeben, um lichtmikroskopisch in einer Neubauer Zählkammer im Trypanblau-Exclusionstest den Anteil der vitalen Zellen zu bestimmen. Grundlage dieses Testes ist das unterschiedliche Verhalten toter und lebender Zellen gegenüber Trypanblau. Der makromolekulare saure Farbstoff kann nicht durch die intakte Zellmembran lebender Zellen penetrieren. In tote Zellen kann er jedoch eindringen und bindet sich dort an Proteine, sodass diese blau gefärbten Zellen mikroskopisch bei einer 10-fachen Vergrößerung durch das Auszählen von 4 Quadraten der Neubauer Zählkammer bestimmt werden können. Der Anteil toter Zellen wurde in Prozent bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen angegeben.

Nach Ermittlung des vitalen Zellanteils wurde eine Zellsuspension mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml H5-Medium hergestellt. 1ml dieser Zellsuspension wurde anschließend pro Kavität in Mehrfachkulturschalen mit je 6 Kavitäten mit einem Durchmesser von 34,8mm gegeben. Die Wachstumsfaktoren, die zuvor mit H5-Medium zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt worden waren, wurden dann entsprechend der Tabelle 2.3.3 in 1ml H5-Medium hinzugefügt.

Tabelle 2.3.3 Eingesetzte Konzentrationen von Wachstumsfaktoren in den Stimulationsversuchen

	0,01	0,1	1	10	100
TSH [mU/ml]			x	x	x
EGF [ng/ml]			x	x	x
TGF- $\alpha$ [ng/ml]				x	x
IGF-1 [ng/ml]			x	x	x
bFGF [ng/ml]				x	x
HGF [ng/ml]				x	x
PIGF [ng/ml]				x	x
PDGF [ng/ml]				x	
TGF- $\beta$ [ng/ml]	x	x	x	x	

Nach umfassender Literatur-Recherche bezüglich VEGF-Sekretion unter Einfluss der oben genannten Wachstumsfaktoren in anderen Tumorzelllinien, ergaben sich überwiegend die Konzentrationen 10ng/ml und 100ng/ml. Sofern hierbei überdurchschnittliche Werte erreicht wurden, erfolgte nach Vorliegen der ersten Experimente eine entsprechende Verdünnung um eine oder mehrere 10er Potenzen.

Der Zellkulturüberstand wurde abschließend nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% P<sub>CO2</sub> in Cryo-Vials asserviert und zunächst bei -20°C gelagert. Sämtliche Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt.

#### 2.3.4 Versuchsaufbau mit Effektoren der Signaltransduktion

Die Zellkultivierung zur Stimulation und Inhibition der Signaltransduktion entsprach den Stimulationsversuchen mit Wachstumsfaktoren (Abschnitt 2.3.2).

Nach 24 Stunden Inkubation in H5-Medium wurden nach Ermittlung des vitalen Zellanteils mit dem Trypanblau-Exklusionstest 1ml Zellsuspension mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Kavität der Mehrfachkulturschalen ausgesät. Anschließend wurden die Effektoren der Signaltransduktion, die zuvor mit H5-Medium zu Konzentrationen von 10ng/ml und 100ng/ml verdünnt worden waren, in 1ml H5-Medium hinzugefügt. Bezüglich der Konzentrationen der Effektoren der Signaltransduktion erfolgte die Orientierung an

der Arbeit von Thomas Hoelting aus dem Jahr 1993, in der ebenfalls beide Signaltransduktionswege des TSH-Rezeptors einander gegenüber gestellt wurden. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% P<sub>CO2</sub> wurden die Zellüberstände asserviert und bei -20°C bis zur Auswertung mittels VEGF-ELISA gelagert. Auch hier erfolgten alle Versuche in Triplikaten.

## 2.4 Quantitative Bestimmung von VEGF

Die VEGF Bestimmung in den asservierten Zellkulturüberständen erfolgte mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA). Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Kombination aus einem Immunassays (Antigen-Antikörperreaktion) mit einer enzymatischen Farbreaktion.

Bei dem hier verwendeten ELISA handelt es sich um einen nicht-kompetitiven Sandwich-ELISA. Es werden zwei Antikörper verwendet, die beide hochspezifisch an das nachzuweisende Antigen binden, jedoch an unterschiedlichen Determinanten des Antigens, um nicht kompetitiv zu sein.

Zunächst werden Mikrotiterplatten mit dem primären Antikörper (coating Antikörper) beschichtet. Eine Mikrotiterplatte ist eine Anordnung von 96 kleinen Reaktionsgefäßen (Kavitäten von 250µl) in einer Kunststoffplatte. Zu dem auf der Festphase immobilisierten coating Antikörper werden die Proben mit dem zu bestimmenden Protein gegeben. Nach Auswaschen der nicht gebundenen Anteile wird zu den fixierten Antigen-Antikörper-Komplexen der sekundäre biotinylierte Antikörper (capture Antikörper) gegeben, der ebenfalls an das nachzuweisende Antigen bindet. Dieser Sekundärantikörper wird nach einem erneuten Waschen von Meerrettichperoxidase konjugiertem Streptavidin, einem tetrameren 60 kDa Protein, gebunden. Die Peroxidase kann mit  $H_2O_2$  einen Komplex bilden und ist dann zur Oxidation organischer Substrate befähigt. Im nächsten Schritt werden dann  $H_2O_2$  und der Farbstoff Tetramethylbenzidin hinzugefügt. Das farblose Tetramethylbenzidin wird durch die Enzymreaktion der Peroxidase in das blaugefärbte Tetramethylbenzidin-Radikalkation umgesetzt. Durch das anschließende Ansäuern mit Schwefelsäure erfolgt das Abstoppen der Farbreaktion. Es bildet sich das gelbgefärbte 3,3',5,5'-Tetramethyl-1,1'-Diphenochinon-4,4'-Diimmoniumion. Die Stärke der Farbintensität der Gelbfärbung (optische Dichte) wird mit einem Photometer gemessen und die Menge des gebildeten Farbstoffes ist direkt proportional zur der zu bestimmenden Proteinkonzentration in der eingesetzten Probe. Die quantitative Bestimmung in pg/ml kann als Korrelation zu mitgeführten Standardproben mit definierter Konzentration erfolgen.

In dieser Arbeit wurde das DuoSet<sup>®</sup> ELISA Development System, human VEGF von R&D Systems verwendet. Sämtliche Reaktionen erfolgten bei Raumtemperatur und normalem Tageslicht.

Zur Beschichtung mit dem coating Antikörper wurden die 96 (8x12) Kavitäten der Mikrotiterplatte mit je 100µl Ziegen-anti-Maus VEGF<sub>165</sub> Antikörper befüllt und über Nacht bei Raumtemperatur damit inkubiert. Die Mikrotiterplatte wurde hierbei mit einer Kunststoffolie abgedeckt.

Am darauf folgenden Tag erfolgte zunächst ein Waschschrift, bei dem die freie Flüssigkeit abgesaugt und die Vertiefungen anschließend mit 3 mal je 300µl Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween20) gespült wurden. Nach dem letzten Waschgang wurde die Platte jeweils umgekehrt auf Filterpapier ausgeklopft.

Anschließend wurde die Platte mit je 300µl Blockpuffer (PBS mit 1% fetalem Kälberalbumin, 5% Saccharose und 0,05% NaN<sub>3</sub>) pro Kavität ein Stunde inkubiert, um das unspezifische Anlagern von Proteinen an noch frei gebliebenen Kavitätenwänden zu verhindern.

Nach Entfernen des nicht gebundenen Blockpuffers und einem weiteren Waschschrift konnten je 100µl der Proben bzw. der mitgelieferten Standardproben in definierten Konzentrationen in Duplikaten in die Kavitäten eingesetzt werden. Die Doppelbestimmungen der Proben erfolgten in zwei vertikal aufeinander folgenden Kavitäten. Um im sensitivsten Messbereich dieses Verfahrens zu sein, wurden die Zellkulturüberstände 1:5 und 1:10 verdünnt (vgl. Vorversuch). Die Verdünnungen erfolgten alle in PBS mit 1% fetalem Rinderalbumin. Die Standardproben wurden in Konzentrationen von 4000, 2000, 1000, 500, 250, 125 und 62,5 pg/ml VEGF eingesetzt.

Nach 2 Stunden Inkubation wurden nach einem Waschschrift zu den Antigen-Antikörperkomplexen je 100µl an Biotin gekoppelte sekundärer Ziegen-anti-Maus VEGF<sub>165</sub> Antikörper als capture Antikörper pro Kavität dazugegeben. Es wurde weitere 2 Stunden inkubiert.

Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgte die Inkubation mit je 100µl Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Konjugat. Dieses lagerte sich aufgrund der vier hochaffinen Bindungsstellen des Streptavidins für Biotin an den capture Antikörper in 20 Minuten Inkubationsdauer an.

Im nächsten Schritt folgten 100µl einer 1:1 Mischung aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Tetramethylbenzidin und somit der Beginn der enzymatischen Farbreaktion. Diese wurde nach 20 Minuten mit 50µl 2M Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte mit dem Mikrotiterplattenlesegerät Emax (*Molecular Devices*) innerhalb von 20 Minuten bestimmt.

Das verwendete Gerät bestimmte die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 450nm mit einer Korrekturwellenlänge von 570nm. Die Daten wurden von einer Software (Softmax pro, Molecular Devices) bearbeitet und als optische Dichte angezeigt.

## 2.5 Auswertung

Die Ergebnisse der Stimulation mit Wachstumsfaktoren und Inkubation mit Effektoren der Signaltransduktion wurden in Form von Quotienten dargestellt:

$$\frac{\text{Optische Dichte der stimulierten VEGF-Sekretion (Messwert)} \times 100}{\text{Optische Dichte der basalen VEGF-Sekretion (Kontrolle)}} - 100 = X$$

Die Werte entsprechen also Prozenten gegenüber der unstimulierten Kontrolle, die in jedem experimentellen Ansatz separat mitgeführt wurde.

Es wurden ferner immer 3 unabhängige Stimulationsversuche zu einem Mittelwert zusammengefasst und die entsprechende Standardabweichung berechnet.



## 2.6 Chemikalien und Verbrauchsmittel

- Aqua dest. (*Apotheke der Philipps-Universität Marburg*)
- Cryo-Vials, 2ml (*Greiner, Solingen, Deutschland*)
- DMEM/HAM'S F12 (1:1) Medium mit 0,648g/l N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin (*Biochrom, Berlin, Deutschland*)
- DMEM/HAM'S F12 (1:1) Medium ohne Glutamin (*Biochrom, Berlin, Deutschland*)
- DMSO (*Wak Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland*)
- DuoSet® ELISA Development System, human VEGF (*Katalog Nr. DY 493, R&D Systems, Minneapolis, USA*)
- EDTA (Ethyldiamintetraacetate) (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Einmal Pipetten, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml (*Greiner, Solingen, Deutschland*)
- Eppendorf Pipetten (*Eppendorf Nethler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland*)
- Essigsäure (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)
- FCS (fetales Kälber Serum) (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Flaschen für Gewebekulturen, 250ml, mit schrägem Hals (*Greiner, Solingen, Deutschland*)
- Mehrfachkulturschalen (*Costar, Corning, New York, USA*)
- Mikrotiterplatten (*Costar, Corning, New York, USA*)
- Natronlauge (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)
- Neubauer Zählkammer
- PBS (Phosphat buffered saline) w Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (*Biochrom, Berlin, Deutschland*)
- PBS (Phosphat buffered saline) w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (*Biochrom, Berlin, Deutschland*)
- Penicillin/Streptomycin (10000 I.E. und 10000 µg/ml) (*Biochrom, Berlin, Deutschland*)
- Pipettenhalter
- Pipettenspitzen passend für Eppendorf, bis maximal 20 µl, 1-100 µl, 101-1000 µl, (*Greiner, Solingen, Deutschland*)
- Polypropylen- Röhren, 50ml (*Greiner, Solingen, Deutschland*)
- Salzsäure (*Merck, Darmstadt, Deutschland*)
- Trypanblau 0,1% (*Apotheke der Philipps-Universität Marburg*)
- Trypsin/EDTA 0,25% (2,5g Schweinetrypsin, 0,2g EDTA) (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)

## 2.7 Wachstumsfaktoren

- Thyreoideastimulierendes Hormon (TSH), bovin, (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), human, recombinant (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Transformierender Wachstumsfaktor  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), human, recombinant (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), human, recombinant (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- bFGF (basal fibroblast growth factor), human, recombinant (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- HGF (hepatocyte growth factor), human, recombinant (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- PIGF (placenta growth factor), human recombinant (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- PDGF (platelet derived growth factor), human, natural (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)
- Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), human, natural (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*)

## 2.8 Signaltransduktionseffektoren

### PKA -Agonisten

- Cholera toxin, *Vibrio cholerae* (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*) – aktiviert selektiv Gs
- 8-BrcAMP (8-bromo-cyclic-adenosine-monophosphate) (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*) – wirkt analog zu cAMP
- Forskolin (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*) – aktiviert direkt die katalytische Einheit von PKA

#### PKA-Antagonist

- ddA (2'5'-dideoxyadenosine) (*Calbiochem, San Diego, USA*) – wirkt antagonistisch zu cAMP

#### PKC-Agonist

- TPA (12-0 tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*) – wirkt analog zu DAG

#### PKC-Antagonist

- Stauroporin, streptomyces spec. (*Sigma, Taufkirchen, Deutschland*) – Inhibitor der PKC

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Stimulation mit Wachstumsfaktoren**

Der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die VEGF-Sekretion der drei beschriebenen Zelllinien zeigt bei XTC und HTC+ eine deutlich dosisabhängige Steigerung der VEGF-Sekretion durch TSH. Die größten Steigerungen der VEGF-Sekretion lassen sich bei XTC und HTC+ mit TGF- $\beta$  erreichen. Einen schwächeren Effekt in beiden Zelllinien hat EGF.

