

Aus der Klinik  
für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg  
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH  
Standort Marburg

---

**Integrinexpression und integrinvermittelte VEGF-  
Produktion maligner Schilddrüsenzellen in vitro**

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

vorgelegt von

Tarik Amari aus Algier

Marburg, 2009

---

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:  
12.11.2009

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: Prof. Dr. med. A. Zielke

1. Korreferent: PD Dr. med. T. Wündisch

---

---

Meinen Eltern

---

---

---

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 SCHILDDRÜSENKARZINOME .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Einteilung der Schilddrüsenkarzinome.....	1
1.1.3 Die Tumorprogression von Schilddrüsenkarzinomen und ihre Folgen für Behandlung und Prognose .....	2
1.2 ANGIOGENESE.....	3
1.2.1 Einleitung.....	3
1.2.2 Historischer Hintergrund und das Konzept der Tumorangiogenese.....	3
1.2.3 Ablauf der Tumorangiogenese in vivo.....	3
1.3 VEGF .....	4
1.3.1 Historischer Hintergrund.....	4
1.3.2 Struktur und Rezeptoren.....	4
1.3.3 Relevanz und Funktion.....	5
1.4 DIE EXTRAZELLULÄRE MATRIX (ECM) .....	6
1.4.1 Aufbau und Struktur .....	6
1.4.2 Die Basalmembran.....	6
1.4.3 Das Interstitielle Bindegewebe.....	7
1.5 INTEGRINE.....	8
1.5.1 Einleitung.....	8
1.5.2 Struktur, Einteilung und Bindungsspezifität.....	8
1.5.3 Integrin induzierte Signaltransduktionswege .....	10
1.5.4 Funktion der Integrine .....	10
1.6 INTERAKTION VON INTEGRINEN, VEGF UND ECM IM RAHMEN DER ANGIOGENESE .....	11
1.7 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	13
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>14</b>
EINLEITUNG .....	14
2.1 MATERIAL.....	14
2.1.1 CHEMIKALIEN UND VERBRAUCHSMITTEL .....	14
2.1.2 KITS UND GERÄTE.....	15
2.1.3 ANTIKÖRPER .....	16
2.1.3.1 Antikörper, die für die Immunhistochemie und das FACS verwendet wurden .....	16
2.1.3.2 Antikörper und RGD-Sequenzen, die bei Funktionsexperimenten verwendet wurden .....	17
2.1.4 DIE ZELLEN.....	17
2.2 METHODEN .....	18
2.2.1 ZELLKULTUR.....	18
2.2.2 IMMUNHISTOCHEMIE.....	18
2.2.2.1 Prinzip.....	18
2.2.2.2 Erstellung der Nativpräparate für die Immunhistochemie .....	18

---

2.2.2.3 Die Färbung .....	19
2.2.2.4 Digitalisierung der immunhistochemisch gefärbten Präparate .....	19
2.2.3 ELISA.....	20
2.2.3.1 Prinzip.....	20
2.2.3.2 Durchführung.....	20
2.2.3.3 Auswertung.....	21
2.2.4 MTT-ASSAY .....	21
2.2.4.1 Prinzip.....	21
2.2.4.2 Durchführung.....	21
2.2.4.3 Auswertung.....	22
2.2.5 FACS.....	22
2.2.5.1 Prinzip.....	22
2.2.5.2 Durchführung.....	22
2.2.5.3 Auswertung.....	23
2.2.6 ZYTOSOL.....	23
2.2.6.1 Prinzip.....	23
2.2.6.2 Durchführung.....	23
2.2.7 PROTEINASSAY.....	24
2.2.7.1 Prinzip.....	24
2.2.7.2 Durchführung.....	24
2.2.7.3 Auswertung.....	24
2.3 VERSUCHSPROTOKOLLE.....	24
2.3.1 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON INTEGRINEN VERSCHIEDENER SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN UND NORMALGEWEBEZELLEN.....	24
2.3.1.1 Einleitung .....	24
2.3.1.2 Versuchsprotokoll.....	25
2.3.1.3 Auswertung.....	25
2.3.2 EINFLUSS VON BLOCKIERENDEN INTEGRINANTIKÖRPERN AUF DIE VEGF-PRODUKTION VON SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN DER XTC UND HTC+-ZELLREIHE .....	26
2.3.2.1 Einleitung .....	26
2.3.2.2 Versuchsprotokoll.....	26
2.3.2.3 Deskriptive Auswertung .....	27
2.3.3. UNTERSUCHUNG DER VEGF-SEKRETION DER SCHILDDRÜSENTUMORZELLINIEN XTC UND HTC+ UNTER EINFLUSS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX .....	27
2.3.3.1 Einleitung .....	27
2.3.3.2 Versuchsprotokoll.....	27
2.3.3.3 Deskriptive Auswertung .....	28
2.3.4 BEEINFLUSSUNG DER DURCH FIBRONEKTIN INDUZIERTEN VEGF-SEKRETION VON XTC-ZELLEN DURCH INTEGRIN-ANTIKÖRPER UND RGD-SEQUENZEN .....	28
2.3.4.1 Einleitung .....	28
2.3.4.2 Versuchsprotokoll.....	28

2.3.4.3 Deskriptive Auswertung .....	29
2.3.5 EINFLUSS VON VEGF AUF DIE INTEGRINEXPRESSION VON SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN DER XTC-ZELLINIE .....	29
2.3.5.1 Einleitung .....	29
2.3.5.2 Versuchsprotokoll.....	29
2.3.5.3 Deskriptive Auswertung .....	30
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>31</b>
3.1 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON INTEGRINEN BEI VERSCHIEDENEN SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN UND NORMALGEWEBE.....	31
3.1.1 Einleitung .....	31
3.1.2 Integrinexpression der verschiedenen Zelllinien im Vergleich .....	31
3.2 EINFLUSS VON BLOCKIERENDEN INTEGRINANTIKÖRPERN AUF DIE VEGF-BASALSEKRETION VON SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN DER XTC UND HTC+ -ZELLREIHE .....	34
3.2.1 Einleitung .....	34
3.2.2 VEGF-Sekretion von XTC-Zellen unter Behandlung mit Integrinantikörpern.....	34
3.2.3 VEGF-Sekretion von HTC+-Zellen unter Behandlung mit Integrinantikörpern.....	36
3.3 UNTERSUCHUNG DER VEGF-SEKRETION DER SCHILDDRÜSENTUMORZELLINIEN XTC UND HTC+ AUF VERSCHIEDENEN SUBSTANZEN DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX .....	37
3.3.1 Einleitung .....	37
3.3.2 VEGF-Sekretion von XTC-Zellen auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix im Vergleich zu einer XTC-Gruppe ohne Matrixkomponenten .....	38
3.4 BEEINFLUSSUNG DER DURCH FIBRONEKTIN INDUZIERTEN VEGF-MEHRSEKRETION VON XTC-ZELLEN DURCH INTEGRIN-ANTIKÖRPER UND RGD-SEQUENZEN .....	39
3.4.1 Einleitung .....	39
3.4.2 Einfluss von RGD-Sequenzen auf die VEGF-Produktion und Sekretion von XTC-Zellen.....	40
3.4.3 Einfluss von Integrinantikörpern auf die VEGF-Sekretion von XTC-Zellen .....	41
3.5 EINFLUSS VON VEGF AUF DIE INTEGRINEXPRESSION VON SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN DER XTC-ZELLINIE .....	42
3.5.1 Einleitung .....	42
3.5.2 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Behandlung mit 10 ng/ml VEGF.....	43
3.5.3 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Behandlung mit 50 ng/ml VEGF.....	44
3.5.4 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Stimulation mit 10 und 50 ng/ml VEGF im Vergleich .....	45
3.6 ZUSAMMENFASSUNG DER WICHTIGSTEN ERGEBNISSE.....	45
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
4.1 IMMUNHISTOCHEMISCHER NACHWEIS VON INTEGRINEN VERSCHIEDENER SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN UND NORMALGEWEBE.....	47
4.1.1 Integrinexpression physiologischer Schilddrüsenzellen.....	47
4.1.2 Integrinexpression von Tumor- und Normalzellen im Vergleich.....	47
4.1.3 Integrinkonfiguration und ihr Einfluss auf das Verhalten von Tumorzellen .....	48

4.2 EINFLUSS VERSCHIEDENER SUBSTANZEN DER EXTRAZELLULÄREN MATRIX AUF DIE VEGF-SEKRETION VON SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN DER XTC- UND HTC+-ZELLINIE .....	49
4.3 EINFLUSS VON BLOCKIERENDEN INTEGRINANTIKÖRPERN AUF DIE VEGF-BASALSEKRETION VON SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN DER XTC UND HTC+ -ZELLREIHE .....	50
4.4 BEEINFLUSSUNG DER DURCH FIBRONEKTIN INDUZIERTEN VEGF-MEHRSEKRETION VON XTC-ZELLEN DURCH INTEGRIN-ANTIKÖRPER UND RGD-SEQUENZEN .....	51
4.4.1 Einfluss von RGD-Sequenzen auf die VEGF-Produktion und Sekretion von XTC-Zellen.....	51
4.4.2 Einfluss von Integrinantikörpern auf die fibronektingetriggerte VEGF-Sekretion von XTC-Zellen.....	52
4.5 EINFLUSS VON VEGF AUF DIE INTEGRINEXPRESSION VON SCHILDDRÜSENTUMORZELLEN DER XTC-ZELLINIE .....	54
4.5.1 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Stimulation mit 10 und 50 ng/ml VEGF.....	54
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>56</b>
5.1 DEUTSCHE ZUSAMMENFASSUNG.....	56
5.2 ENGLISCHE ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....	58
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>60</b>
<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....</b>	<b>68</b>
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>69</b>



## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ECM	Extracellular matrix, Extrazelluläre Matrix
EC	Endothelial cell, Endothelzellen
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Assay, Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	Fluorescens-Activated-Cell-Sorting, Durchflusszytometrie
FAK	Focal Adhesion Kinase, Tyrosinkinase
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugate
FN	Fibronectin
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells; Humane Nabelvenen- Endothelzellen
KDR	Kinase domain insert containing receptor, Kinase Domäne tragender Receptor (VEGF-2-Rezeptor)
La	Laminin
MAP-Kinase	Mitogen-Activated Protein Kinase, Proteinkinase
MEN	Multiple Endokrine Neoplasie
MG	Matrigel
MKP	Multikammerplatte
MMP	Metalloproteinasen
MTT	Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium
OD	Optische Dichte
PIGF	Placenta growth factor, Placenta-Wachstumsfaktor
Ras	Rat sarcoma (G-Protein)
RGDS	Tripeptid: Arg-Gly-Asp-Sequenz
RIPA	Proteolytische Lösung
SD-Karzinom	Schilddrüsenkarzinom
Sek.-AK	Sekundärantikörper
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VN	Vitronectin
VPF	Vascular permeability factor, vaskulärer Permeabilitätsfaktor

---

---

## 1. Einleitung

### 1.1 Schilddrüsenkarzinome

#### 1.1.1 Epidemiologie

Schilddrüsen(SD)karzinome stellen 5 % aller bösartigen Tumorerkrankungen. Bei einer Erkrankungshäufigkeit von 3000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland sind sie für ca. 950 Todesfälle pro Jahr verantwortlich. Damit sind sie die häufigste maligne Erkrankung endokriner Organe (Zielke et al. 1997).

#### 1.1.2 Einteilung der Schilddrüsenkarzinome

Die Karzinome der Schilddrüse lassen sich nach dem Differenzierungsgrad der Tumorzellen in vier Hauptgruppen klassifizieren, die sich wiederum in verschiedene Untergruppen differenzieren lassen.

Das prozentual am häufigsten vorkommende **papilläre Schilddrüsenkarzinom** findet sich in allen Altersgruppen. Seine Altersspitzen liegen im 2. und 3. Lebensjahrzehnt, sowie im hohen Alter. Frauen sind besonders häufig betroffen. Das langsam wachsende und in 80 % multifokal vorkommende Karzinom hat, obwohl es zur lymphogenen Metastasierung neigt, insgesamt eine gute Prognose.

Das seltener vorkommende **follikuläre Karzinom** stellt nur ca. 10 % der Schilddrüsenkarzinome. Dieser das weibliche Geschlecht bevorzugende Tumor kommt bei Kindern wie auch Erwachsenen vor und nimmt mit dem Alter in seiner Häufigkeit zu. Die Prognose des meist solitär wachsenden follikulären Karzinoms ist auf Grund der höheren Malignität und bevorzugt hämatogenen Metastasierung schlechter als die des papillären Karzinoms. Eine Sonderform des follikulären Karzinoms ist das Hürthle-Zell-Karzinom, welches wegen seiner histologischen Ähnlichkeit zu Adenomen nur daran zu erkennen ist, dass es Blutgefäße infiltriert.

Das **medulläre Karzinom**, das von den C-Zellen der Schilddrüse abstammt, macht etwa 5-10 % der Schilddrüsenkarzinome aus. Besonders häufig finden sich hier Patienten über 40 Jahre. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Der Tumor kann familiär gehäuft (20 %) im Rahmen eines MEN-Syndroms (Multiple Endokrine

Neoplasie) auftreten, dies tut er häufig multifokal. Bei sporadischem Auftreten sind die Tumore meist solitär. Die Prognose hängt daher von Art und Ausbreitung des Tumors ab. Sie ist insgesamt schlechter als beim follikulären und besser als beim anaplastischen Karzinom.

Das **anaplastische Karzinom** der Schilddrüse besteht aus undifferenzierten Zellen mit ausgeprägten Kernatypien und kommt besonders bei älteren, bevorzugt weiblichen Patienten vor. Es macht bis zu 5 % der Neoplasien der Schilddrüse aus, ist hoch maligne und metastasiert früh lymphogen und hämatogen. Die Prognose ist daher sehr schlecht.

### 1.1.3 Die Tumorprogression von Schilddrüsenkarzinomen und ihre Folgen für Behandlung und Prognose

Die Tumorentstehung der Schilddrüsenkarzinome ähnelt der anderer Adenokarzinome mit Initiation, Promotion und Transformation. Ein lineares Modell wie zum Beispiel beim kolorektalen Karzinom ließ sich bis jetzt noch nicht erstellen.

Die für die unterschiedlichen Prognosen der Schilddrüsenkarzinome verantwortlichen Schritte der Tumorprogression sind das Wachstum, die Invasion in das umgebende Gewebe sowie lymphogene und hämatogene Metastasierung. Diese Schritte der Tumorprogression stellen nicht nur die Therapie der Schilddrüsenkarzinome vor große Probleme, sondern erweisen sich auch bei vielen anderen Tumoren als limitierende Faktoren, die eine kurative Behandlung unmöglich machen. Doch wodurch werden die Tumoren zu diesen Progressionsschritten befähigt? Von entscheidender Bedeutung scheint hier die Fähigkeit der Tumore zur Angiogenese zu sein. Nur durch sie ist es dem Tumor möglich, sich bei seinem energetisch aufwendigen Wachstum mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen und über die Gefäße wird die Metastasierung begünstigt. Für das Schilddrüsenkarzinom stellen sich hier auch stellvertretend für viele andere Karzinome folgende Fragen:

- Welche Faktoren spielen bei der Tumorangiogenese eine essentiell wichtige Rolle?
- Wie und wodurch werden diese Faktoren gesteuert?
- Gibt es eine Möglichkeit in diesen Ablauf einzugreifen und die Progressionsschritte zu unterbinden oder zu stören?

## 1.2 Angiogenese

### 1.2.1 Einleitung

Der Begriff Angiogenese beschreibt den Prozess der Aussprossung und des Wachstums neuer Gefäße. Angiogenese ist Merkmal sowohl physiologischer Prozesse, wie Embryogenese, Wundheilung oder Corpus Luteum Formation (Kim et al. 1993), als auch pathologischer Prozesse wie Tumorwachstum (Hanahan und Folkman 1996).

### 1.2.2 Historischer Hintergrund und das Konzept der Tumorangiogenese

Die ersten Konzepte zur Tumorangiogenese wurden vor 30 Jahren maßgeblich von Dr. Judah Folkman erdacht. Seine Ideen basierten neben seiner Forschung auch auf den Arbeiten einer kleinen Zahl von Forschern wie Algire (Algire und Chalkley 1945), Greenblatt (Greenblatt und Shubik 1968) und Warren (Warren und Shubik 1966). Es war Shubik, der den Begriff Tumorangiogenese als erster formulierte. Folkman erkannte, dass primäre Tumore eine längere Phase gefäßfreien Wachstums durchmachen. Diese Tumore werden durch Diffusion ernährt und können daher nur maximal 1-2 mm große Tumorknoten bilden. Erst eine zweite Phase mit Einsprossung von Gefäßen ermöglicht ein Tumorwachstum über diese Größe hinaus (Folkman und Hochberg 1973). Der Übergang zwischen diesen zwei Phasen wird als „angiogenic switch“ bezeichnet (Hanahan und Folkman 1996).

### 1.2.3 Ablauf der Tumorangiogenese in vivo

Ein wesentlicher Auslöser für das Wachstum neuer Gefäße ist die Hypoxie. Bedingt durch den hohen Grundumsatz der Tumorzellen entwickelt sich bei Distanzen über 100-200 µm zur nächsten Kapillare eine Hypoxie (Thomlinson and Grey 1955). Diese Hypoxie stimuliert unter anderem die Tumorzellen zur Produktion von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), das an den umgebenden Gefäßen die Angiogenese in Richtung Tumorknoten induziert (Veikkola et al. 2000, Marti und Risau 1998). Das von den Tumorzellen gebildete VEGF bindet an die in der Zellmembran der benachbarten Gefäßepithelzellen lokalisierten VEGF-Rezeptoren. Diese Bindung aktiviert eine tyrosinkinaseabhängige Signalkaskade, welche bei den Endothelzellen (EC) zur Lösung der Zell-Zellkontakte (Veikkola et al. 2000) und zur Sezernation von Metalloproteinasen (MMP) führt (Klagsbrun und Moses 1999). Die MMP degradieren proteolytisch die Bestandteile der sie umgebenden extrazellulären Matrix (ECM) und die Basalmembran (Silletti und Cheresch 1999). Nach deren Lyse

können die EC ihr angestammtes Blutgefäß verlassen und chemotaktisch u.a. vom VEGF gesteuert in das Gewebe einwandern (Petrova et al. 1999). Dabei verändern die Endothelzellen unter VEGF-Einfluss auch ihre Integrinkonfiguration. Sie exprimieren unter anderem mehr  $\alpha\beta 3$ -Integrine, welche sie für die Migration durch und Adhäsion an der extrazellulären Matrix (ECM) benötigen (Brooks et al. 1994). Der zusätzliche Einfluss von Angiopoetin bewirkt im Gewebe das Überleben und die Proliferation der Endothelzellen. Unter seiner Kontrolle kommt es sowohl zur Bildung von Gefäßstrukturen, als auch zum chemotaktischen Einwandern von Pericyten (Laurén et al. 1998, Klagsbrun and Moses 1999). Sind die Gefäße vollständig ausgebildet, geht der Tumor vom linearen zum exponentiellen Wachstum über.

### **1.3 VEGF**

#### 1.3.1 Historischer Hintergrund

Der „vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor“ (VEGF) wurde in den späten 70er Jahren von einer Wissenschaftlergruppe um Dvorak entdeckt. Sie nannten ihn wegen seiner permeabilitätssteigernden Eigenschaften an Gefäßendothelien „vascular permeability factor“ VPF (Dvorak et al. 1979 a und b, Senger et al. 1983). Einige Jahre später entdeckte ihn eine zweite Arbeitsgruppe um Ferrara ebenfalls und gab ihm seinen heutigen Namen „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) (Ferrara und Henzel 1989). In den folgenden 2 Jahren wurden VPF und VEGF als das identische Molekül identifiziert (Ferrara et al. 1992).