TGF- $\alpha$  bewirkt in XTC Zellen ebenfalls eine leichte Stimulation der VEGF-Sekretion, während sich ein vergleichbarer Effekt in HTC+ mit HGF erreichen lässt.

Die größte Steigerung der VEGF-Sekretion in der nicht TSH-Rezeptor tragenden HTC- Zelllinie lässt sich durch EGF hervorrufen. Neben TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  verursachen hier auch PlGF und HGF eine Stimulation der VEGF-Sekretion.

### 3.1.1 XTC

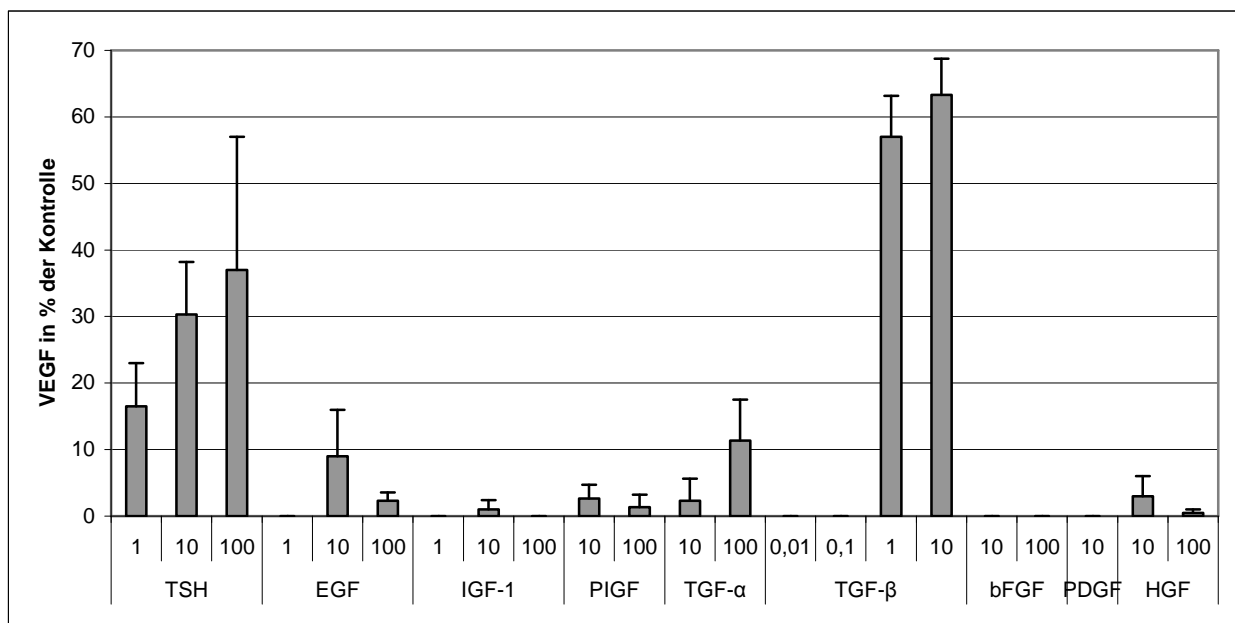
Zu einer Steigerung der VEGF-Sekretion in der XTC Zelllinie, einer Zelllinie mit einer hohen basalen VEGF-Sekretion, kommt es unter der Stimulation von TGF- $\beta$ . Hier zeigt sich auch ein Dosis-Wirkungseffekt. Während 0,01 und 0,1ng/ml TGF- $\beta$  keinen Einfluss auf die VEGF-Sekretion haben, zeigt sich bei der Stimulation von 1ng/ml TGF- $\beta$  eine Steigerung um 57% und unter 10ng/ml um 63%.

Die VEGF-Sekretion steigt unter der Stimulation von 1mU/ml TSH um 16,5%, vergrößert sich mit 10mU/ml auf 30,3% und mit 100mU/ml auf 37%.

Die Stimulation mit 1ng/ml EGF lässt keine Steigerung der VEGF-Sekretion beobachten, während sich unter 10ng/ml EGF eine 9-prozentige und unter 100ng/ml EGF eine 2,3-prozentige Steigerung beobachten lässt.

100ng/ml TGF- $\alpha$  vergrößert die VEGF-Sekretion der XTC Zellen um 11,3%.

Keine Steigerung der VEGF-Sekretion kommt bei der Stimulation mit TGF- $\alpha$ , IGF-1, bFGF, HGF, PIGF und PDGF zustande.



**Abbildung 3.1.1:** Prozentuale Steigerung der VEGF-Sekretion in der **XTC-Zelllinie** unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren in vitro für 24 h (TSH in mU/ml, die übrigen in ng/ml) in Relation zu einer unstimulierten Probe.

### 3.1.2 HTC+

Eine gesteigerte VEGF-Sekretion bei HTC+ Zellen lässt sich unter Stimulation von TSH beobachten. Die Sekretion steigert sich mit 1mU/ml auf 10%, mit 10mU/ml auf 10,67% und mit 100mU/ml TSH auf 19%. Unter der Stimulation mit TGF- $\beta$  zeigt sich ebenfalls eine dosisabhängige Steigerung der VEGF-Sekretion. Mit 0,01ng/ml zeigt sich eine Steigerung auf 6%, mit 0,1ng/ml auf 20%, mit 1ng/ml auf 46% und mit 10ng/ml TGF- $\beta$  auf 30%. Auch unter der Stimulation mit 10 und 100ng/ml HGF zeigt sich eine Steigerung der VEGF-Sekretion auf 8%.

Eine Steigerung der VEGF-Sekretion lässt sich bei der Stimulation mit 10ng/ml und 100ng/ml EGF beschreiben, allerdings liegt hier eine große Standardabweichung vor.

1ng/ml EGF, IGF-1, PIGF, TGF- $\alpha$ , bFGF und PDGF führen zu keiner Steigerung der VEGF-Sekretion in der HTC+ - Zelllinie.

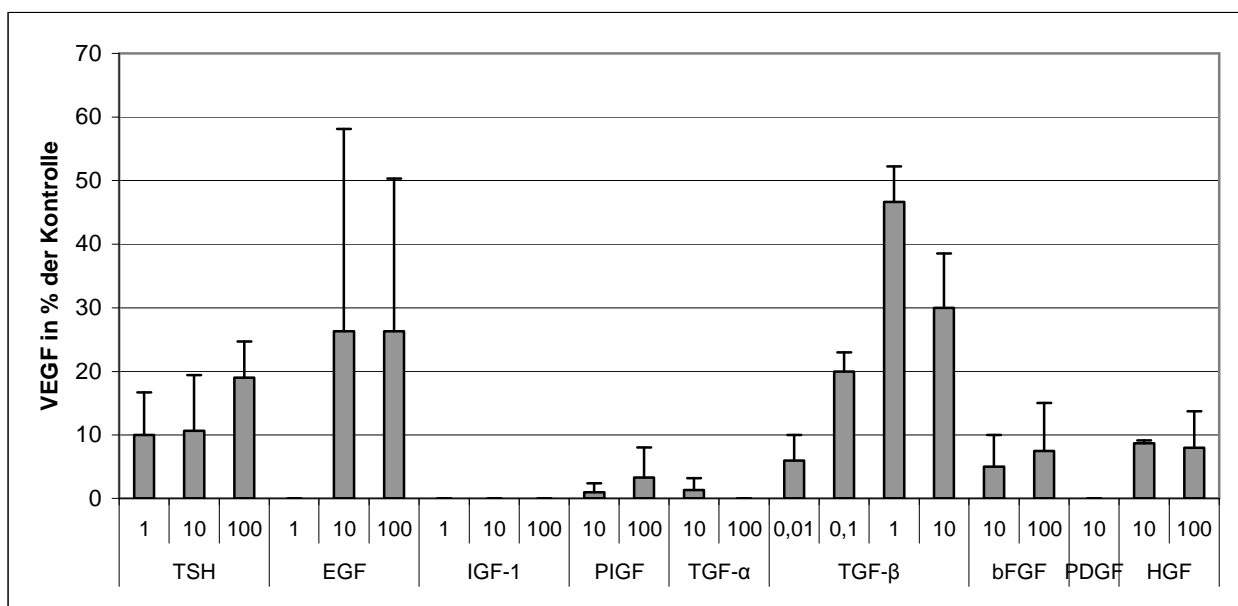


Abbildung 3.1.2: Prozentuale Steigerung der VEGF-Sekretion in der **HTC+ -Zelllinie** unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren *in vitro* für 24 h (TSH in mU/ml, die übrigen in ng/ml), in Relation zu einer unstimulierten Probe.

### 3.1.3 HTC-

Bei der nicht TSH-Rezeptor tragenden Zelllinie lässt sich unter der Stimulation mit 1ng/ml, 10ng/ml und 100ng/ml EGF eine Steigerung der VEGF-Sekretion auf 35%, 46% beziehungsweise auf 28% beobachten. Eine 37,5-prozentige Steigerung zeigt sich unter der Stimulation mit 10ng/ml PIGF. Die VEGF-Sekretion steigt auf 15% beziehungsweise auf 35,67% unter der Stimulation von 10ng/ml und 100ng/ml TGF- $\alpha$ . 1ng/ml und 10ng/ml TGF- $\beta$  lassen ebenfalls eine Steigerung der VEGF-Sekretion auf 23,67% und 24,67% beobachten.

Keine Steigerung zeigt sich unter der Stimulation mit TSH und HGF.

Auch unter der Stimulation mit IGF-1, bFGF, PDGF und niedrig dosiertem TGF- $\beta$  zeigt sich keinerlei Steigerung der VEGF-Sekretion.

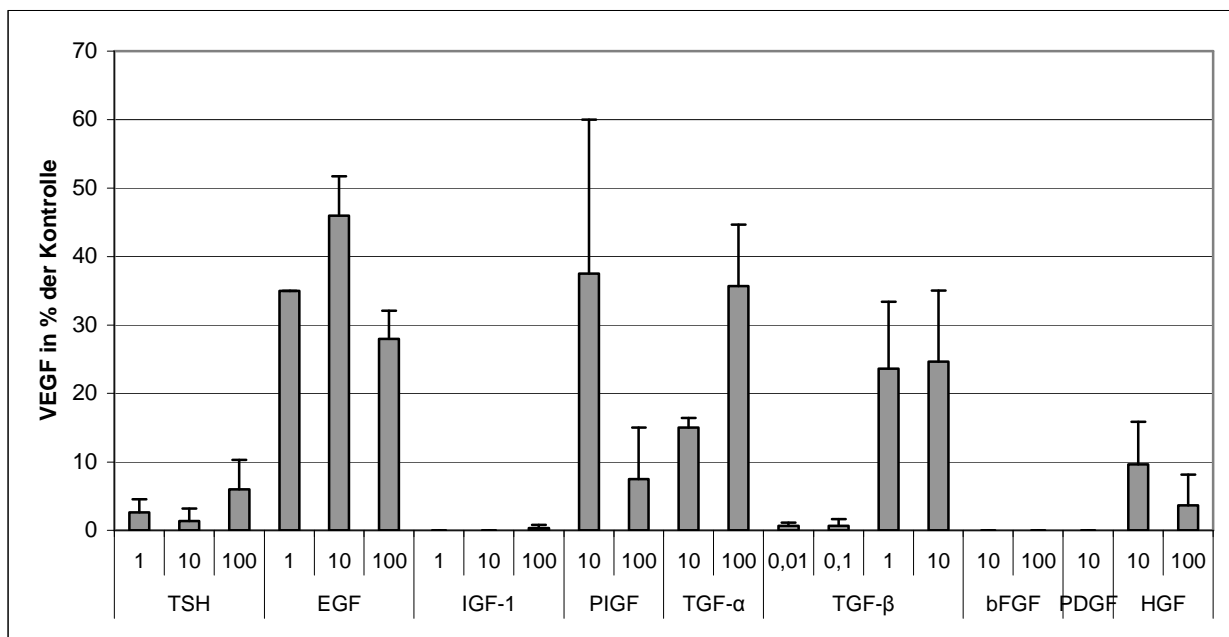


Abbildung 3.1.3: Prozentuale Steigerung der VEGF-Sekretion in der **HTC-Zelllinie** unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren in vitro für 24 h (TSH in mU/ml, die übrigen in ng/ml), in Relation zu einer unstimulierten Probe.

### 3.1.4 Gegenüberstellung von HTC+ und HTC-

Die größten Unterschiede in der Stimulation der beiden Zelllinien mit Wachstumsfaktoren finden sich bei PIGF und TGF- $\alpha$ . Während sich bei HTC+ hier keine Steigerung feststellen lässt, führt die Stimulation mit 10ng/ml und 100ng/ml PIGF bei HTC- zu einer Steigerung auf 37,5% bzw. 7,5%. Die Stimulation mit 10ng/ml und 100ng/ml TGF- $\alpha$  führt in vitro bei HTC- zu einer Steigerung der VEGF-Sekretion auf 15% und 35,67%.

Keine relevanten Unterschiede finden sich in der Stimulation mit 100ng/ml EGF, 10ng/ml TGF- $\beta$ , 10ng/ml und 100ng/ml HGF.

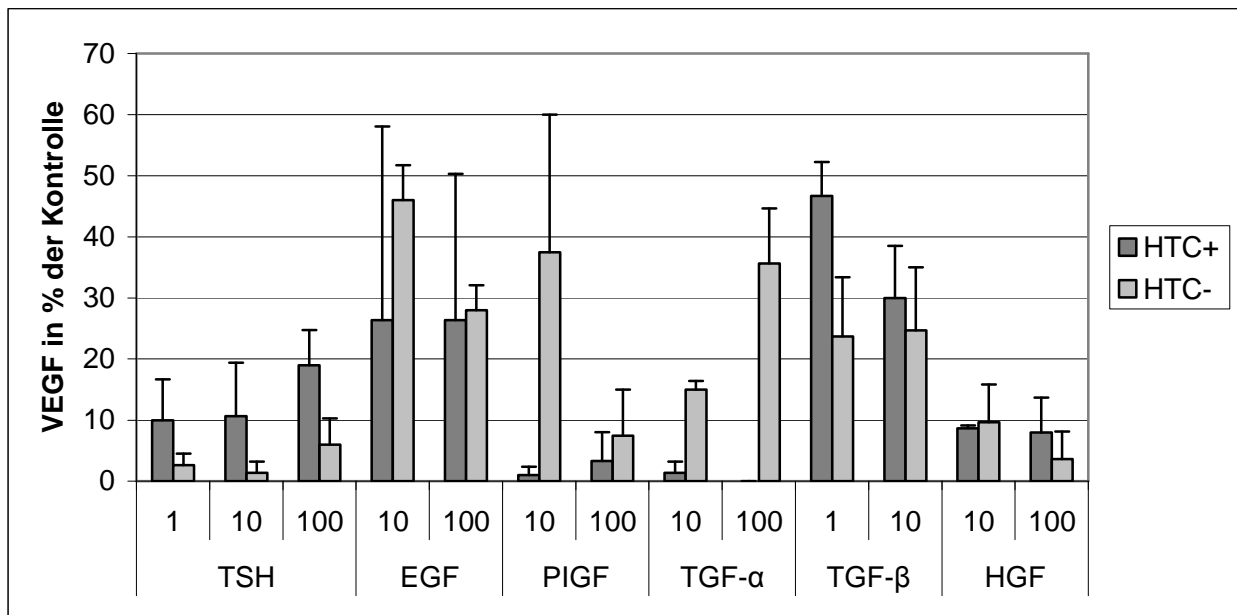


Abbildung 3.1.4: Gegenüberstellung der VEGF-Sekretion in der HTC+ und HTC- -Zelllinie unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren in vitro für 24 h (TSH in mU/ml, die übrigen in ng/ml) zur Demonstration eines funktionellen TSH-Rezeptors auf die biologische Wirkung von den genannten Wachstumsfaktoren auf die VEGF-Sekretion, in Relation zu einer unstimulierten Probe.



### 3.2 Signaltransduktion

Eine Stimulation der VEGF-Sekretion lässt sich durch den PKC Agonisten TPA hervorrufen. Unter der Stimulation der Zellen mit PKA Agonisten wie Choleratoxin und Forskolin lassen sich ebenfalls VEGF-Sekretionssteigerungen hervorrufen. Die Antagonisierung des PKC-Signaltransduktionsweges durch Stauroporin erzielt deutlich stärkere Effekte als die Antagonisierung des PKA-Signaltransduktionsweges durch ddA.

Dieser Effekt kann in der Koinkubation mit TSH und den Antogonisten ddA und Stauroporin bestätigt werden. Hierbei kann der stimulierende Effekt des TSH durch Koinkubation mit Stauroporin in allen drei Zelllinien komplett gehemmt werden und führt sogar zu einer verminderten VEGF-Sekretion im Vergleich zur unstimulierten Probe. Eine Antagonisierung des PKA-Signaltransduktionsweges kann die TSH-Stimulation nur in XTC und HTC- lediglich aufheben, zeigt jedoch eine vergleichbare VEGF-Sekretion wie die unstimulierte Probe.

Der Schwerpunkt der TSH vermittelten Stimulation der VEGF-Sekretion verläuft somit über den PKC Signaltransduktionsweg.

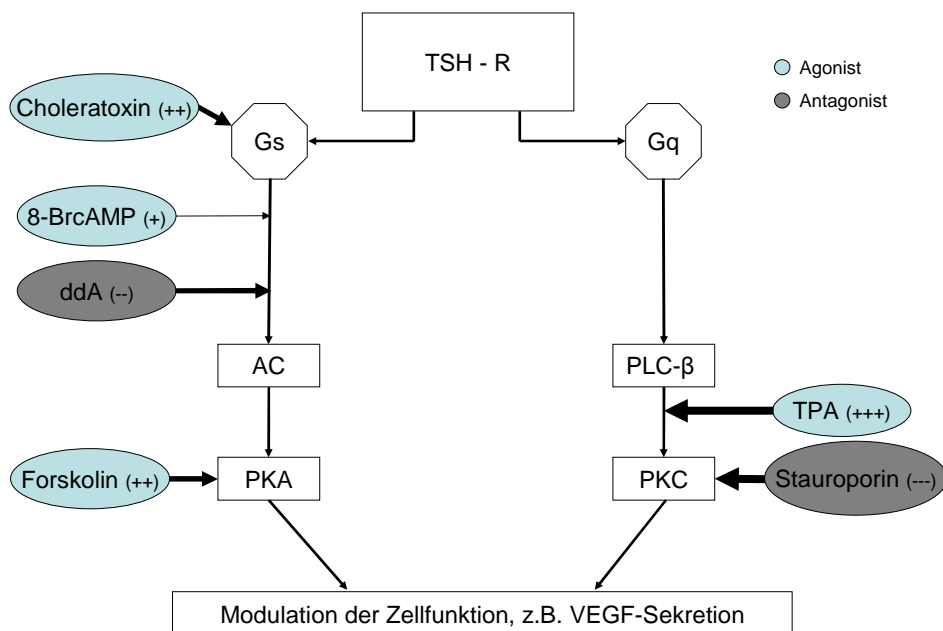


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Signaltransduktionswege des TSH-Rezeptors mit den Wirkorten und Schwerpunkten der experimentellen Agonisten und Antagonisten.

### 3.2.1 XTC

Stimuliert man bei XTC Zellen den PKA-Signaltransduktionsweg mit Choleratoxin, so zeigt sich eine Steigerung der VEGF-Sekretion bei 10 und 100ng/ml auf 20,67% bzw. auf 21,67%. Unter Stimulation mit 10 und 100ng/ml 8-BrcAMP oder Forskolin zeigt sich keine Veränderung zur basalen VEGF-Sekretion der Zellen. Beim Blockieren des PKA-Signaltransduktionsweges mit 10 und 100ng/ml ddA zeigt sich keine Verringerung der VEGF-Sekretion. Wird der PKC-Signaltransduktionsweg mit 10 und 100ng/ml TPA stimuliert, so resultiert daraus eine Steigerung der VEGF-Sekretion auf 14% bzw. 10,67%. Wird dieser Weg blockiert, so zeigt sich bei 10ng/ml Stauroporin keine und mit 100ng/ml Stauroporin eine 41-prozentige Verringerung der VEGF-Sekretion. Kombiniert man die Stimulation von 100ng/ml Stauroporin mit 10 und 100mU/ml TSH, so resultiert daraus in beiden Fällen eine Verringerung um 35%. Unter der kombinierten Stimulation von 100ng/ml ddA und 10 und 100mU/ml TSH zeigt sich keine signifikante Veränderung zur basalen VEGF-Sekretion.

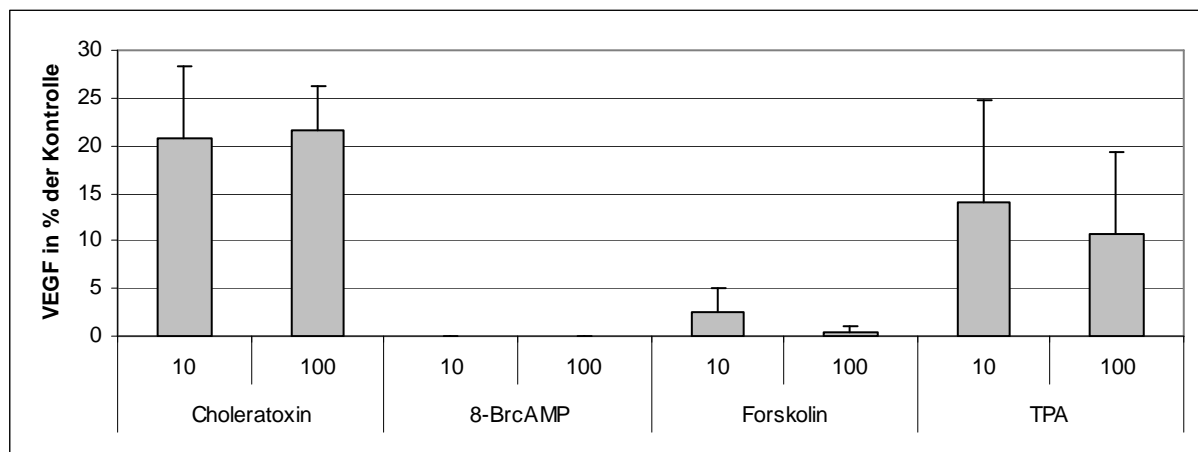


Abbildung 3.2.1.a: Prozentuale Veränderung der VEGF-Sekretion in der **XTC-Zelllinie** unter der Stimulation mit Agonisten der Signaltransduktion (in ng/ml) für 24 h in Relation zu einer unstimulierten Probe.

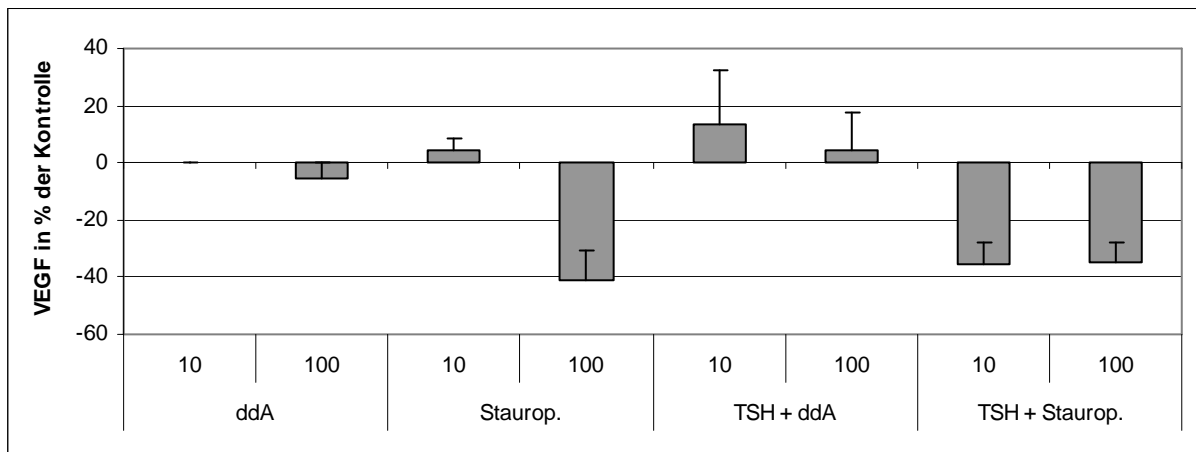


Abbildung 3.2.1.b: Prozentuale VEGF-Sekretion in der **XTC-Zelllinie** unter Blockierung mit Antagonisten der Signaltransduktion (in ng/ml) und unter Co-Stimulation mit 100ng/ml des Antagonisten mit TSH (in mU/ml) für 24 h, gemessen in Relation zu einer unstimulierten Probe.