#### 1.3.2 Struktur und Rezeptoren

VEGF ist ein multifunktionelles, die Angiogenese stimulierendes Zytokin. Strukturell ist VEGF ein dimeres Glykoprotein, welches je nach Glykosylierung eine Größe von 34-46 kDa erreicht. Unter reduzierten Bedingungen dissoziiert es in zwei 20-23 kDa große Untereinheiten (Ferra und Davies-Smyth 1997). Das VEGF-Gen wird auf dem Chromosom 6p12-p21 lokalisiert und unterteilt sich in 8 Exons und 6 Introns (Mattei et al. 1996). Als Folge von alternativem mRNA-Splicen können mindestens vier Isoformen mit Sequenzen von 121, 165, 189 oder 206 Aminosäuren unterschieden werden (Houk et al. 1991 und 1992). VEGF 121 und 165 werden sezerniert, wobei VEGF 165 im Serum dominiert. VEGF 189 und 206 bleiben am Heparansulfat der ECM gebunden (Houk et al. 1992, Poltorak et al. 1997). Weitere Mitglieder der

VEGF-Familie wurden identifiziert, es handelt sich dabei um den Placenta Wachstumsfaktor (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und E (Petrova et al. 1999). Ihre Funktion ist noch nicht vollständig geklärt, VEGF-C hat aber offenbar spezifische mitogene lymphoepitheliale Eigenschaften (Jeltsch et al. 1997, Petrova et al. 1999).

Bisher wurden drei VEGF-Rezeptoren beschrieben, an die VEGF mit hoher Affinität bindet. Es handelt sich dabei um den Rezeptor VEGFR-1, früher auch „fms like tyrosin kinase“ (flt-1) genannt und VEGFR-2, der auch als „kinase domain insert containing receptor“ (KDR) bezeichnet wurde (Termann et al. 1992, Milauer et al. 1993). Der dritte Rezeptor, VEGFR-3, wird spezifisch von VEGF-C gebunden. Er wird überwiegend in lymphatischem Gewebe exprimiert (Kaipaine et al. 1997, Joukov et al. 1997). Bei den VEGF-Rezeptoren handelt es sich um homologe, transmembranöse Tyrosinkinase, die sieben extrazelluläre Immunglobulin-domänen besitzen.

### 1.3.3 Relevanz und Funktion

VEGF spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese. Bei knock-out-Mäusen, bei denen beide VEGF-Rezeptor-Allele fehlten, kam es zu einer unvollständigen Hämatopoese und Endothelzellen fehlten völlig. Auch für die oben schon erwähnte Tumorangiogenese stellt VEGF das zentrale Element dar (Klagsbrun and Moses 1999). So wurde es in fast allen bisher untersuchten Tumoren nachgewiesen, oft auch überexprimiert (Senger et al. 1994). Die zentrale Rolle von VEGF für die Angiogenese von Tumoren konnte durch Anti-VEGF-Antikörper und durch VEGF-Rezeptorblockade bewiesen werden (Kondo et al. 1993 u. Bauer et al. 1992). Doch was induziert die VEGF-Produktion bei Tumoren? Die beiden auch physiologisch vorkommenden Reize Hypoxie und Hypoglykämie sind die stärksten Auslöser für die Expression und Sekretion von VEGF (Shweiki et al. 1995). Weiter wurde auch bei der Aktivierung von Protoonkogenen oder der Mutation des Tumorsuppressorgens P53 eine erhöhte VEGF-Sekretion und Expression festgestellt.

Auch für Schilddrüsenkarzinome finden sich in diesem Zusammenhang viele Untersuchungsergebnisse, die die Relevanz von VEGF für die Pathogenese der Schilddrüsenkarzinome nahe legen. Bei Schilddrüsenkarzinomzellen liegt die VEGF-Sekretion weitaus höher als bei physiologischen Schilddrüsenzellen, die damit verbundene deutlicher ausgeprägte Angiogenese ist durch VEGF-Antikörper inhibierbar (Bauer et al. 2003). Auch durch P53-Transfektion auf

Schilddrüsenkarzinomzellen kann die VEGF-Sekretion vermindert werden, was die proangiogene Bedeutung der P53-Mutation auch für Schilddrüsenkarzinome nahe legt (Hassan et al. 2006). Die Karzinomzellen zeigen in der VEGF-Sekretion histiotyp-assoziierte Unterschiede: die VEGF-Sekretion nimmt mit abnehmender Differenzierung und zunehmender Progression zu (Soh et al. 2006, Lennard et al. 2001). Nicht nur die VEGF-Sekretion, sondern auch die Expression von VEGF- und Wachstumsfaktor-Rezeptoren (abgesehen von TSH-Rezeptoren) nimmt bei malignen Schilddrüsenzellen zu (Vieira et al. 2005), was unter anderem den vermehrten stimulierenden Einfluss von Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ 1 und EGF auf die VEGF-Sekretion erklären kann (Hoffmann et al. 2004).

#### **1.4 Die extrazelluläre Matrix (ECM)**

##### 1.4.1 Aufbau und Struktur

Die extrazelluläre Matrix besteht in der Regel aus zwei Kompartimenten, der Basalmembran und dem interstitiellen Bindegewebe. Diese beiden Kompartimente unterscheiden sich sowohl im Aufbau, als auch in ihrer Funktion (Liotta 1986). Die Funktion der ECM ist vielfältig, neben Adhäsion und Migration hat sie großen Einfluss auf das Zellwachstum und die Differenzierung der mit ihr - überwiegend über Integrine - kommunizierenden Zellen (Weaver und Roskelley 1997).

##### 1.4.2 Die Basalmembran

Die Basalmembran stellt eine zellarme kollagenfaserreiche Membran dar, die Epithelien und Endothelien vom interstitiellen Bindegewebe trennt. Sie fungiert als makromolekularer Filter, als Barriere, die Zellinfiltration verhindern soll. Sie vermittelt Adhäsion, Migration und Zellwachstum (Liotta et al. 1986, Timpl et al. 1996). Durch das Elektronenmikroskop betrachtet, läßt sie sich in zwei Schichten untergliedern: die Lamina rara und die Lamina densa (Bucher und Wartenberg 1989). Biochemisch besteht sie zu mehr als 50 % aus Kollagen IV. Dieses besteht aus drei Ketten, die helixartig angeordnet sind und die Grundstruktur der Basalmembran bilden (Setty et al. 1998). In dieses Kollagengerüst sind Glykoproteine wie Laminin, Entactin und Proteoglykane integriert (Liotta et al. 1986).

Laminin (La) ist eines der Hauptmoleküle der ECM. Es ist ein komplexes Glykoprotein, welches aus Alphaketten besteht, die in Form eines Kreuzes angeordnet



und über Disulfidbrücken verbunden sind. Es bindet an spezifische und unspezifische Rezeptoren der Zellmembran (Integrine) und vermittelt so Adhäsion, Wachstum, Differenzierung sowie Migration (Malinda et al. 1996, Timpl et al. 1979, Terranova et al. 1983).

#### 1.4.3 Das Interstitielle Bindegewebe

Das interstitielle Bindegewebe besteht aus Kollagenfasern, Elastin, Glykoproteinen und Glykosaminoglykanen. Diese komplexe Matrix ist von Fibroblasten und verschiedenen anderen Zellen durchsetzt. Ihre Zusammensetzung unterscheidet sich je nach Anforderung und Gewebeart.

Kollagen I und III stellen mit 90 % den größten Anteil der Strukturelemente des Interstitiums und machen etwa ein Viertel der Proteinmasse des Körpers aus. Ihre Fibrillen sind in Tripelhelix-Form angeordnet und geben der Matrix Struktur und Festigkeit. Kollagen interagiert mit allen anderen Bestandteilen des interstitiellen Bindegewebes. Unter den Glykosaminoglykanen dominieren Chondroitinsulfat, Dermatansulfat und Hyaluronsäure. Sie bilden verschiedene Glykokonjugate, die wiederum an verschiedene Coreproteine gebunden sind. Diese Komplexe bilden die Füllsubstanz der ECM und sind in die Fibrillogenese von Kollagenfasern eingebunden (Yurchenco und Schittny 1990). Die beiden bedeutsamsten Glykoproteine sind Vitronektin (VN) und Fibronektin (FN).

Vitronektin gehört zur Gruppe der Plasmaglykoproteine. Es wird in der Leber synthetisiert. In der ECM ist es mit elastischen Fasern assoziiert und ist funktionell an Hämostase und Wundheilung beteiligt (Schvartz et al. 1998).

Fibronektin ist das für die Steuerung der zellulären Organisation bedeutsamste Glykoprotein des interstitiellen Bindegewebes (Danen et al. 2001). Es ist ein großes Molekül, welches aus zwei homologen, jedoch nicht identischen Untereinheiten besteht. Diese beiden Polypeptide, in der Größe von 230 und 210 kDa, sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Hynes et al. 1999). Über Bindungsdomänen für Heparansulfat und Kollagen interagiert Fibronektin mit anderen Bestandteilen der ECM. Der Kontakt zu Zellen wird über eine spezielle Zellbindungsdomäne etabliert. Diese konnte durch proteolytischen Abbau identifiziert werden (Pierschbacher und Rouslahti 1984). Es handelt sich um ein Tripeptid: Arg-Gly-Asp (RGD), das von spezifischen Integrinrezeptoren der Zellmembran gebunden wird. Die Bindung an Fibronektin kann durch lösliche RGD Sequenzen unterbunden werden (Gehlsen et al. 1988).

Die mit Fibronectin interagierenden Zellen werden auf verschiedene Weise beeinflusst. Neben Adhäsion vermittelt Fibronectin im Verlauf von Morphogenese und Wundheilung auch Migration (Chen et al. 1993). An der Kontrolle des Zellwachstums scheint es ebenfalls einen großen Anteil zu haben (Mortarini et al. 1992), so fördert FN beispielsweise das Wachstum von Schilddrüsentumorzellen in vitro (Vitale et al. 1996). Das Spektrum der matrixassoziierten Funktionen und Interaktionen ist sehr vielfältig und noch unzureichend erforscht.

## **1.5 Integrine**

### 1.5.1 Einleitung

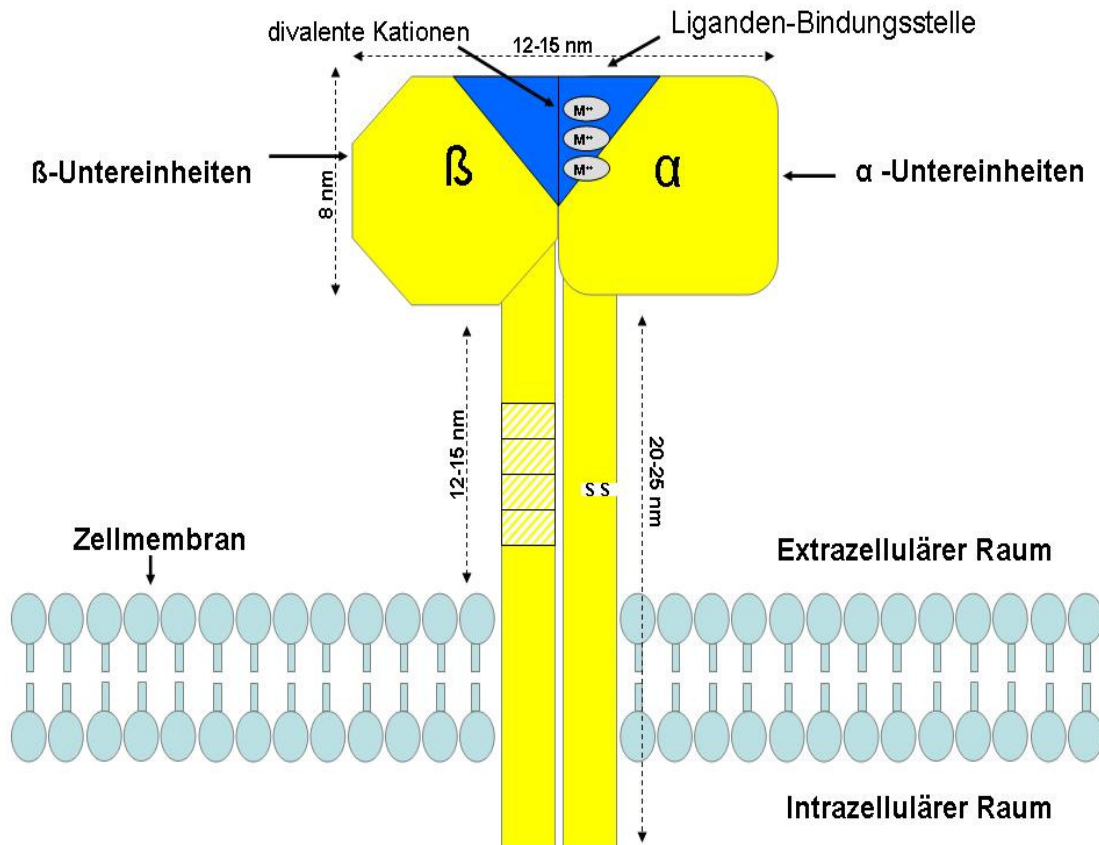
Die große Familie der Integrinrezeptoren rückte erst 1987 in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses (Hynes 1987). Integrine sind Zelladhäsionsmoleküle, die ubiquitär auf den verschiedensten Zellen vorkommen. Sie vermitteln den Kontakt zwischen der Zelle und dem umliegenden Gewebe. Dieser Kontakt ist nicht nur auf die reine Adhäsion beschränkt, sondern erstreckt sich auch auf den Austausch von Informationen zwischen dem Intra- und Extrazellulärraum. Integrine sind daher zur Koordination und Organisation von Zellverbänden im Gewebe lebenswichtig.

### 1.5.2 Struktur, Einteilung und Bindungsspezifität

Integrine sind Heterodimere, die aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Bisher sind exakt 16  $\alpha$ - und 8  $\beta$ -Untereinheiten identifiziert. Aus der Kombination von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten definiert sich der individuelle Rezeptor. Theoretisch könnten sich aus 8  $\beta$  und 16  $\alpha$ -Untereinheiten über 100 verschiedene heterodimere Rezeptoren bilden. Diese Vielfältigkeit scheint jedoch begrenzt, bisher sind erst um die 20 verschiedene Integrinkombinationen identifiziert worden (Cappolino und Dedhar 2000). Eine der möglichen Ursachen könnte im Bindungsverhalten der Untereinheiten liegen, so können bestimmte  $\alpha$ -Untereinheiten nur an spezifische  $\beta$ -Untereinheiten binden (Hynes 1992).

Beide Integrinuntereinheiten sind transmembrane Glykoproteine. Die  $\alpha$ -Untereinheit variiert zwischen 120 und 180 kDa und ist nichtkonvalent mit den 90 bis 120 kDa großen  $\beta$ -Untereinheiten assoziiert. Jede Untereinheit besteht aus einem hydrophoben transmembranen Segment, einem kurzen intrazytoplasmatischen Segment (50 oder weniger Aminosäuren) sowie einem extrazellulären Segment (>75 kDa für  $\alpha$  und

>100 kD für  $\beta$  Untereinheiten). Die beiden N-terminalen extrazellulären Anteile bilden einen globulären „Kopf“, von dem aus stabähnliche Anteile beider Untereinheiten zur Zellmembran führen (Carrell et al. 1985, Nermut et al. 1988, Kelly et al. 1987). Die globuläre Domäne beherbergt die Liganden-Bindungsstelle, an der beide Untereinheiten teilhaben. Für die Funktion sind divalente Kationen essentiell. Die Art der Kationen beeinflusst Affinität und Spezifität der Bindung (Hynes 1992, Ruoslahti 1996, Byzova et al. 2000). Das zytoplasmatische Segment der Integrine ist für den Kontakt zum Zytoskelett und die Signaltransduktion verantwortlich (Giancotti und Ruoslahti 1999).



Graphik 1: Die selbsterstellte Grafik zeigt ein Integrindimer in der Zellmembran bestehend aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten.

Nach Kontakt mit der ECM bilden die Integrine in der Zellmembran Cluster, so genannte fokale Adhäsionsstellen, an denen die Integrindichte besonders hoch ist. Die fokalen Adhäsionsstellen sind dynamische Strukturen, die im Verlauf von Proliferation und Migration ständig auf- und abgebaut werden (Clark und Brugge 1995). Integrine sind über das zytoplasmatische Segment mit dem Zytoskelett und einem Signalkomplex verbunden, der unter anderem den Aufbau von Aktinfilamenten

induziert. Die Reorganisation von Aktinfilamenten zu größeren Belastungsfasern wiederum induziert die Vergrößerung der Integrincluster. Diese wiederum verstärken die Adhäsion an der ECM und lösen in einem positiven „Feed-back“-Mechanismus die vermehrte Ausbildung von Aktinfilamenten aus (Giancotti und Ruoslahti 1999).

### 1.5.3 Integrin induzierte Signaltransduktionswege

Bei den oben erwähnten, an den fokalen Adhäsionsstellen lokalisierten Signalkomplexen, handelt es sich um eine spezielle Tyrosinkinase, die als „Focal Adhesion Kinase“, kurz FAK, bezeichnet wird. Diese Kinase verbindet die Organisation des Zytoskeletts mit den oben schon angedeuteten Wegen der Signaltransduktion (Giancotti und Ruoslahti 1999). Bindet ein Integrin an einen ECM-Liganden, beobachtet man eine Autophosphorylierung von Tyrosinresten. Diese Tyrosinreste sind Ausgangspunkte bedeutender Signaltransduktionswege. So kommt es unter anderem zur Aktivierung der ras-Signalkaskade durch die FAK. Die ras-Signalkaskade wiederum aktiviert den MAP-Kinasen-Weg und greift so in viele Abläufe des Zellstoffwechsels ein (Coppolino und Dedhar 2000).

### 1.5.4 Funktion der Integrine

Eine der Hauptfunktionen der Integrine ist, wie erwähnt, die **Adhäsion** auf der ECM. Die Bindung von Integrinen an der ECM ist in ihrer Affinität abhängig von der Konformation der Untereinheiten. Die Zellen exprimieren für jede ECM Substanz spezielle Integrine, um adhären zu können. Dabei sind verschiedene Assoziationen bekannt, auf die später noch genauer eingegangen wird.

Die Funktion der Integrine wird immer mehr auch als **bidirektionale Transduktion von Signalen** durch die Zellmembran verstanden, die über die oben geschilderten Signalwege verläuft. Integrine vermitteln so Informationen von extrazellulär nach intrazellulär, was mit dem Begriff „outside-in signaling“ bezeichnet wird. Gleichzeitig sind sie auch in der Lage Informationen aus der Zelle in den Extrazellulärraum weiterzugeben, was in dem Begriff „inside-out signaling“ seinen Ausdruck findet. Unter „inside-out signaling“ wird unter anderem die Modulation des Aktivitätszustandes der Integrine begriffen, der über die oben erwähnten Signalwege beeinflusst werden kann. Dieser ist, wie erläutert, von Ionen ( $Mn^{++}$  u.  $Ca^+$ ) abhängig (Coppolino und Dedhar 2000). So folgt der Stimulation der Proteinkinase C an CHO-Zellen eine Aktivitätssteigerung von  $\alpha 5\beta 1$  Integrinen (Yeh et al. 1999). Ein Beispiel für „outside-in signaling“ ist die Triggerung des intrazellulären Ca-Gehalts durch

Bindung von  $\alpha v \beta 3$  Integrinen an RGD-Bindungsstellen der ECM. Ein weitere ist die Aktivierung von Thrombozytenintegrinen, die erst durch die Bindung von u. a. Thrombin aktiviert werden müssen, bevor sie an Fibrinogen binden und so die Gerinnungskaskade initiieren (Savage et al. 1995, Ni et al. 2003).