### 3.2.2 HTC+

Stimuliert man bei HTC+ Zellen den PKA-Signaltransduktionsweg mit Cholera-toxin, so zeigt sich eine Steigerung der VEGF-Sekretion bei 10 und 100ng/ml auf 13,67% bzw. auf 11,67%. Unter Stimulation mit 10 und 100ng/ml 8-BrcAMP zeigt sich keine Veränderung zur basalen VEGF-Sekretion der Zellen. Stimuliert man die Zellen mit 10 und 100ng/ml Forskolin, so steigt die VEGF-Sekretion auf 6,67% und 23%. Das Hinzusetzen des PKA-Antagonisten ddA zu den HTC+ Zellen verändert die VEGF-Sekretion der Zellen nicht. Wird der PKC-Signaltransduktionsweg mit 100ng/ml TPA stimuliert, so zeigt sich eine Steigerung der VEGF-Sekretion um 6%. Unter der Stimulation mit 10ng/ml TPA stellt sich keine Veränderung ein. Während es unter dem Zusetzen von 10ng/ml des PKC-Antagonisten Stauroporin zu einer Steigerung der VEGF-Sekretion auf 14,33% kommt, erfolgt bei 100ng/ml eine Verringerung auf 33,67%. Unter der kombinierten Stimulation von 100ng/ml Stauroporin mit 10 und 100mU/ml TSH kommt es in beiden Fällen zu einer Verringerung von 49,67% bzw. 53%. Kombiniert man die Stimulation von 100ng/ml ddA mit 10 und 100mU/ml TSH, so resultiert daraus eine Steigerung der VEGF-Sekretion auf 10% und 11,33%.

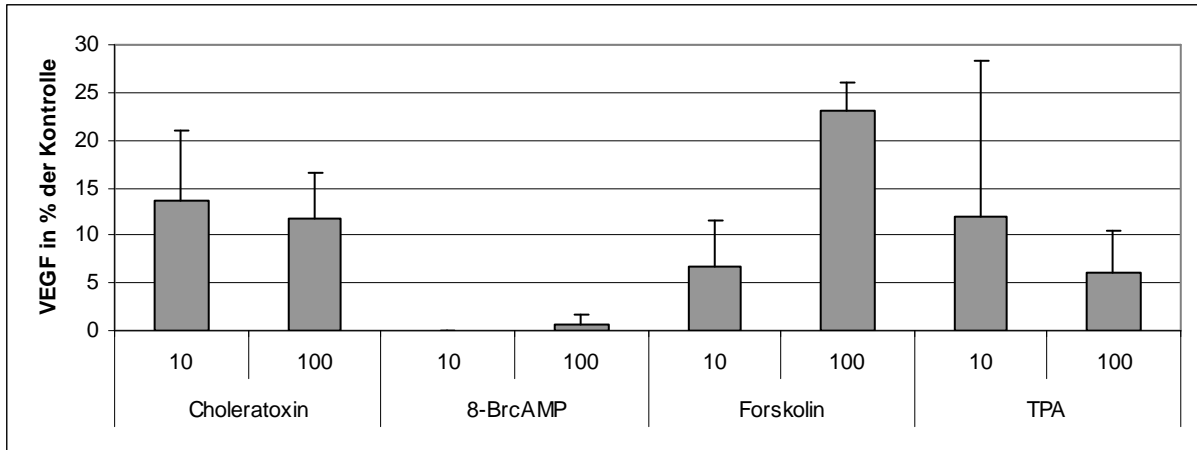


Abbildung 3.2.2 a: Prozentuale Veränderung der VEGF-Sekretion in der **HTC+ -Zelllinie** unter Stimulation mit Agonisten der Signaltransduktion (in ng/ml) für 24 h in Relation zu einer unstimulierten Probe.

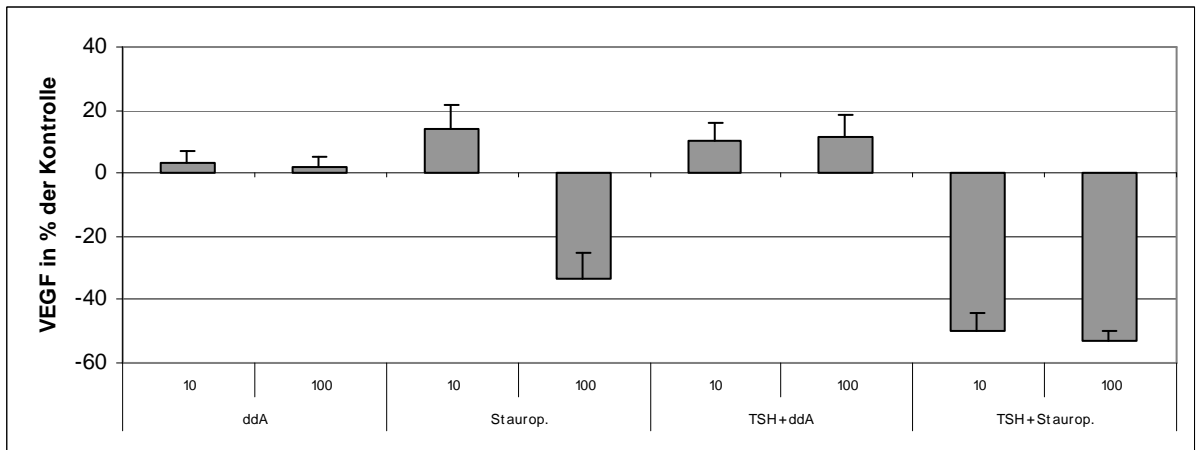


Abbildung 3.2.2.b: Prozentuale VEGF-Sekretion in der **HTC+ -Zelllinie** unter Blockierung mit Antagonisten der Signaltransduktion (in ng/ml) und unter Co-Stimulation mit 100ng/ml des Antagonisten mit TSH (in mU/ml) für 24 h in Relation zu einer unstimulierten Probe.

### 3.2.3 HTC-

Wird bei HTC- Zellen der PKA-Signaltransduktionsweg mit 10 und 100ng/ml Cholera toxin stimuliert, so resultiert eine Steigerung der VEGF-Sekretion auf 16% und 48,33%. Unter Stimulation mit 10 und 100ng/ml 8-BrcAMP zeigt sich keine Veränderung zur basalen VEGF-Sekretion der Zellen. Während sich die VEGF-Sekretion unter der Stimulation von 10ng/ml Forskolin nicht verändert, sieht man unter 100ng/ml Forskolin eine Steigerung auf 28%. Setzt man die Zellen dem PKA-Antagonisten ddA aus, so zeigt sich bei einer Konzentration von 10ng/ml eine Verringerung von 15,67%. Bei 100ng/ml ddA erfolgt keine Veränderung zur basalen VEGF-Sekretion. Wird der PKC-Signaltransduktionsweg mit 10 und 100ng/ml des PKC-Agonisten TPA stimuliert, so resultiert eine Steigerung auf 21% und 36%. Während es unter dem Zusetzen von 10ng/ml des PKC-Antagonisten Stauroporin zu einer Steigerung der VEGF-Sekretion auf 46,5% kommt, erfolgt bei 100ng/ml eine Verringerung von 65,33%. Unter der kombinierten Stimulation von 100ng/ml Stauroporin mit 10 und 100mU/ml TSH kommt es in beiden Fällen zu einer Verringerung von 71,5% bzw. 75,5%. Kombiniert man die Stimulation von 100ng/ml ddA mit 100mU/ml TSH, so resultiert daraus eine Steigerung der VEGF-Sekretion von 9,5%. Bei der Kombination von 100ng/ml ddA mit 10mU/ml TSH stellt sich keine Veränderung der VEGF-Sekretion ein.

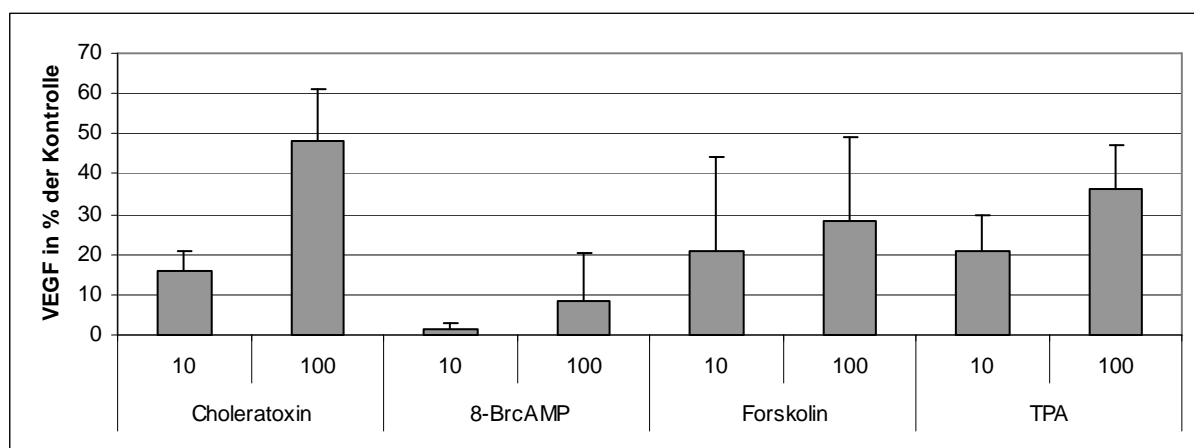


Abbildung 3.2.3.a: Prozentuale Veränderung der VEGF-Sekretion in der **HTC- Zelllinie** unter Stimulation mit Agonisten der Signaltransduktion (in ng/ml) für 24 h in Relation zu einer unstimulierten Probe.

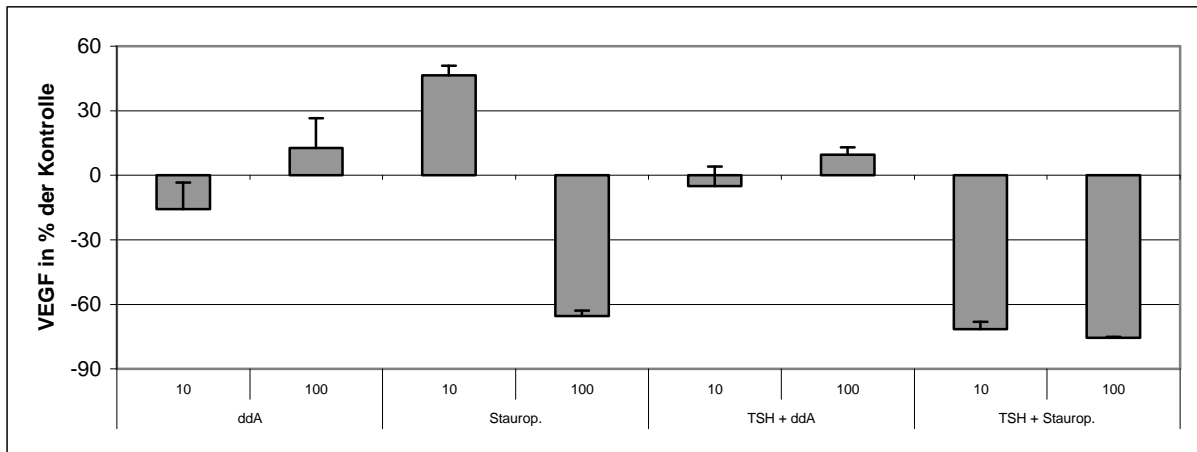


Abbildung 3.2.3.b: Prozentuale VEGF-Sekretion in der **HTC- -Zelllinie** unter Blockierung mit Antagonisten der Signaltransduktion (in ng/ml) und unter Co-Stimulation mit 100ng/ml des Antagonisten mit TSH (in mU/ml) für 24 h in Relation zu einer unstimulierten Probe.

### 3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse und tabellarische Darstellung

#### 3.3.1 Wachstumsfaktoren

Nach 24 Stunden Inkubation von  $10^6$  Zellen der entsprechenden Zelllinie in 2ml mit Wachstumsfaktor versetztem Medium zeigen sich im ELISA unterschiedliche Konzentrationen von VEGF. Es erfolgen jeweils drei unabhängige Messungen und die Mittelwerte werden jeweils in Relation zu einer unstimulierten Probe angegeben. Hierbei zeigt sich bei XTC und HTC+ die bekannte dosisabhängige Steigerung der VEGF-Sekretion durch TSH. Die größte Steigerung der VEGF-Sekretion lassen sich bei XTC und HTC+ mit TGF- $\beta$  erreichen. Einen schwächeren Effekt in beiden Zelllinien hat EGF.

TGF- $\alpha$  bewirkt in XTC Zellen ebenfalls eine leichte Stimulation der VEGF-Sekretion, während sich ein vergleichbarer Effekt in HTC+ mit HGF erreichen lässt.

Die größte Steigerung der VEGF-Sekretion in der HTC- Zelllinie lässt sich durch EGF hervorrufen. Neben TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  verursachen hier auch PIGF und HGF eine Stimulation der VEGF-Sekretion (vgl. Tabelle 3.3.1).

Tabelle 3.3.1: Prozentuale VEGF-Sekretion unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren in den Zelllinien XTC, HTC+ und HTC-. Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen mittels ELISA in Relation zu einer jeweils unstimulierten Probe mit Standardabweichung.

Substanz	Konzentr.	XTC	Stand. Abw.	HTC+	Stand. Abw.	HTC-	Stand. Abw.
TSH	1mU/ml	16,50	6,50	10,00	6,68	2,67	1,89
	10mU/ml	30,33	7,85	10,67	8,73	1,33	1,89
	100mU/ml	37,00	20,02	19,00	5,72	6,00	4,32
EGF	1ng/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	35,00	0,00
	10ng/ml	9,00	6,98	26,33	31,75	46,00	5,72
	100ng/ml	2,33	1,25	26,33	23,98	28,00	4,08
TGF- $\alpha$	10ng/ml	2,33	3,30	1,33	1,89	15,00	1,41
	100ng/ml	11,33	6,18	0,00	0,00	35,67	8,99
IGF-1	1ng/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	10ng/ml	1,00	1,41	0,00	0,00	0,00	0,00
	100ng/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,47
bFGF	10ng/ml	0,00	0,00	5,00	5,00	0,00	0,00
	100ng/ml	0,00	0,00	7,50	7,50	0,00	0,00
HGF	10ng/ml	3,00	3,00	8,67	0,47	9,67	6,18
	100ng/ml	0,50	0,50	8,00	5,72	3,67	4,50
PIGF	10ng/ml	2,67	2,05	1,00	1,41	37,50	22,50
	100ng/ml	1,33	1,89	3,33	4,71	7,50	7,50
PDGF	10ng/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TGF- $\beta$	0,01ng/ml	0,00	0,00	6,00	4,00	0,67	0,47
	0,1ng/ml	0,00	0,00	20,00	3,00	0,67	0,94
	1ng/ml	57,00	6,16	46,67	5,56	23,67	9,74
	10ng/ml	63,33	5,44	30,00	8,52	24,67	10,37

### 3.3.2 Signaltransduktion

Eine Stimulation der VEGF-Sekretion lässt sich durch den PKC Agonisten TPA und die PKA Agonisten Choleratoxin und Forskolin hervorrufen.

Die Antagonisierung des PKC-Signaltransduktionsweges durch Stauroporin erzielt deutlich stärkere Effekte als die Antagonisierung des PKA-Signaltransduktionsweges durch ddA (vgl. Tabelle 3.3.2a).

Tabelle 3.3.2.a: VEGF-Sekretion der XTC, HTC+ und HTC- -Zelllinie mit Effektoren der Signaltransduktion des TSH-Rezeptors in den angegebenen Konzentrationen: Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen mit Standardabweichungen.

Substanz	Konzentr.	XTC	Stand. Abw.	HTC+	Stand. Abw.	HTC-	Stand. Abw.
Choleratox	10ng/ml	20,67	7,72	13,67	7,32	16,00	5,10
	100ng/ml	21,67	4,64	11,67	4,92	48,33	12,71
8-BrcAMP	10ng/ml	0,00	0,00	0,00	0,00	1,33	1,89
	100ng/ml	0,00	0,00	0,67	0,94	8,33	11,79
Forskolin	10ng/ml	2,50	2,50	6,67	4,78	21,00	22,99
	100ng/ml	0,50	0,50	23,00	2,94	28,33	21,01
TPA	10ng/ml	14,00	10,71	12,00	16,27	21,00	8,64
	100ng/ml	10,67	8,58	6,00	4,55	36,00	11,34
ddA	10ng/ml	0,00	0,00	3,00	4,24	-15,67	12,28
	100ng/ml	-5,50	5,50	2,00	2,94	12,67	13,89
Staurop.	10ng/ml	4,67	3,68	14,33	7,41	46,50	4,50
	100ng/ml	-41,00	10,03	-33,67	8,73	-65,33	2,49

Durch die Koinkubation mit TSH zeigt sich kein Effekt auf die stark blockierenden Einfluss von Stauroporin auf die VEGF-Sekretion der drei Zelllinien (vgl. Tabelle 3.3.2b).

Tabelle 3.2.b: VEGF-Sekretion der Zelllinien XTC, HTC+ und HTC- unter Koinkubation mit 100mU/ml TSH und Antagonisierung des PKC bzw. PKA Systems der Signaltransduktion in den angegebenen Konzentrationen: Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen mit Standardabweichungen.

Substanz	Konzentr.	XTC	Stand. Abw.	HTC+	Stand. Abw.	HTC-	Stand. Abw.
TSH+ Staurop.	10mU/ml 100ng/ml	-35,33	7,72	-49,67	5,79	-71,50	3,50
TSH+ Staurop.	100mU/ml 100ng/ml	-35,00	7,07	-53,00	2,94	-75,50	0,50
TSH+ ddA	10mU/ml 100ng/ml	13,67	18,55	10,00	5,72	-5,00	9,00
TSH+ ddA	100mU/ml 100ng/ml	4,00	13,49	11,33	6,94	9,50	3,50



#### 4. Diskussion

Der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die VEGF-Sekretion der drei beschriebenen Zelllinien bestätigt, dass das schilddrüsenpezifische Hormon TSH die Sekretion von VEGF in Hürthle Karzinomzellen (XTC) und in TSH-Rezeptor-positiven follikulären Karzinomzellen (HTC+) stimuliert. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen von Soh et al., 1996, überein. Doch TSH war in dieser Untersuchung keineswegs der potenteste Stimulator für die VEGF-Sekretion. Die größte Steigerung der VEGF-Sekretion lässt sich bei XTC mit TGF- $\beta$  erreichen. Einen bedeutend kleineren Effekt haben EGF und TGF- $\alpha$ , die ebenfalls eine Stimulation der VEGF-Sekretion bewirken. In ihrem Ausmaß liegen sie jedoch weit hinter der Stimulation mit TSH und TGF- $\beta$  zurück. Keinerlei Effekt auf die VEGF-Sekretion der XTC-Zelllinie zeigt die Stimulation mit IGF-1, bFGF, HGF, PIGF und PDGF.

Auch bei der HTC+ Zelllinie erweist sich TGF- $\beta$  als der stärkste Stimulator für die VEGF-Sekretion. Im Gegensatz zu XTC führt jedoch die Stimulation mit EGF und TGF- $\alpha$  zu keiner sicheren Veränderung der VEGF-Sekretion. Ein kleiner stimulativer Effekt lässt sich ferner noch bei HGF beobachten. HTC+ zeigt keinerlei Steigerung der VEGF-Sekretion unter der Stimulation mit TGF- $\alpha$ , IGF-1, bFGF, PIGF und PDGF.

In Abwesenheit eines TSH-Rezeptors eröffnen sich offenbar alternative Wege der VEGF-Stimulation. Bei HTC-, der TSH-Rezeptor negativen Variante der HTC+ Zelllinie, zeigt sich, wie erwartet, kein Effekt auf die Stimulation mit TSH. Hier liegt ein deutliches Ansprechen auf EGF vor. Auch erfolgt hier bereits eine Stimulation bei einer kleineren Konzentration von EGF, in denen sich bei den anderen Zelllinien noch keinerlei Effekt zeigt. Auch TGF- $\alpha$ , welches den gleichen Signaltransduktionsweg beschreitet wie EGF, führt bei HTC- zu einer Stimulation. Vergleichbar mit HTC+ lässt sich ein leichter Effekt bei HGF beobachten. Und kontrovers zu den anderen beiden Zelllinien scheint auch PIGF einen leicht stimulierenden Effekt auf die VEGF-Sekretion von HTC- zu haben. TGF- $\beta$  führt, wie auch schon bei XTC und HTC+, zu einer Verstärkung der VEGF-Sekretion. Jedoch ist TGF- $\beta$  bei HTC- nicht als der potenteste Stimulator anzusehen, da sich mit EGF

und TGF- $\alpha$  stärkere Stimulationen hervorrufen lassen. Keinerlei Effekte lassen sich bei IGF-1, bFGF und PDGF beobachten.

Diese Ergebnisse bezüglich des Einflusses von TSH und den übrigen oben beschriebenen Wachstumsfaktoren ließen sich im Weiteren durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe in Northern Blot Analysen der VEGF mRNA bestätigen. Hierzu wurden die drei Schilddrüsenzelllinien nach den gleichen Konditionen mit den Wachstumsfaktoren inkubiert, anschließend die RNA isoliert und mittels Northern Blot analysiert. Hier zeigten sich in drei unabhängigen Experimenten vergleichbare Ergebnisse zu den oben beschriebenen VEGF-ELISA Daten für alle hier untersuchten Zelllinien (Hoffmann et al., 2004).

Der stimulierende Effekt von TGF- $\beta$  scheint zunächst im Widerspruch zu dem mehrfach beschriebenen wachstumshemmenden Effekt auf Schilddrüsenzellen zu stehen. Es konnte gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  in follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen *in vitro* Wachstum, Migration und Invasion hemmt (Hoelting et al., 1994). Der maximale Effekt wurde in dieser Arbeit bei einer Konzentration von 10ng/ml TGF- $\beta$  erreicht. Bereits zuvor konnte demonstriert werden, dass TGF- $\beta$  auch indirekt wachstumshemmend auf Schilddrüsenzellen wirkt, indem es den wachstumsstimulierenden Effekt von IGF, EGF, TGF- $\alpha$  und TSH hemmt (Grubeck-Loebenstein et al., 1989).

Doch bei Untersuchungen des direkten Einflusses von TGF- $\beta$  auf die VEGF-Sekretion konnte zuvor in anderen Tumorentitäten bereits mehrfach ein stimulierender Effekt des TGF- $\beta$  gezeigt werden. So wurde zum Beispiel eine signifikante *in vitro* und *in vivo* Stimulation der VEGF-Sekretion bei pleuralen Mesothelzellen beobachtet (Lee et al., 2002). Es zeigte sich ferner eine reduzierte VEGF-Sekretion bei Costimulation mit Anti-TGF- $\beta$  Antikörpern. Auch bei *in vitro* Untersuchungen von Maus- und Rattenhypophysenzellen konnte durch TGF- $\beta$  eine Steigerung der VEGF-Sekretion erreicht werden (Renner et al., 2002). Diese Hypophysenzellen sezernieren verschiedene Isoformen von TGF- $\beta$  und bei einer Konzentration von 10ng/ml TGF- $\beta$  kam es zu einer 5- bis 10-fachen Steigerung der VEGF-Sekretion. Bei höheren Konzentrationen von TGF- $\beta$  konnte keine weitere Stimulation mehr erreicht werden.

Die Stimulation der VEGF-Sekretion durch HGF bei HTC+ und HTC- stimmt mit den Beobachtungen von Scarpino et al., 2003 überein, bei der in papillären Schilddrüsentumorzellen eine Zunahme der VEGF-Sekretion unter der Stimulation von 25ng/ml HGF erreicht wurde. Andererseits hatte die Stimulation mit HGF bei XTC keinen Effekt, obwohl bereits nachgewiesen werden konnte, dass in dieser Zelllinie eine Überexpression des HGF-Rezeptors vorliegt. Dies passt eher zu der Theorie, dass die HGF-Rezeptor Überexpression keinerlei Relation zu Tumorgröße und Lymphknotenmetastasierung zeigt (Schulte et al., 1998).

PIGF, ein eng strukturverwandter Wachstumsfaktor zu VEGF, löst selbst Neoangiogenese aus. Die Ergebnisse dieser Untersuchung scheinen mit der Vermutung zu korrelieren, dass PIGF bei bösartigen Schilddrüsenzellen nicht mit der Neoangiogenese verbunden ist (Ziche et al., 1997), oder zumindest nicht die Sekretion von VEGF stimuliert. In der HTC- Zelllinie jedoch schien es zu einer leichten Stimulation zu kommen, was sich vielleicht durch das veränderte Ansprechen auf Wachstumsfaktoren bei Abwesenheit des TSH-Rezeptors erklären lässt. Diese Stimulation ist bereits in der gleichen Konzentration von PIGF bei Chronischer-Polyarthritits beobachtet worden (Bottomley et al., 2000). Hierbei zeigte eine in vitro Stimulation von Monozyten in Synovialflüssigkeit mit PIGF nach 24 und 72 Stunden eine deutliche Steigerung der VEGF-Sekretion, so dass eine enge Korrelation zwischen PIGF und VEGF in den Entzündungsreaktionen der chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen zu bestehen scheint.

PDGF wird von folliculären Schilddrüsentumorzellen produziert und wirkt in geringen Konzentrationen wachstumsfördernd, während es in hohen Konzentrationen zur Apoptose führt (Goretzki et al., 2000). Diese Untersuchung zeigte, dass PDGF nicht über eine Stimulation von VEGF wachstumsfördernd zu sein scheint. Es ist aber auch möglich, dass die eingesetzte Konzentration von PDGF bereits zu hoch war, so dass eine Apoptose induziert wurde und daraufhin kein VEGF mehr sezerniert werden konnte.