Die Funktion der Integrine geht also weit über die reine Adhäsion hinaus. Über Integrine stimuliert die ECM die Zellen und diese reagieren entsprechend. So wird Wachstum und Differenzierung von auf der ECM adhätierenden Zellen integrinvermittelt beeinflusst. Die Bindung an die ECM ist für das Überleben der Zellen obligat. Verliert eine Zelle ihre Haftung an der ECM, so wird automatisch die Apoptose induziert. Diesen Vorgang nennt man Anoikis (griechisch für Heimatlosigkeit). Anoikis ist ein bedeutender homeostatischer Mechanismus zur Kontrolle der Zellzahl, der durch Balancieren von Zellproduktion und Zelltod eine korrekte Zellzahl aufrecht erhält und so übermäßiges Zellwachstum verhindert. Bei Tumorzellen ist dieser Mechanismus gestört (Ruoslahti und Reed 1994). Auch in der Integrinexpression von Tumorzellen und normalen Zellen des gleichen Gewebes scheint es Unterschiede zu geben. So ermöglicht eine verstärkte Integrinexpression eine intensivere Adhäsion (Smit et al. 1998). Eine veränderte Integrinkonfiguration wiederum kann Tumorzellen ermöglichen, auf der Matrix von vorher noch unzugänglichem Gewebe zu adhätieren und migrieren. Dies wurde beispielsweise an Melanomzellen demonstriert, welche nach Expressierung von  $\alpha 2 \beta 1$  Integrinen besser auf bestimmte Kollagenarten metastasieren konnten als Melanomzellen ohne dieses Integrin (Dahlman et al. 1998).

Dieser physiologische Prozess der Migration von Zellen im Rahmen der Wundheilung und immunologischer Vorgänge wird von Tumorzellen umfunktioniert und zur Invasion und Metastasierung genutzt (Clezardin 1998).

### **1.6 Interaktion von Integrinen, VEGF und ECM im Rahmen der Angiogenese**

In verschiedenen in vitro und in vivo Modellen konnte gezeigt werden, dass Integrine einen essentiellen Faktor der Angiogenese darstellen. An Knock-out Mäusen wurde demonstriert, dass ohne das Integrinmonomer  $\alpha v$  im Embryonalstadium kein suffizientes Gefäßsystem ausgebildet wird (Bader et al. 1998). Weiterhin wurde nachgewiesen, dass Antikörper gegen die Integrine  $\alpha 6$  und  $\beta 1$  Kapillarneubildungen verhindern können (Bauer et al. 1992). Die Integrindimere  $\alpha 1 \beta 1$ -und  $\alpha v \beta 3$  kommen

konstitutionell auf Gefäßendothelzellen vor, wobei auffällig ist, dass besonders während der Tumorangiogenese  $\alpha v\beta 3$  in hoher Konzentration exprimiert wird. Ein weiterer Hinweis auf die essentielle Rolle der Integrine bei der unter anderem durch VEGF induzierten Angiogenese ist deren Inhibierbarkeit durch Integrinantikörper (z.B.  $\alpha v\beta 3$ -Ak) und niedermolekulare Integrinantagonisten (RGD-Sequenzen) (Brooks et al. 1994 a u. b, Friedlander et al. 1995). So scheint die Blockade von Integrinen wie  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 2\beta 1$  sich über eine Störung der Zell-Matrix-Bindung negativ auf die schon oben angesprochene MAP-Kinase-Aktivität der Zelle auszuwirken. Die massive Reduktion dieser für die Angiogenese wichtigen Kinase führt zu einer Hemmung der Angiogenese (Senger et al. 2002).

FN aktiviert über Integrine ( $\alpha v\beta 3$ ) den MAP-Kinase Signalweg, über den darauf folgenden intrazellulären Calciumanstieg kommt es wiederum zur Aktivierung der Zellproliferation (Illario et al. 2005). Die für die Angiogenese wichtige Verknüpfung der Signalwege von Integrinen und VEGF zeigt sich auch am Beispiel der Mutation eines  $\beta 3$  Integrins bei Mäusen, welches durch seinen Funktionsverlust zu fehlerhafter Angiogenese und zur Reduktion der VEGF-Rezeptorphosphorylierung an der Zelloberfläche der betroffenen Zellen führt, wobei sich die gesamte Integrinaktivität der Zellen vermindert (Mahabeleshwar et al. 2006).

Die Integrine sind somit direkt in die onkogene Umwandlung von Zellen eingebunden. Sie übermitteln Signale von der ECM in die Zelle und sind damit Angriffspunkt von Medikamenten, die beispielsweise RGD-Bindungsstellen der Integrine imitieren und blockieren können (Eble und Haier 2006).

Antiangiogene Therapeutika haben zur Reduktion von Tumoren und verlängertem Überleben der Patienten geführt. Beim Einsatz nur eines antiangiogenen Medikamentes kann der Tumor über den Anstieg alternativer proangiogener Mechanismen und Signalwege kompensieren. Daher führt die Kombination mehrerer antiangiogener Therapeutika wie Integrinantagonisten und VEGF-Antagonisten zu einer deutlichen Steigerung des therapeutischen Effektes (Dorrell et al. 2007). Zur Optimierung und Weiterentwicklung der antiangiogenen Therapie wird ein klares Bild der einzelnen Faktoren der Angiogenese und ihrer Interaktionen benötigt.

## 1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Bei Schilddrüsenkarzinomzellen, wie auch bei Zellen verschiedener anderer Tumor-Entitäten, ist VEGF ein zentraler Regulator der Angiogenese und damit Voraussetzung für die Tumorprogression.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, sich anhand eines Zellkulturmodells mit verschiedenen Schilddrüsenkarzinomzelllinien ein Bild der Interaktion von Integrinen, VEGF und der extrazellulären Matrix bei Schilddrüsentumoren zu erstellen. Dieses soll helfen, die Angiogenese von Schilddrüsentumoren besser zu verstehen und damit mögliche Ansätze für innovative Therapiekonzepte zu erarbeiten.

Spezifische Fragestellungen:

1. Welche Integrine sind auf Schilddrüsentumorzellen exprimiert?  
Gibt es Unterschiede in der Expression zwischen den verschiedenen Histiotypen im Vergleich zu Zellen des Normalgewebes?
2. Ist die VEGF-Synthese bei Schilddrüsentumoren integrinabhängig und hat die extrazelluläre Matrix einen integrinvermittelten Einfluss auf sie? Kann man diesen Einfluss durch monoklonale Antikörper beeinflussen? **Outside-in**
3. Gibt es einen VEGF-abhängigen autokrinen Regelkreis, der Einfluss auf die Integrinexpression der Schilddrüsentumorzellen hat? **Inside-out**

## 2. Material und Methoden

### Einleitung

Das Material- und Methodenkapitel ist wie folgt strukturiert.

Nach Auflistung von Materialien und Zelltypen (siehe 2.1) werden zunächst die verwendeten Methoden im Einzelnen beschrieben (siehe 2.2). Anschließend werden die auf ihnen aufbauenden Versuchsprotokolle erläutert (siehe 2.3).

Die Auswahl und Abfolge der Versuche hatte einen explorativen Charakter, das heißt zum Teil handelt es sich um eine sukzessive Kette von aufeinander aufbauenden Experimenten, wobei sich das eine Experiment als Konsequenz der Versuchsergebnisse des voran gegangenen ergab.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Chemikalien und Verbrauchsmittel	Firma (Ort)
Aceton	Baker, Holland
Collagen I	Collaborative Research, Bedford, USA
Collagen IV	Collaborative Research, Bedford, USA
DAB Chromogen (3,3 Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid)	S3000, DAKO, Deutschland
DPBS (Dulbecco's Phosphate-Bufferd Saline)	GIBCOBRL CA, USA
EDTA 0,02 %	Sigma, Taufkirchen
Esel-Normalserum	Santa Cruz Biotechnology, USA
Ethanol	Riedel-de Haën, Deutschland
Fibronektin	Collaborative Research, Bedford, USA
Formaldehyd 37 %	Roth, Deutschland
Hämalaun nach Mayer	Merck, Deutschland
Matrigel	Collaborative Research, Bedford, USA
Multikammerplatten (MKP) 96er, 48er, 24er	Costar, Corning, NY, USA
Objekträger	Costar, Corning, NY, USA
PBS (Phosphat buffert saline)	GIBCOBRL, CA, USA
Polyornithin	Roth, Deutschland
RIPA	GIBCOBRL, CA, USA
Protease Inhibitoren: PMSF 10 mg/ml, Aprotinin readymix, Sodium orthovanadate 100 mM	Merck, Deutschland



Streptavidin (Strepavidin-HRP)	Pharmingen, Deutschland
Triton X 0,2 %	Serva, Heidelberg, Deutschland
Trypsin EDTA 0,25 %	Boehringer, Deutschland
VEGF165	R&D Systems, Minneapolis, USA
Wasserstoffperoxyd, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck, Deutschland
Xylol	Baker, Niederlande
Ziegen-Normalserum	DAKO, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One-GmbH, Deutschland
Standardmedium für die Zellkultur	Biochrom, Berlin, Deutschland
Nährmedium (Dulbecoco's minimal essentielle Medium (DMEM) HAM's ohne Glutamin; fetales Kälberserum 10 % (FCS); Penicillin 50 IU/ml; Streptomycin 50 µl/ml	
Serumfreies Mangelnährmedium (H5)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Nährmedium (Dulbecoco's minimal essentielle Medium (DMEM) HAM's ohne Glutamin; 0,055 g/l Natriumpyrivat; 0,365 g/l Glutamin; 1mg/ml Insulin; M Hydrocortison 5 µg/ml Transferrin; 10 ng/ml Glycyl-L- histidyl-L-lysinazetat; 10 µg/ml Somatostatin	

**Tabelle 1:** Chemikalien und Verbrauchsmittel

### 2.1.2 Kits und Geräte

Kits	Firma (Ort)
VECTASTAIN ABC- Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA USA
Quantikine Human VEGF Immunoassay	R&D Systems, Mineapolis, USA
Protein Assay	Bio Rad, USA

**Tabelle 2:** Kits

Geräte	Firma (Ort)
Brutschränke	Heraeus Instruments, USA
Emax ELISA-Plattenlesegerät	Molecular Devices, München, Deutschland
Fluorescens Adsorbend CS Inverses	
Mikroskop (Typ TMS)	Nikon, Japan
Mikroskop für Objektträger	Leitz, Laborluxs, Wetzlar, Deutschland
Pipettierhilfe (Pipetus-Akku)	Hirschmann Laborgeräte, Deutschland
Schüttler	IKA Works, Wilmington, NC, USA
Sterilarbeitsplatz	Hera Safe Hereus Instruments, USA
Zentrifuge (Minifuge T)	Hereus Instruments, Hanau, Deutschland
FACS mit Software „Cell Quest“	Becton Dickinson, USA

**Tabelle 3:** Geräte

### 2.1.3 Antikörper

#### 2.1.3.1 Antikörper, die für die Immunhistochemie und das FACS verwendet wurden

Bei den für die Immunhistochemie und Durchflusszytometrie verwendeten Antikörpern handelt es sich um monomere IgG-Clone von Maus, Ratte und Hamster, welche gegen die unten aufgezählten humanen Integrine gerichtet sind (Tab.4). In der Literatur sind sie für Durchflusszytometrie und Immunhistochemie etabliert (Hynes 1992).