In dieser Untersuchung konnte kein stimulierender Effekt von IGF-1 auf die VEGF-Sekretion in vitro gezeigt werden, obwohl bereits nachgewiesen werden konnte, dass maligne Schilddrüsenzellen IGF-1 sezernieren (Duh et al., 1995). Dies

steht im Widerspruch zu anderen Untersuchungen, in denen ein stimulierender Effekt von IGF-1 auf die VEGF-Sekretion nachgewiesen werden konnte. So zeigten zum Beispiel schlecht differenzierte Karzinomzellen der Schilddrüse bereits unter Konzentrationen von 100, 200 und 300ng/ml IGF-1 für 8 Stunden eine Stimulation der VEGF-Sekretion (Poulaki et al., 2003). Auch Kolon-Karzinomzellen zeigten in einem in vitro Versuch nach einer Stimulation von 6 Stunden mit 100ng/ml IGF-1 eine deutliche Steigerung der VEGF-Expression (Fukuda et al., 2002). Und in einem in vivo Versuch in männlichen Nacktmäusen mit menschlichen Pankreaskarzinom konnte bei einer autocrinen Aktivierung des IGF-Rezeptors eine Steigerung der VEGF-Expression nachgewiesen werden (Stoeltzing et al., 2003).

1998 konnte im Tierexperiment gezeigt werden, dass bFGF eine wichtige Rolle bei der Vergrößerung der Arterien spielt (Singh et al., 1998). Hierbei wurde bei japanischen weißen Hasen eine arteriovenöse Fistel geschaffen und mittels Western Blotting die Konzentration an bFGF unter normaler und unter verstärkter Durchblutung in den Endothel- und glatten Muskelzellen der Gefäße nach 1, 3 und 7 Tagen gemessen. Glatte Muskelzellen, die unter normaler Durchblutung kein bFGF exprimierten, zeigten eine zunehmende Expression von bFGF unter erhöhter Durchblutung. Simultan zu der Erhöhung der bFGF-Konzentration in den glatten Muskelzellen konnte eine Vergrößerung der Arterien beobachtet werden. Auch wenn bFGF von Schilddrüsentumorzellen produziert wird (Duh et al., 1995), so konnte die aktuelle Arbeit erstmalig zeigen, dass der gefäßneubildende Effekt von bFGF nicht mit einer Erhöhung der VEGF-Sekretion verbunden ist.

Während EGF und TGF- $\alpha$  in der HTC- Zelllinie einen deutlichen stimulativen Effekt der VEGF-Sekretion zeigen, scheint TGF- $\alpha$  in der XTC Zelllinie nur einen leichten und in der HTC+ Zelllinie gar keinen Effekt zu haben.

Dies scheint für TGF- $\alpha$  vergleichbar mit der Untersuchung von Lohrer zu sein, in der verschiedene Hormon-inaktive Hypophysenadenomzellen untersucht wurden (Lohrer et al., 2001). Alle Zelllinien sezernierten in vitro VEGF, aber nur 4 von 7 Zelllinien ließen nach 24 Stunden mit einer Stimulation von 0,1-10ng/ml TGF- $\alpha$  eine Steigerung der VEGF-Expression beobachten. Für Keratozyten konnte jedoch bereits 1994 bei einer Untersuchung im Zusammenhang von Psoriasis eine in vitro Stimulation der VEGF-Synthese durch TGF- $\alpha$  gezeigt werden (Detmar et al., 1994).

Auch für EGF konnte ein stimulierender Effekt auf die VEGF-Sekretion in vitro bereits nachgewiesen werden. 2002 wurden Endometrium-Stromazellen zwischen 12 und 48 Stunden in einem mit dieser Arbeit vergleichbaren Versuchsaufbau mit EGF stimuliert und dort resultierte sowohl eine dosis- als auch eine zeitabhängige Stimulation der VEGF-Sekretion, die mit ELISA nachgewiesen wurde (Kawano et al., 2002).

Die miteinander vergleichbaren Effekte von EGF und TGF- $\alpha$  lassen sich mit dem gemeinsamen Rezeptor und Signaltransduktionsweg der beiden Wachstumsfaktoren erklären (Hoelting et al., 1995, Haugen et al., 1993). Das Ansprechen der Wachstumsfaktoren in Bezug auf die VEGF-Sekretion scheint jedoch von Zelllinie zu Zelllinie, insbesondere bezüglich der Anwesenheit eines funktionellen TSH-Rezeptors, zu variieren.

Die Arbeit konnte auch eindeutig zeigen, dass der Schwerpunkt der TSH vermittelten Stimulation der VEGF-Sekretion über den PKC Signaltransduktionsweg verläuft. Die Stimulation lässt sich durch den PKC Agonisten TPA hervorrufen und in einer Costimulation von TSH und Stauroporin, einem PKC Antagonisten, ist dieser Prozess vollständig hemmbar.

Diese Untersuchung zeigt jedoch auch, dass es sich lediglich um den Schwerpunkt der Signaltransduktion handelt, denn unter der Stimulation mit PKA Agonisten wie Cholera toxin und Forskolin ließen sich ebenfalls VEGF-Sekretionssteigerungen hervorrufen. Dieser Effekt ist bei Costimulation mit TSH und dem PKA Antagonisten ddA in 2 Zelllinien reversibel, jedoch nicht vollständig hemmbar.

Dieser Signaltransduktionsweg via PKC wird ebenfalls als Schwerpunkt des TSH vermittelten Wachstums und der Invasion bei follikulären Schilddrüsentumorzellen beschrieben (Hoelting et al., 1993). Bereits 1986 wurde vermutet, dass der Schwerpunkt des TSH vermittelten Wachstums von malignen Schilddrüsenzellen nicht über den Signaltransduktionsweg via PKA vermittelt wird (Goretzki et al., 1986). In dieser Untersuchung zeigte die Stimulation mit dem membrangängigen Analog zu cAMP, dem second messenger in der PKA Signaltransduktionskaskade, keine Wachstumssteigerung der Schilddrüsenzellen in vitro. Auch die Stimulation mit Forskolin, einem weiteren Agonisten des PKA Signaltransduktionsweges, zeigte bis zu Konzentrationen bis  $10^{-5}$  mmol/l keinen Wachstumseffekt. Bei einer Untersuchung

mit 2 papillären und einer anaplastischen Schilddrüsentumorzelllinie konnte der PKC Signaltransduktionsweg als Schwerpunkt für die Expression von ICAM-1 identifiziert werden (Bassi et al., 1998). ICAM-1 ist ein Molekül der Zellmembran, welches eine für die Immunantwort wichtige Zell-Zell-Adhäsion vermittelt. Dessen Expression konnte bei den oben beschriebenen Schilddrüsenzellen mit TPA verstärkt und mit Stauroporin gehemmt werden.

Obwohl die Aktivität von PKC in Schilddrüsentumorzellen weniger abnorm ist als die des PKA Signaltransduktionsweges, scheint hierüber der Schwerpunkt für die Vermittlung von Wachstum, Invasion und VEGF-Expression zu liegen (Duh et al., 1995).

Die Stimulation der VEGF-Sekretion durch EGF, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  kann ebenfalls über eine PKC vermitteltes Signal erklärt werden, da hier ein teilweise gemeinsamer Signaltransduktionsweg besprochen wird (Hoelting et al., 1995).

Die hier gezeigte Dominanz der PKC vermittelten Steigerung der VEGF-Sekretion in vitro kann als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen und vor allem für neue therapeutische Konzepte dienen. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass eine Blockierung des Signaltransduktionsweges über PKC mit Stauroporin zu einer deutlichen Reduzierung der VEGF-Sekretion aller drei malignen Schilddrüsenzelllinien führt. Zudem könnte hiermit auch ein Teil des Signaltransduktionsweges der neben TSH potentesten stimulierenden Wachstumsfaktoren (EGF, TGF- $\beta$ , TGF- $\alpha$ ) für die VEGF-Sekretion entscheidend beeinflusst werden, um die VEGF-Sekretion zu hemmen und somit eine Progression oder Rezidivbildung eines Schilddrüsenkarzinoms zu vermindern. Zudem zeigt sich bei Abwesenheit eines funktionellen TSH-Rezeptors ein Ansprechen weiterer Wachstumsfaktoren und somit alternative Wege zur Stimulation der VEGF-Sekretion.

Die Hemmung der Signaltransduktion über PKC war nach Abschluss der Arbeit tatsächlich Ausgangspunkt zur Entwicklung von Angiogeneseinhibitoren bei Schilddrüsenkarzinomen, und zeigt aktuell klinische Erfolge (Carlomagno et al., 2006, Kim et al., 2006).

## **5. Zusammenfassung**

Um eine Tumorgröße zu überschreiten, bis zu der sich die Zellen durch Diffusion aus der Umgebung ernähren können, ist eine Angiogenese notwendig. So benötigen auch Schilddrüsentumoren Angiogenese und ein wichtiger Botenstoff hierfür ist VEGF (Vascular endothelial growth factor). In der Literatur sind andere Wachstumsfaktoren, die das Wachstum von Schilddrüsenzellen und deren Angiogenese beeinflussen, beschrieben. Der wichtigste Wachstumsfaktor und Hauptregulator für Schilddrüsenzellen ist das Thyroideastimulierende Hormon (TSH), dessen Einfluss auf VEGF zwar bereits gezeigt werden konnte, aber dessen Postrezeptorsignaltransduktion noch nicht bekannt ist.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss verschiedener Wachstumsfaktoren auf die VEGF-Sekretion beobachtet werden. Besondere Beachtung wurde hierbei dem Einfluss des Vorhandenseins eines funktionellen TSH-Rezeptors auf die VEGF-Sekretion von TSH-Rezeptor-positiven und -negativen Zelllinien geschenkt. Zum anderen erfolgte eine Analyse der TSH gesteuerten VEGF-Sekretion durch Beeinflussung verschiedener Punkte der Signaltransduktionskaskade des TSH-Rezeptors mit stimulierenden und inhibierenden Substanzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die VEGF-Sekretion von drei malignen Schilddrüsenzellen *in vitro* untersucht. Hierbei wurde eine gut differenzierte Zelllinie (XTC), basierend auf einem Hürthle-Schilddrüsenkarzinom, und eine follikuläre Zelllinie, die keinen eigenen TSH-Rezeptor besitzt (HTC-), sowie deren mit dem TSH-Rezeptor transfizierte Variante (HTC+) verwendet.

Nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren (TSH, EGF, TGF- $\alpha$ , IGF-1, bFGF, HGF, PlGF, TGF- $\beta$ ) wurde die VEGF-Sekretion der Tumorzellen mittels ELISA ermittelt. Die Postrezeptorsignaltransduktion des TSH-Rezeptors wurde durch Stimulation (mit Cholera-Toxin, 8-Br-cAMP, Forskolin, TPA) und Inhibition (mit ddA, Staurosporin) unter basalen und unter TSH-stimulierten Bedingungen analysiert. Hierbei wurde auch die VEGF-Sekretion mittels ELISA aus dem Zellüberstand ermittelt.

Im Vergleich der Wachstumsfaktoren war TSH nicht der potenteste Stimulator für die VEGF-Sekretion. Zwar erhöhte TSH dosisabhängig die VEGF-Sekretion in XTC und HTC+ Zellen um bis zu maximal 37% bzw. 20%, aber EGF stimulierte die Sekretion

bei HTC+ um 26% während TGF- $\beta$  eine Steigerung der VEGF-Sekretion um 63% und 46% hervorrief. PlGF und TGF- $\alpha$  stimulierten bei TSH-Rezeptor positiven Zellen nicht die VEGF-Sekretion, machten dies jedoch bei HTC-.

Die Postrezeptorsignaltransduktion des TSH-Rezeptors bezüglich der VEGF-Sekretion verlief eher über die Proteinkinase C (PKC) als über die Proteinkinase A (PKA). Denn eine Hemmung der PKC, auch unter simultaner Stimulation mit TSH, resultierte in einem Rückgang der VEGF-Sekretion um 30 bis 70%, während eine Hemmung der PKA nur zu einem deutlich geringeren Rückgang führte.

Es zeigte sich also, dass EGF und TGF- $\beta$  die Sekretion von VEGF in malignen Schilddrüsenzelllinien in vitro stärker steigern als TSH. In TSH-Rezeptor negativen Zellen erhöhten andere zusätzliche Wachstumsfaktoren, wie TGF- $\alpha$  oder PlGF, die Sekretion. Die TSH vermittelte Steigerung der VEGF-Sekretion wurde hauptsächlich, aber nicht ausschließlich, über die PKC vermittelt.

Die Hemmung der Proteinkinase C und somit unter anderem die Antagonisierung von Wachstumsfaktoren wie EGF, TGF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  hat das Potential zur Entwicklung einer Therapie zur Unterbindung der Neoangiogenese in Schilddrüsenkarzinomen.



## 6. Literatur

- Akslen LA, Varhaug JE (1995) **Oncoproteins and tumor progression in papillary thyroid carcinoma: presence of epidermal growth factor receptor, c-erbB-2 protein, estrogen receptor related protein, p21-ras protein, and proliferation indicators in relation to tumor recurrences and patient survival.** Cancer 76: 1643-54
- Bassi V, de Riu S, Feliciello A, Altomonte A, Allevato G, Rossi G, Fenzi GF (1998) **Intercellular adhesion molecule-1 is upregulated via the protein C pathway in human thyroid cancer cell lines.** Thyroid 8: 23-28
- Bottomley MJ, Webb NJA, Watson CJ, Holt L, Burkhari M, Denton J, Freemont AJ, Brenchley PEC (2000) **Placenta growth factor induces vascular endothelial growth factor secretion from mononuclear cells and is co-expressed with VEGF in synovial fluid.** Clin Exp Immunol 119: 182-88
- Breier G (2000) **Angiogenesis in Embryonic Development – a review.** Placenta 21: 11-15
- Carlomagno F, Anaganti S, Guida T, Salvatore G, Troncone G, Wilhelm SM, Santoro M (2006) **BAY 43-9006 inhibition of oncogenic RET mutants.** J Natl Cancer Inst 1: 326-34
- Chen CH, Chen JF, Yang BY, Liu RT, Tung SC, Chien WY, LU YC, Kuo MC, Hsieh CJ, Wang PW (2004) **Bone mineral density in women receiving thyroxine suppressive therapy for differentiated thyroid carcinoma.** J Formos Med Assoc 103: 442-47
- Clark OH (1981) **TSH suppression in the management of thyroid nodules and thyroid cancer.** World J Surg 5: 39-47
- Clark OH, Duh QY (1997) **Textbook of endocrine surgery.** Elsevier Inc.
- Derwahl M, Kuemmel M, Goretzki P, Schatz H, Broecker M (1993) **Expression of the human TSH receptor in a human carcinoma cell line that lacks an endogenous TSH receptor: growth inhibition by cAMP.** Biochem Biophys Res Comm 191: 1131-38
- Detmar M, Brown LF, Claffey KP, Yeo KT, Kocher O, Jackman RW, Berse B, Dvorak HF (1994) **Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis.** J Exp Med 180: 1141-46
- Duh QY, Grossman RF (1995) **Thyroid growth factors, signaling pathways, and oncogenes.** Surg Clin North Am 75:421-37
- Dvorak HF (1986) N Engl J Med 315: 1650-59
- Ferrara N (2000) **Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis.** Recent Prog Horm Res 55: 15-35
- Folkman J (1971) **Tumor angiogenesis: therapeutic implications.** N.Engl. J. Med 285:1182-87
- Führer D, Paschke R (1999) **Mutationen im TSH-Rezeptorgen: Pathogenetische Bedeutung und klinische Relevanz.** Dtsch med Wschr 124:662-69
- Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL (2002) **Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signalling in colon cancer.** J Biol Chemistry 277: 38205-11
- Goretzki PE, Koob R, Koller T, Simon R, Brandscheid D, Clark OH, Röher HD (1986) **The effect of thyrotropin an cAMP on DNA synthesis and cell growth of human thyrocytes in monolayer culture.** Surgery 100: 1053-61
- Goretzki PE, Simon D, Dotzenrath C, Schulte KM, Röher HD (2000) **Growth regulation of thyroid and thyroid tumors in humans.** World J Surg 24: 913-22
- Gorgoulis V, Aninos D, Priftis C, Evagelopoulou C, Karameris A, Kanavaros P, Pandidos DA (1992) **Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors.** In Vivo 6: 291-96
- Grubeck-Loebenstein B, Buchan G, Sadeghi R, Kissonerghis M, Londei M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H, Waldhäusl W, Feldmann M (1989) **Transforming growth factor beta regulates thyroid growth.** J Clin Invest 83:764-70
- Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR (1993) **Demonstration of a TGF-alpha-EGF-receptor autocrine loop and c-myc protein over-expression in papillary thyroid carcinomas.** Int J Cancer 19: 37-43
- Heldin NE, Cvejic D, Smeds S, Westermark B (1991) **Coexpression of functionally active receptors for thyrotropin and platelet-derived growth factor in human thyroid carcinoma cells.** Endocrinology 129:2187-93
- Hill LD, Beebe HG, Hipp R, Jones HW (1974) **Thyroid suppression.** Arch Surg 108: 403-05
- Hoelting T, Duh QY, Clark OH, Herfarth C (1996) **The regulation of proliferation and invasion in differentiated thyroid cancer by growth factors.** Exp Clin Endocrinol Diabetes 104:29-31

- Hoelting T, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY (1994) **Epidermal growth factor enhances proliferation, migration and invasion in follicular and papillary thyroid cancer in vitro and in vivo.** J Endocrinol Metab 79: 401-08
- Hoelting T, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY (1995) **Epidermal growth factor- and transforming growth factor alpha- stimulated invasion and growth of follicular thyroid cancer cells can be blocked by antagonism to the EGF receptor and tyrosine kinase in vitro.** Eur. J. Endocrinol 132:229-35
- Hoelting T, Tezelman S, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH (1993) **Thyrotropin stimulates invasion and growth of follicular thyroid cancer cells via PKC- rather than PKA-activation.** Biochem Biophys Res Commun 195: 1230-36
- Hoelting T, Zielke A, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY (1994) **Transforming growth factor- $\beta$ 1 is a negative regulator for differentiated thyroid cancer: studies of growth, migration, invasion and adhesion of cultured follicular and papillary thyroid cancer cell lines.** J Clin Endocrinol Metab 79:806-13
- Hoffmann S, Hofbauer LC, Scharrenbach V, Wunderlich A, Hassan I, Lingelbach S, Zielke A (2004) **Thyrotropin-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors.** J Endocrinol Metab 89: 6139-45
- Hoffmann S, Nies C, Rothmund M (1999) **Surgery for thyroid carcinoma.** Ther Umschau 56: 624-26
- Hundahl SA, Fleming ID, Fremgen AM, Menck HR (1998) **A national cancer data base report on 53,856 cases of thyroid carcinoma treated in the U.S., 1985-1995.** Cancer 83: 2638-48
- Kawano Y, Nakamura S, Nasu K, Narahara H, Miyakawa I (2002) **The effect of epidermal growth factor on vascular endothelial growth factor secretion by endometrial stromal cells.** Clin Exp Med 2: 69-75
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT (1989) **Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF.** Science 246: 1309-12
- Kim DW, Jo YS, Jung HS, Chung HK, Song JH, Park KC, Hwang JH, Rha SY, Kweon GR, Lee SJ, Jo KW (2006) **An orally administered multitarget tyrosine kinase inhibitor, SU 11248, is a novel potent inhibitor of thyroid oncogenic RET/papillary thyroid cancer kinases.** J Clin Endocrinol Metab 91: 4070-76
- Lee YCG, Melkerneker D, Thompson PJ, Light RW, Lane KB (2002) **Transforming growth factor- $\beta$  induces vascular endothelial growth factor elaboration from pleural mesothelial cells in vivo and in vitro.** Am J Respir Crit Care Med 165: 88-94
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) **Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenetic mitogen.** Science 246: 1306-09
- Lohrer P, Gloddek J, Hopfner U, Losa M, Uhl E, Pagotto U, Stalla GK, Renner U (2001) **Vascular endothelial growth factor production and regulation in rodent and human pituitary tumor cells in vitro.** Neuroendocrinol 74: 95-105
- Mazzaferri EL, Young RL, Oertel JE, Kammerer WT, Page CP (1977) **Papillary thyroid carcinoma: the impact of therapy in 576 patients.** Medicine (Baltimore) 56: 171-96
- McDonald KH, Singh KK, Rosenfeld KG, Wesley R, Skarulis MC, Merryman PK, Cullinane A, Costello R, Patterson A, Egerman T, Bernstein DM, Pucino F, Csako G (2004) **Is thyroid hormone suppression therapy prothrombotic?** J Clin Endocrinol Metab 89: 4469-73
- McDonald RJ, Wu SY, Blahd WH (1991) **Malignant transformation of a Hurthle cells tumor: case report and survey of the literature.** J Nucl Med 32: 1266-1269
- McGriff NJ, Csako G, Gourgiotis L, Lori CG, Pucino F, Sarlis NJ (2002) **Effects of thyroid hormone suppression therapy on adverse clinical outcomes in thyroid cancer.** Ann Med 34: 554-64
- Poulaki V, Mitsiades CS, McMullan C, Sykoutri D, Fanourakis G, Kotoula V, Tseleni-Balafouta S, Koutras DA, Mitsiades N (2003) **Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin like growth factor 1 in thyroid carcinomas.** J Clin Endocrinol Metab 88: 5392-5398
- Renner U, Lohrer P, Schaaf L, Feirer M, Schmitt K, Onofri C, Arzt E, Stalla GK (2002) **Transforming growth factor- $\beta$  stimulates vascular endothelial growth factor production by folliculostellate pituitary cells.** Endocrinology 143: 3759-65
- Reynolds LP, Redmer D (2001) **Angiogenesis in placenta.** Biology of reproduction 64: 1033-40
- Ruco LP, Stoppacciaro A, Ballarini F, Prat M, Scarpino S (2001) **Met protein and hepatocyte growth factor in papillary carcinoma of the thyroid: evidence for a pathogenetic role in tumourigenesis.** J Pathol 194: 4-8

- Scarpino S, Cancellario d'Alene F, Di Napoli A, Ballarini F, Prat M, Ruco LP (2003) **Papillary carcinoma of the thyroid: evidence for a role for hepatocyte growth factor in promoting tumour angiogenesis.** J Pathol 199: 243-50
- Schulte KM, Antoch G, Finken-Eigen M, Köhrer K, Simon D, Goretzki PE, Röher HD (1998) **Regulation of the HGF-receptor c-met in the thyroid gland.** Exp Clin Endocrinol Diabetes 106: 310-18
- Shaha A (2004) **Implications of prognostic factors and risk groups in the management of differentiated thyroid cancer.** Laryngoscope 114: 393-402
- Singh TM, Abe KY, Sasaki T, Zhuang YJ, Masuda H, Zarins CK (1998) **Basic fibroblast growth factor expression precedes flow-induced arterial enlargement.** J Surg Research 77: 165-173
- Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HW, Wong MG, Garcia YK, Min YD, Grossman RF, Siperstein AE, Clark OH (1997) **Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid.** J Clin Endocrinol Metab 82: 3741-47
- Soh EY, Eigelberger MS, Kim KJ, Wong MG, Young DM, Clark OH, Duh QY (2000) **Neutralizing vascular endothelial growth factor activity inhibits thyroid cancer growth in vivo.** Surgery 128: 1059-66
- Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, BS, Meng YG, Siperstein AE, Clark OH, Duh QY (1996) **Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines.** Surgery 120:944-47
- Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, Fan F, Parikh AA, Bucana CD, Evans DB, Semenza GL, Ellis LM (2003) **Regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-1 receptor autocrine loop in human pancreatic cancer.** Am J Pathol 163: 1001-1011
- Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G, Fusco A, Persico MG (1995) **Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with the malignancy in human thyroid tumors and cell lines.** Oncogene 11: 1569-79
- Westermarck K, Karlsson FA, Westermarck B (1983) **Epidermal growth factor modulates thyroid growth and function in culture.** Endocrinol 112: 1680-86
- Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, Paoletti I, Barra A, Tucci M, Parise G, Vincenti V, Granger HJ, Viglietto G, Persico MG (1997) **Placenta Growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic.** Lab Invest 76: 517-31
- Zielke A (1997) **Wachstumsfaktoren und Onkogene bei Schilddrüsenkarzinomen.** Onkologe 3: 7-15
- Zielke A, Hoffmann S, Plaul U, Duh QY, Clark OH, Rothmund M (1999) **Pleiotropic effects of thyroid stimulating hormone in a differentiated thyroid cancer cell line. Studies on proliferation, thyroglobulin secretion, adhesion, migration and invasion.** Exp Clin Endocrinol Diabetes 107: 361-69
- Zielke A, Tezelman S, Jossart GH, Wong M, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH (1998) **Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hürthle cell origin.** Thyroid 8: 475-83

Tabelle 1a: Optische Dichte (Mittelwert aus zwei Messungen) im VEGF-ELISA der **Zelllinie XTC**: unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren in drei unabhängigen Versuchen.

Substanz	Konzentration	1. Messung		2. Messung		3. Messung	
		basal	konditioniert	basal	konditioniert	basal	konditioniert
TSH	1mU/ml	0,788	0,885	0,987	1,109	0,795	0,993
	10mU/ml	0,788	1,065	0,987	1,176	0,795	1,087
	100mU/ml	0,788	0,949	0,987	1,224	0,795	1,158
EGF	1ng/ml	2,137	2,129	2,899	2,841	2,231	2,261
	10ng/ml	2,137	2,292	2,899	3,181	2,231	2,453
	100ng/ml	2,137	2,167	2,899	3,007	2,231	2,272
TGF- $\alpha$	10ng/ml	0,895	0,980	2,137	2,285	2,899	2,623
	100ng/ml	0,895	0,951	2,137	2,562	2,899	3,129
IGF-1	1ng/ml	2,137	1,973	2,899	2,546	2,231	2,092
	10ng/ml	2,137	2,112	2,899	3,045	2,231	2,212
	100ng/ml	2,137	1,777	2,899	2,700	2,231	2,069
bFGF	10ng/ml	1,342	1,103	2,231	2,023	0,987	0,923
	100ng/ml	1,342	1,250	2,231	2,174	0,987	0,966
HGF	10ng/ml	2,040	2,129	2,040	2,075	2,176	2,240
	100ng/ml	2,040	2,105	2,040	2,167	2,176	2,005
PIGF	10ng/ml	2,137	2,258	2,899	2,880	2,231	2,293
	100ng/ml	2,137	2,153	2,899	2,897	2,231	2,306
PDGF	10ng/ml	1,342	0,992	2,176	1,925	2,176	1,988
TGF- $\beta$	0,01ng/ml	1,455	0,960	1,259	0,742	2,176	1,883
	0,1ng/ml	1,455	1,289	1,259	1,226	2,176	1,949
	1ng/ml	0,683	1,116	0,683	1,065	0,683	1,018
	10ng/ml	0,683	1,163	0,683	1,063	0,683	1,127

Originalmesswerte

7. Anhang

Tabelle 1b: Optische Dichte (Mittelwert aus zwei Messungen) im VEGF-ELISA der **Zelllinie XTC**: unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit Effektoren der Signaltransduktion des TSH-Rezeptors in drei unabhängigen Versuchen.