Heterodimere Integrinantikörper waren zum Zeitpunkt der Versuche (in den Jahren 2000 bis 2002) nicht verfügbar.

Zur Durchflusszytometrie (FACS) wurde ein Fluoreszeinisothiocyanat(FITC) gekoppelter Sekundärantikörper (Sek-AK) zur fluoreszierenden Markierung benutzt.

<b>Integrin</b>	<b>Klon</b>	<b>Firma (Ort)</b>
$\alpha$ 1 (CD49a)	Ha 31/8	Pharmingen International, Deutschland
$\alpha$ 2 (CD49b)	AK7	s.o.
$\alpha$ 3 (CD49c)	C3II.1	s.o.
$\alpha$ 4 (CD49d)	9F10	s.o.
$\alpha$ 5 (CD49e)	IIA1	s.o.
$\alpha$ 6 (CD49f)	GoH3	s.o.
$\beta$ 1 (CD 29)	MAR4	s.o.
$\beta$ 2 (CD 18)	HI111	s.o.
$\beta$ 3 (CD 61)	VI-PL2	s.o.
$\beta$ 4 (CD 104)	450-9D	s.o.
$\beta$ 7	FIB504	s.o.
Biotin-conjugated anti-rat AB		s.o.
FITC* anti-rat		s.o.
FITC* anti-mouse		s.o.
$\alpha$ v	CHAV-1	CHEMICON International, Temecula, CA USA

**Tabelle 4:** Antikörper, die für die Immunhistochemie und das FACS verwendet wurden

\*Fluorescein-Isothiocyanat-Konjugate

### 2.1.3.2 Antikörper und RGD-Sequenzen, die bei Funktionsexperimenten verwendet wurden

Für die Funktionsexperimente wurden Antikörper verwendet, bei denen es sich um IgG-Clone der Maus handelt, welche gegen die unten genannten humanen Integrinmonomere gerichtet sind (Tab.5). In der Literatur (u.a. Hynes 1987) sind sie mit ihren in erster Linie inhibierenden Eigenschaften für Funktionsexperimente, insbesondere die Adhäsionshemmung, etabliert.

Heterodimere Integrinantikörper waren zum Zeitpunkt des Versuchs nicht verfügbar, daher wurden die monomeren Antikörper bei einer Reihe von Versuchen zur Simulation von heterodimeren Antikörpern kombiniert.

Bei der benutzten RGD-Sequenz handelt es sich um eine das Tripeptid Arg-Gly-Asp enthaltende Aminosäuresequenz, welche spezifisch durch Integrine gebunden wird (Pierschbacher und Rouslahti 1984, Gehlsen et al. 1988).

<b>Integrin</b>	<b>Klon</b>	<b>Firma /Ort</b>
$\alpha$ 1 (CD49a)	Fb12	CHEMICON International, Temecula, CA USA
$\alpha$ 4 (CD49d)	P1H4	CHEMICON International, Temecula, CA USA
$\alpha$ v	CHAV-1	CHEMICON International, Temecula, CA USA
$\beta$ 3 (CD61)	B3A	CHEMICON International, Temecula, CA USA
$\alpha$ 2 (CD49b)	P1E6	ONCOGENE, Cambridge, UK
$\alpha$ 3 (CD49c)	P1B5	ONCOGENE, Cambridge, UK
$\alpha$ 5 (CD49e)	P1D6	ONCOGENE, Cambridge, UK
$\beta$ 1 (CD29)		Serotec , Oxford, UK
RGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Thr-Pro)		Sigma, Deutschland

**Tabelle 5:** funktionelle Antikörper gegen Integrinmonomere und RGD-Sequenzen

### 2.1.4 Die Zellen

Für die Versuche wurden drei verschiedene humane Schilddrüsenkarzinomzelllinien und eine Zelllinie aus normalem Schilddrüsen Gewebe in Kultur gehalten. Es handelte sich dabei um die aus Primärtumoren isolierte Hürtelzelllinie XTC (Zielke et al. 1997, Soh et al. 1996), um die follikuläre, den TSH Rezeptor exprimierende Zelllinie HTC+ (Broecker et al. 1997, Derwahl et al. 1993), um die anaplastische Zelllinie Hth74 (Broecker et al. 1997, Heldin et al. 1991), sowie eine aus normalem Schilddrüsen Gewebe isolierte Zelllinie Thy1 (Hoffmann et al. 2005).

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Die Zellen wurden in Monolayer Zellkulturflaschen auf Standardnährmedium für Zellkulturen (s.o.) gehalten, diese wurden bei 37 C°, 100 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 4 % kultiviert.

Alle drei Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Nach dem Verwerfen des verbrauchten Nährmediums und dem Waschen der Zellkulturflaschen mit PBS wurde frisches Nährmedium eingefüllt. Die Zellen bildeten alle sechs bis neun Tage eine konfluente Schicht. Zur Überführung der Zellen in neue Zellkulturflaschen wurden sie mit PBS gewaschen, mit 0,25 % Trypsin/EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst und in frischem Nährmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert und der Überstand zur Entfernung des EDTA abgenommen. Das Zellpellet wurde in frischem Nährmedium resuspendiert und in Abhängigkeit von der gewünschten Konfluenz auf zwei bis drei neue Zellkulturflaschen verteilt.

### **2.2.2 Immunhistochemie**

#### **2.2.2.1 Prinzip**

Bei den hier präsentierten immunhistologischen Arbeiten kam die Avidin-Biotin-Methode zur Anwendung. Das Prinzip basiert auf folgenden Grundlagen:

Es wird ein biotinylierter sekundärer Antikörper benutzt, der gegen den speziesspezifischen Fc-Teil des markierenden primären Antikörpers gerichtet ist. Bei der Biotin-Avidin-Methode bindet an das Biotin des Sekundärantikörpers Avidin. Anschließend gibt man Streptavidin hinzu, welches aufgrund seiner Affinität zu dem Vitamin Biotin an den Sekundärantikörper bindet und dort einen Avidin-Biotin-Komplex etabliert. An diesen Komplex bindet nun mehrfach DAB-Chromogen. Dieses wird in Anwesenheit einer Peroxidase oxidiert und der dadurch entstehende Farbstoff als immunhistochemische Färbung erkennbar.

#### **2.2.2.2 Erstellung der Nativpräparate**

Um die Haftung der Zellen am Objektträger zu verbessern, wurden diese vor der Zellaussaat mit Polyornithin beschichtet, eine Stunde bei 37° inkubiert und im Anschluß mit PBS gespült. Die Tumorzellen wurden mit kaltem PBS gespült und zum Ablösen 30 Minuten auf EDTA 0,02 % inkubiert. Darauf folgend wurden sie in

Normalmedium resuspendiert, verdünnt und auf spezielle vierkammrige Objektträger (Chamber Slides) zu je  $10^4$  Zellen pro Kammer ausgesät. Nach 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Objektträger einem Waschgang unterzogen, welcher dreimaliges Spülen mit PBS beinhaltete. Zur Fixation der Zellen wurden der Objektträger eine halbe Stunde mit Formalin 10 % inkubiert. Ein weiterer Waschschrift folgte. Zur Inaktivierung der endogenen Oxidasen wurde der Objektträger in PBS mit 0,03 % Wasserstoffperoxidanteil für 10 Minuten inkubiert. Als letzter Schritt wurden die Objektträger zur Demaskierung der Antigene 20 Minuten mit Triton X 0,2 % gewaschen.

#### 2.2.2.3 Die Färbung

Zur Färbung wurde das VECTASTAIN ABC- Kit verwendet. Die Objektträger wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit Blockserum (Ziegenerum 5 % in PBS) inkubiert, um unspezifische Antigene zu blockieren, die zu einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers führen könnten. Anschließend wurden die Präparate in PBS gespült und über Nacht bei 4 °C mit verschiedenen in 200 µl PBS verdünnten Konzentrationen des integrinspezifischen Primärantikörpers inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde anstatt des Primärantikörpers Blockserum verwendet. Nach erneutem Spülen der Präparate wurden diese nach Anleitung des VECTASTAIN ABC- Kit mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, Streptavidin (1:100 in PBS) und dem ABC-Reagenz inkubiert und schließlich mit DAB-Chromogen (1 mg/l) angefärbt. Nach Spülen der Schnitte in destilliertem Wasser wurden diese mit Hämalaun für 15 Sekunden gegengefärbt und anschließend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 90 %, 2x 100 % Ethanol und 3x 100 % Xylol) je 5 Minuten entwässert. Schließlich wurden die Objektträger mit Harz beschichtet und eingedeckt.

#### 2.2.2.4 Digitalisierung der immunhistochemisch gefärbten Präparate

Die Digitalisierung der Präparate wurde mit einer auf einem Durchlicht-Mikroskop installierten Digitalkamera durchgeführt. Dieses System Q500MC (Leica) ermöglicht die direkte Einspeisung der digitalisierten Bilder in ein Graphikprogramm.

### 2.2.3 ELISA

#### 2.2.3.1 Prinzip

Der **Enzym-Linked-Immuno-Assay** (ELISA) ermöglicht die quantitative Bestimmung eines Antigens (Proteins). Diese Methode basiert auf dem unten näher beschriebenen Sandwichprinzip.

Das zu bestimmende Antigen, hier VEGF, wird durch einen auf einer Oberfläche fixierten Antikörper gebunden. Anschließend wird ein zweiter gegen das Antigen gerichteter biotinylierter Sekundärantikörper hinzugegeben, der das fixierte Antigen ebenfalls bindet. Diesen Komplex aus zwei Antikörpern, die dasselbe Antigen binden, nennt man Sandwichkomplex. Dieser wird mit Streptavidin markiert, welches an den biotinkonjugierten Sekundärantikörper bindet und dort einen Avidin–Biotin-Komplex formt. An diesen Komplex bindet das Farbreagens Chromogen (Tetramethylbenzidin), welches durch Wasserstoffperoxid aktiviert (oxidiert) als Farbe erkennbar wird. Die Intensivität der Färbung entspricht einer mit Standards definierten Menge des zu bestimmenden Antigens.

Es ist auch möglich eine direkte Antikörperfarbstoffreaktion mit dem Chromogen herzustellen, dabei ist der Sekundärantikörper mit einer Peroxidase konjugiert, die den Farbstoff direkt umsetzt, die Bindungsreaktion mit Streptavidin entfällt.

#### 2.2.3.2 Durchführung

Zur VEGF-Bestimmung wurde das „Quantikine human VEGF-Kit“ der Firma R&D Systems verwendet.

Zur Vorbereitung der VEGF-Bestimmung wurde der zur Berechnung der VEGF-Menge benötigte Standard angesetzt, der von 2000 pg/ml in 50 % Schritten verdünnt bis zur kleinsten Konzentration (ca. 15,6 pg/ml) reichte und damit den möglichen Messbereich vorgab. Als erster Schritt wurde auf die mit einem gegen VEGF gerichteten monoklonalen Antikörper beschichtete 96er Multikammerplatte (MKP) die Pufferlösung und der Nährmediumüberstand bzw. die Standards pipettiert. Nach zweistündiger Inkubation wurde der Überstand entfernt und die Multikammerplatte dreimal mit einem Waschpuffer (Tensiden und Konservierungsstoffen) gespült. Darauf folgend wurden die Kammern mit einer Lösung eines an eine Peroxidase gekoppelten monoklonalen VEGF-Antikörpers befüllt und wiederum zwei Stunden inkubiert.

Nach Entfernen der Antikörperlösung und dem Spülen der Platte wurde diese mit einer 1:1 Mischung aus Wasserstoffperoxid und Chromogen befüllt und 20 Minuten später die Stopplösung, eine zweimolare Schwefelsäurelösung, ergänzt.

#### 2.2.3.3 Auswertung

Die Messung der optischen Dichte wurde mit dem Emax ELISA-Plattenlesegerät durchgeführt. Um eine exakte optische Erfassung zu ermöglichen wurde mit dem dazugehörigem Steuer- und Erfassungsprogramm Softmax eine Auswertungsschablone kreiert sowie die gewünschte Wellenlänge von 450-570 nm eingestellt. Schließlich wurden die Daten zur Auswertung in Microsoft-Excel exportiert.

### 2.2.4 MTT-Assay

#### 2.2.4.1 Prinzip

Das kolorimetrische MTT-Assay dient zur Bestimmung einer relativen Zellzahl. Das Prinzip des MTT-Assay basiert auf der Metabolisierung von wasserlöslichem Dimethylthiazol-diphenyltetrazolium (MTT) in den Mitochondrien der zu bestimmenden Zellen zu wasserunlöslichem blauem Formazan. Dieses liegt dann in den Zellen in kristalloider Form vor. Um die optische Dichte bestimmen zu können, werden die Zellen vor dem Messen mit einer Stopplösung (0,04N HCl, 3 % SDS und 20 % Isopropanol) behandelt, welche die Zellen lysiert und das isopropanollösliche Formazan in Lösung bringt.

Anschließend kann die optische Dichte des gelösten Formazan durch ein ELISA - Plattenlesegerät bei der Wellenlänge von 570-630 nm bestimmt werden. Das Ausmaß der Formazanproduktion ist proportional zur Anzahl der vitalen Zellen.

#### 2.2.4.2 Durchführung

Die Durchführung erfolgte nach einem modifizierten Protokoll (Zielke et al. 1998, Hoffmann et al. 2004) des Originals (Hansen et al. 1989, Röhm et al. 1991). Zu Beginn wurde der Überstand aus den Kammern abpipettiert und ca. 250 µl MTT-Lösung pro Kammer aufpipettiert. Der Ansatz wurde 3 Stunden bei 37 ° inkubiert, um den Mitochondrien der Zellen Zeit zur Metabolisierung des MTT zu geben. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die MTT-Lösung ab- und 500 µl Stopplösung pro Kammer aufpipettiert. Um die Lyse der Zellen zu beschleunigen, wurden die Platten für 1 Minute einem Ultraschallbad ausgesetzt. Anschließend wurde für weitere 20

Minuten inkubiert, um dann abermals die Platten für 5 Minuten dem Ultraschall auszusetzen. Zur Messung war es nötig, die MTT-Lösung auf eine 96er Multikammerplatte umzupipettieren.

#### 2.2.4.3 Auswertung

Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 570 nm, Referenzwellenlänge 630 nm mit dem Emax-ELISA-Plattenlesegerät.

### 2.2.5 FACS

#### 2.2.5.1 Prinzip

Mit der Durchflusszytometrie oder auch „fluorescens-activated-cell-sorting“ (FACS) ist eine quantitative Erfassung eines spezifischen Antigens als Antikörper-Antigen-Komplex auf Zelloberflächen möglich. Das Funktionsprinzip der Durchflusszytometrie ist dem der Immunhistochemie ähnlich.

Der Primärantikörper, ein mono- oder polyklonaler IgG Antikörper verschiedener Spezies, markiert das gewünschte Antigen auf der vitalen Zelle. Ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter Sekundärantikörper bindet an das Fc-Teil des Primärantikörpers. Somit ist jedes Antigen durch einen fluoreszierenden Antikörperkomplex markiert. Im FACS-Gerät fließen diese markierten Zellen durch eine feine Kapillare an einem Laser vorbei. Die durch den Laser induzierte Lichtemission des Fluoreszenzfarbstoffs am Antigen-Antikörper-Komplex wird mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer definierten Wellenlänge detektiert. Die Stärke der Fluoreszenz ist wiederum abhängig von der Anzahl antigenmarkierender Antikörperkomplexe auf der Zelloberfläche, sie ist also proportional zum Vorkommen des dort zu bestimmenden Antigens.

Die Zellen streuen das Laserlicht in Abhängigkeit von ihrer Morphologie auf charakteristische Weise, so dass man aus einer bestimmten Konfiguration der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung auf die Zellgröße und Morphologie schließen kann.

#### 2.2.5.2 Durchführung

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit 0,02 % EDTA von der Kulturflasche gelöst, abzentrifugiert, resuspendiert und gezählt. Im Anschluss in der Konzentration von  $10^6$  Zellen/ml auf 50 ml Polypropylen-Röhrchen verteilt, in denen die weitere Behandlung ablief.



Anschließend wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen eine Stunde mit 10 %igem Ziegenerum inkubiert, im Folgenden erneut gewaschen, abzentrifugiert, resuspendiert und mit dem gewünschten Primärantikörper 15 min auf Eis inkubiert. Bei der Leerkontrolle (Eigenfluoreszenz) und der Sekundärantikörperkontrolle (Eigenfluoreszenz, Sek-AK) wurden diese Schritte ausgelassen. Dies war nötig, um bei der Auswertung die Eigenfluoreszenz der Zellen und die Fluoreszenz der in geringem Ausmaß vorkommenden unspezifischen Bindung des fluoreszierenden Sekundärantikörpers von der Gesamtfluoreszenz der Proben abziehen zu können. Es folgte ein erneuter Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen mit dem fluoreszierenden, Fluorisothiocyanat-markierten Sekundärantikörper (FITC-AK) für 30 min inkubiert. Dieser Schritt wurde nur bei der Leerkontrolle ausgelassen. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Zellen in Sheat-fluid, einer Träger- bzw. Konservierungslösung mit 1%igem Formalinanteil resuspendiert und in spezielle Messröhrchen für das FACS-Gerät überführt.

#### 2.2.5.3 Auswertung

Die Messung der Fluoreszenz erfolgte an einem FACS-Gerät, das an ein Computersystem (Apple) mit der Software „Cell Quest“ (Becton Dickinson) zur Erfassung der Daten angeschlossen war. Dieses erlaubte das „Gaten“, also das Herausfiltern der apoptotischen und damit für die Auswertung uninteressanten Zellen. Die Aufarbeitung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel.

### **2.2.6 Zytosol**

#### 2.2.6.1 Prinzip

Durch Zelllyse und Zentrifugation wird Zytosol gewonnen, das Hinweise auf die intrazelluläre Stoff-Konzentrationen geben soll.

#### 2.2.6.2 Durchführung

Zur Gewinnung des Zytosols wurde der Überstand der Zellen aus den MKP abpipettiert. Alle folgenden Schritte liefen unter Eiskühlung ab. Die Zellen wurden mit RIPA (Extraktionslösung) versetzt, anschließend vorsichtig suspendiert und 30 min inkubiert. Zum Aufbrechen der Zellen wurde die Zelllösung mehrfach durch eine Nadel (21G) gezogen und anschließend PMSF (Proteaseinhibitor, 10 mg/ml) zugesetzt. Nach 30 min Inkubation wurde die Zellsuspension in ein 1ml Eppendorf-

Gefäß überführt und 20 min bei 15000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zytosol abpipettiert und weiterverarbeitet.

## **2.2.7 Proteinassay**

### 2.2.7.1 Prinzip

Bei dem hier zur Anwendung gekommenen Proteinassay handelt es sich um ein kolorimetrisches Assay, bei dem Proteine in Lösung gebracht und anschließend modifiziert nach dem Lowry Assay nachgewiesen werden. Die Protein-Quantifizierung nach Lowry et al. 1951 beruht auf der Umsetzung von  $\text{Cu}^{2+}$  -Ionen zu  $\text{Cu}^+$  in Anwesenheit von Proteinen unter alkalischen Bedingungen. Das entstandene  $\text{Cu}^+$  führt bei Umsetzung mit dem Folin-Ciocalteu-Reagenz zur Bildung eines blauen Farbstoffs. Dieses Reagenz ist komplex zusammengesetzt und enthält Molybdat, Wolframat, Phosphor- und Salzsäure.