Substanz	Konzentration	1. Messung		2. Messung		3. Messung	
		basal	konditioniert	basal	konditioniert	basal	konditioniert
Choleratoxin	10ng/ml	1,090	1,351	2,413	2,873	2,231	2,653
	100ng/ml	1,090	1,373	2,413	2,877	2,231	2,675
8-BrcAMP	10ng/ml	1,090	0,909	2,413	2,067	2,231	2,020
	100ng/ml	1,090	0,818	2,413	2,267	2,231	2,027
Forskolin	10ng/ml	2,573	2,675	2,231	2,237	0,683	0,705
	100ng/ml	2,573	2,489	2,231	2,289	0,683	0,698
TPA	10ng/ml	2,413	2,479	2,231	2,617	0,683	0,834
	100ng/ml	2,413	2,685	2,231	2,569	0,683	0,726
ddA	10ng/ml	2,245	2,185	2,740	2,777	2,586	2,448
	100ng/ml	2,245	2,295	2,740	2,665	2,586	2,280
Stauroporin	10ng/ml	2,245	2,422	2,740	2,880	2,586	2,608
	100ng/ml	2,245	1,425	2,740	1,840	2,586	1,156
TSH + Stauroporin	10mU/ml 100ng/ml	2,089	1,514	2,096	1,419	2,188	1,179
TSH + Stauroporin	100mU/ml 100ng/ml	2,089	1,565	2,096	1,251	2,188	1,311
TSH + ddA	10mU/ml 100ng/ml	2,089	2,292	2,096	2,910	2,188	2,036
TSH + ddA	100mU/ml 100ng/ml	2,089	2,198	2,096	2,189	2,188	2,239

Tabelle 2a: Optische Dichte (Mittelwert aus zwei Messungen) im VEGF-ELISA der **Zelllinie HTC +**: unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren in drei unabhängigen Versuchen.

Substanz	Konzentration	1. Messung		2. Messung		3. Messung	
		basal	konditioniert	basal	konditioniert	basal	konditioniert
TSH	1mU/ml	0,921	1,084	1,203	1,422	1,790	1,693
	10mU/ml	0,921	1,004	1,203	1,461	1,790	1,819
	100mU/ml	0,921	1,150	1,203	1,529	1,790	1,884
EGF	1ng/ml	1,468	1,421	1,468	1,009	1,492	1,343
	10ng/ml	1,468	1,649	1,468	1,803	1,795	2,580
	100ng/ml	1,203	1,622	1,468	1,535	1,795	2,503
TGF- $\alpha$	10ng/ml	1,203	1,163	1,203	1,242	1,335	1,388
	100ng/ml	1,203	1,189	1,203	1,279	1,335	1,241
IGF-1	1ng/ml	1,468	1,381	1,468	1,078	1,256	1,101
	10ng/ml	1,203	1,010	1,468	1,234	1,256	0,969
	100ng/ml	1,203	1,047	1,468	1,321	1,256	1,190
bFGF	10ng/ml	1,394	1,554	1,203	1,186	1,795	1,885
	100ng/ml	1,394	1,603	1,203	1,199	1,795	1,938
HGF	10ng/ml	2,175	1,996	1,412	1,774	1,795	1,947
	100ng/ml	2,175	2,052	1,412	1,863	1,795	1,752
PIGF	10ng/ml	1,394	1,392	1,203	1,247	1,203	1,196
	100ng/ml	1,394	1,399	1,203	1,330	1,203	1,191
PDGF	10ng/ml	1,394	1,283	1,203	1,028	1,335	1,199
TGF- $\beta$	0,01ng/ml	0,629	0,660	1,597	1,650	1,597	1,752
	0,1ng/ml	0,629	0,758	1,597	1,963	1,597	1,864
	1ng/ml	1,335	1,983	1,335	1,875	1,335	2,014
	10ng/ml	1,335	1,825	1,335	1,594	1,335	1,787

Tabelle 2b: Optische Dichte (Mittelwert aus zwei Messungen) im VEGF-ELISA der **Zelllinie HTC +**: unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit Effektoren der Signaltransduktion des TSH-Rezeptors in drei unabhängigen Versuchen.

Substanz	Konzentration	1. Messung		2. Messung		3. Messung	
		basal	konditioniert	basal	konditioniert	basal	konditioniert
Choleratoxin	10ng/ml	1,327	1,513	0,867	0,957	0,867	1,010
	100ng/ml	0,939	1,011	0,867	0,961	0,867	1,010
8-BrcAMP	10ng/ml	1,327	1,004	0,939	1,012	1,203	0,968
	100ng/ml	0,939	0,971	1,203	1,182	0,867	0,869
Forskolin	10ng/ml	1,327	1,289	0,939	1,073	1,492	1,621
	100ng/ml	0,939	1,223	1,203	1,499	0,867	0,990
TPA	10ng/ml	3,822	3,965	0,867	1,171	1,492	1,448
	100ng/ml	3,822	4,000	0,867	0,885	1,492	1,661
ddA	10ng/ml	1,658	1,635	1,685	1,706	1,303	1,423
	100ng/ml	1,658	1,744	1,685	1,735	1,303	1,275
Stauroporin	10ng/ml	2,109	2,226	1,658	1,890	1,685	2,077
	100ng/ml	2,109	1,233	1,658	1,061	1,685	1,290
TSH + Stauroporin	10mU/ml 100ng/ml	1,584	0,926	1,830	0,856	1,691	0,774
TSH + Stauroporin	100mU/ml 100ng/ml	1,584	0,701	1,830	0,874	1,691	0,829
TSH + ddA	10mU/ml 100ng/ml	1,584	1,805	1,830	1,832	1,691	1,961
TSH + ddA	100mU/ml 100ng/ml	1,584	1,658	1,830	2,096	1,691	1,940

Tabelle 3a: Optische Dichte (Mittelwert aus zwei Messungen) im VEGF-ELISA der **Zelllinie HTC -**: unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit Wachstumsfaktoren in drei unabhängigen Versuchen.

Substanz	Konzentration	1. Messung		2. Messung		3. Messung	
		basal	konditioniert	basal	konditioniert	basal	konditioniert
TSH	1mU/ml	2,449	2,440	2,249	2,235	2,268	2,472
	10mU/ml	2,449	2,436	2,249	2,297	2,268	2,322
	100mU/ml	2,449	2,606	2,249	2,406	2,268	2,372
EGF	1ng/ml	0,246	0,321	0,824	1,131	0,896	1,231
	10ng/ml	0,246	0,369	0,824	1,133	0,896	1,349
	100ng/ml	0,246	0,325	0,824	1,023	0,896	1,145
TGF- $\alpha$	10ng/ml	1,339	1,504	0,547	0,633	0,824	0,964
	100ng/ml	1,339	1,884	0,547	0,729	0,824	1,096
IGF-1	1ng/ml	0,199	0,202	1,339	1,355	0,824	0,786
	10ng/ml	0,199	0,197	1,339	1,387	0,824	0,756
	100ng/ml	0,199	0,199	1,339	1,346	0,824	0,828
bFGF	10ng/ml	1,339	1,268	0,824	0,831	0,896	0,854
	100ng/ml	1,339	1,318	0,824	0,699	0,896	0,827
HGF	10ng/ml	1,073	1,182	1,293	1,435	1,339	1,444
	100ng/ml	1,073	1,095	1,293	1,381	1,339	1,368
PIGF	10ng/ml	0,199	0,315	1,293	1,663	1,339	1,682
	100ng/ml	0,199	0,196	1,293	1,423	1,339	1,526
PDGF	10ng/ml	0,896	0,910	2,121	2,094	2,121	2,013
TGF- $\beta$	0,01ng/ml	2,168	2,177	2,121	2,138	1,679	1,692
	0,1ng/ml	2,168	2,207	2,121	2,059	1,679	1,732
	1ng/ml	2,168	2,450	2,121	2,564	1,679	2,299
	10ng/ml	2,168	2,629	2,121	2,430	1,679	2,320



Tabelle 3b: Optische Dichte (Mittelwert aus zwei Messungen) im VEGF-ELISA der **Zelllinie HTC** -: unter basalen Bedingungen und unter Stimulation mit Effektoren der Signaltransduktion des TSH-Rezeptors in drei unabhängigen Versuchen.

Substanz	Konzentration	1. Messung		2. Messung		3. Messung	
		basal	konditioniert	basal	konditioniert	basal	konditioniert
Choleratoxin	10ng/ml	0,711	0,811	0,294	0,331	0,564	0,685
	100ng/ml	0,711	1,089	0,294	0,437	0,564	0,808
8-BrcAMP	10ng/ml	0,307	0,322	0,294	0,285	0,564	0,576
	100ng/ml	0,307	0,358	0,294	0,283	0,564	0,633
Forskolin	10ng/ml	0,307	0,344	0,294	0,312	0,564	0,817
	100ng/ml	0,307	0,419	0,294	0,388	0,564	0,657
TPA	10ng/ml	0,711	0,839	0,294	0,343	0,564	0,724
	100ng/ml	0,711	0,955	0,294	0,441	0,564	0,698
ddA	10ng/ml	0,307	0,286	0,294	0,241	2,349	1,829
	100ng/ml	0,613	0,672	0,307	0,337	2,349	2,786
Stauroporin	10ng/ml	0,613	0,938	0,307	0,464	2,349	3,179
	100ng/ml	0,613	0,197	0,307	0,109	0,294	0,107
TSH + Stauroporin	10mU/ml	1,073	0,283	1,293	0,408	1,588	0,438
	100ng/ml						
TSH + Stauroporin	100mU/ml	1,073	0,268	1,293	0,294	1,588	0,409
	100ng/ml						
TSH + ddA	10mU/ml	1,073	0,937	1,293	1,341	1,588	1,492
	100ng/ml						
TSH + ddA	100mU/ml 100ng/ml	1,073	1,135	1,293	1,457	1,588	1,748

## Verzeichnis meiner akademischen Lehrer in Marburg

(in alphabetischer Reihenfolge)

- Prof. Dr. R. Arnold
- Prof. Dr. G. Aumüller
- Prof. Prof. Dr. Dr. K.-H. Austermann
- Prof. Dr. Dr. H.-D. Basler
- Prof. Dr. E. Baum
- PD. Dr. H. Christiansen
- Prof. Dr. F. Czubayko
- Prof. Dr. Dr. J. Daut
- Prof. Dr. M.O. Doss
- Prof. Dr. L. Gotzen
- Prof. Dr. P. Griss
- Dr. K. Grundmann
- Prof. Dr. R. Happle
- Prof. Dr. A. Hasilik
- Prof. Dr. R. Hofmann
- Prof. Dr. H. Jungclas
- Prof. Dr. H. F. Kern
- Prof. Dr. H.-D. Klenk
- Prof. Dr. V. Kretschmer
- Prof. Dr. J. C. Krieg
- Prof. Dr. P. Kroll
- Prof. Dr. H. Lennartz
- Prof. Dr. R. Moll
- Prof. Dr. Dr. U. Mueller
- Prof. Dr. J. Niessing
- Prof. Dr. W. H. Oertel
- Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt
- Prof. Dr. M. Rothmund
- Prof. Dr. S. Schäfer
- Prof. Dr. H. Schmidt
- Prof. Dr. J. Seitz
- Prof. Dr. B. Steiniger
- Prof. Dr. J. Sundermeyer
- Prof. Dr. K. Voigt
- Prof. Dr. E. Weihe
- Prof. Dr. J. A. Werner

## Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. Matthias Rothmund danke ich für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit zu dieser Dissertation in der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Zielke möchte ich für die Überlassung des Themas und ganz besonders für die wohlwollende und vorbehaltlose Unterstützung während der praktischen Durchführung dieser Arbeit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Herrn Dr. med. Sebastian Hoffmann danke ich für die wertvollen Hinweise während des experimentellen Teils und für die Unterstützung bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt ferner allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Andreas Zielke, Frau Dr. rer. nat. Annette Wunderlich, Frau Gabriele Schneider und Frau Susanne Lingelbach für die Einführung in das laborexperimentelle Arbeiten, für viele ergiebige Diskussionen sowie die tatkräftige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Ferner möchte ich mich bei meinen Eltern und nicht zuletzt bei meinem Ehemann Oliver Geyer bedanken, die mich stets in Geduld und Liebe unterstützt haben.