### 2.2.7.2 Durchführung

Die Zellen werden wie beim Zelllysate (siehe 2.2.6.2) mit RIPA versetzt, eisgekühlt inkubiert und durch eine Nadel(21G) gezogen, um sie aufzubrechen. Nach Zusatz von PMSF und einer weiteren Inkubationzeit (s.o.) wurden jeweils 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension auf eine 96er MKP umpipettiert. Nach dem Hinzugefügen zweier weiterer kolorimetrisch aktiver Substanzen (Protein Assay, Bio Rad) wurde die optische Dichte gemessen.

### 2.2.7.3 Auswertung

Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 650 nm mit dem Emax-ELISA-Plattenlesegerät.

## **2.3 Versuchsprotokolle**

### **2.3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Integrinen verschiedener Schilddrüsentumorzellen und Normalgewebezellen**

#### 2.3.1.1 Einleitung

Ziel des immunhistochemischen Integrinnachweises war die Untersuchung verschiedener Schilddrüsentumorzellen auf das Vorkommen einer unten näher erläuterten Auswahl von Integrinen. Die benutzten Integrinantikörper waren die zu

dieser Zeit (in den Jahren 2000 bis 2002) bestcharakterisierten Antikörper, welche auf dem Markt verfügbar waren. Heterodimere waren nicht verfügbar. Die Konzentration entsprach den etablierten Standards, der auf diesem Gebiet führenden Forschungsgruppen (Brooks et al. 1994b).

### 2.3.1.2 Versuchsprotokoll

Für diesen Versuch wurden die Zelllinien XTC, HTC+, Hth74 und Thy1 in Kultur gehalten. Diese wurden für die Färbung auf Objektträger aufzentrifugiert und fixiert (siehe 2.2.2.2). Zur Erfassung der Integrinkonfigurationen auf der Oberfläche der Zellen durch Färbung wurden die in der Tabelle 6 aufgeführten Integrinantikörper in den ausgewiesenen Konzentrationen benutzt.

<b>Integrin</b>	<b>Konzentrationen</b>	<b>Verdünnungen in PBS</b>
$\alpha$ 1 CD49a	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/400, 1/600, 1/900
$\alpha$ 2 CD49b	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\alpha$ 3 CD49c	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/400, 1/600, 1/900
$\alpha$ 4 CD49d	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/400, 1/600, 1/900
$\alpha$ 5 CD49e	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\beta$ 1 CD 29	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\beta$ 2 CD 18	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\beta$ 3 CD 61	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\beta$ 4 CD 104	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\beta$ 7	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\alpha$ 6 CD49f	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/200, 1/400, 1/600
$\alpha$ v	1 $\mu$ g/ $\mu$ l	1/400, 1/600, 1/900

**Tabelle 6:** Integrinantikörper und Konzentrationen

### 2.3.1.3 Auswertung

Zur Auswertung wurden die Färbungen optisch semiquantitativ erfasst. Dazu wurden immer vom gleichen Untersucher die Objektträger mit den farbmarkierten Zellen mittels Mikroskop analysiert. Es wurden jeweils 10 HPF's der jeweiligen Verdünnung hinsichtlich der Farbintensivität in einer Skala von 0-4 bewertet. Die Negativkontrolle (Blockserum anstatt des Primärantikörpers) wurde mit 0, die stärkste Färbung mit 4 definiert. Abschließend wurden die Ergebnisse der verschiedenen Zelllinien verglichen.

### **2.3.2 Einfluss von blockierenden Integrinantikörpern auf die VEGF-Produktion von Schilddrüsentumorzellen der XTC und HTC+-Zellreihe**

#### 2.3.2.1 Einleitung

Die immunhistologische Integrinkartierung zeigte insbesondere bei den untersuchten Tumorzelllinien ein breites Spektrum an Integrinen. Diese Versuchsreihe sollte exemplarisch an den Zelllinien XTC und HTC+ klären, ob die Signaltransduktion über Integrine Einfluss auf die VEGF-Basalsekretion von Schilddrüsentumorzellen besitzt. Dazu wurden einzelne Integrine mit blockierenden Integrinantikörpern besetzt. Anschließend wurde die basale VEGF-Sekretion in vitro von den mit Antikörpern behandelten Zellen und die einer Kontrollgruppe ohne Antikörperbehandlung anhand eines ELISA ermittelt und verglichen.

#### 2.3.2.2 Versuchsprotokoll

Die Zellen wurden für ca. 48 Stunden unter serumfreien Bedingungen (H5-Medium) kultiviert, um sie vor unerwünschten Einflüssen durch die verschiedenen Bestandteile des Normalnährmediums (z.B. FCS, siehe 2.1.1) zu bewahren. Es erfolgten PBS-Spülung, Ablösung der Zellen mit 0,02 % EDTA und Überführung in Polypropylenröhrchen in üblicher Weise. Anschließend wurden sie zentrifugiert, in PBS resuspendiert und zu  $10^5$  Zellen/250  $\mu$ l PBS pro Kammer auf eine 48er Multikammerplatte ausgesät. Anschließend gab man pro Kammer eine definierte Menge Integrin-Antikörper hinzu (siehe Ergebnisteil Kapitel 3.2). Ausgenommen wurden die Leerkontrollen, die als Vergleichsgruppe ohne Antikörper dienten. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Zur Verzögerung der Adhärenz der Zellen an den Kammerwänden wurden die MKP während der Inkubationszeit geschwenkt. Die Zellen wurden zum Entfernen der überschüssigen Antikörper mit PBS gewaschen, abzentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach Resuspendierung in 250  $\mu$ l H5 ließ man den Zellen anschließend 24 Stunden, um adhärenz zu werden. Es folgte der Austausch des H5-Mediums und weitere 48 Stunden Inkubationszeit. Schließlich wurde der Überstand abgenommen und die Menge des sezernierten VEGF mit einem VEGF-ELISA bestimmt (siehe 2.2.3).

Da Schwankungen der Zellzahl einen großen Einfluss auf den in der Auswertung wichtigen Quotienten VEGF/Zellmenge haben, wurde die Zellzahl per MTT-Assay abschließend überprüft (siehe 2.2.4).

### 2.3.2.3 Deskriptive Auswertung

Aus der optischen Dichte (OD) des ELISA und des MTT-Assay wurde nach folgender Formel ein Quotient errechnet:

$$\text{OD VEGF} / \text{OD MTT}$$

Der Quotient verrechnet die Zellzahl mit der produzierten Konzentration an VEGF, und gibt so Auskunft über die VEGF-Sekretion einer bestimmten Anzahl von Zellen. Die Quotienten der Vergleichsgruppe ohne Antikörper wurden mit denen mit Antikörperbehandlung verglichen. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

### **2.3.3. Untersuchung der VEGF-Sekretion der Schilddrüsentumorzelllinien XTC und HTC+ unter Einfluss verschiedener Substanzen der extrazellulären Matrix**

#### 2.3.3.1 Einleitung

Die folgende Untersuchung sollte Aufschluss über den integrinvermittelten Einfluss verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix auf die VEGF-Sekretion von Schilddrüsentumorzellen geben.

Exemplarisch für die Schilddrüsentumorzellen wurden für die Versuchsreihe die Zelllinien XTC und HTC+ untersucht. Die Zellen wurden für 48 Stunden auf mit Matrixkomponenten beschichteten Platten kultiviert und anschließend die VEGF-Sekretion mit einer Kontrollgruppe ohne Matrixbeschichtung verglichen.

#### 2.3.3.2 Versuchsprotokoll

Für den Versuch wurden eine 48er MKP mit den in H5 verdünnten Matrixkomponenten Kollagen I (20 µg/ml), Kollagen IV (20 µg/ml), Laminin (20 µg/ml), Fibronectin (20 µg/ml) und Matrigel (100 µg/ml) in Duplikatur beschichtet. Die Platte wurde anschließend für eine Stunde bei 37 °C und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde sie vor Verwendung mit DPBS und H5 gewaschen. Die Zellen für den Versuch wurden ab 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf H5-Mangelnährmedium mit 1 % FCS kultiviert. Anschließend wurden sie mit EDTA von ihrer Kulturflasche gelöst, zentrifugiert, in H5 resuspendiert und zu je 10<sup>5</sup> Zellen pro Kammer auf die 48er MKP aufpipettiert. Dabei wurden als Kontrollgruppe auch Zellen in Kammern ohne Matrixkomponenten eingesät. Die Platte wurde für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Überstand

abgenommen und die darin sezernierte VEGF-Menge anhand eines VEGF-ELISA bestimmt. Die Zellmengen in den Kammern wurden durch ein MTT-Assay ermittelt.

#### 2.3.3.3 Deskriptive Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Quotienten aus optischer Dichte von VEGF aus dem Überstand und der optischen Dichte des MTT der Zellen auf der Platte. Die Quotienten der matrixfreien Vergleichsgruppe wurden als Referenzwert gegenüber denen mit Matrixkomponenten verwendet. Die Quotienten der auf Matrixkomponenten kultivierten Gruppe wurden durch den Quotienten der nicht auf Matrixkomponenten kultivierten dividiert.

$$\frac{\text{OD VEGF/MTT (Ansätze auf Matrixkomponenten)}}{\text{OD VEGF/MTT (Ansätze ohne Matrixkomponenten)}}$$

### **2.3.4 Beeinflussung der durch Fibronectin induzierten VEGF-Sekretion von XTC-Zellen durch Integrin-Antikörper und RGD-Sequenzen**

#### 2.3.4.1 Einleitung

Der folgende Versuch sollte ergründen, ob die matrixabhängige VEGF-Sekretionsveränderung von bestimmten Integrinen der Tumorzellen abhängig ist. Dazu wurden verschiedene Integrine der XTC-Zellen mit spezifischen Integrinantikörpern und RGD Sequenzen inkubiert. RGD-Sequenzen sind kurze Aminosäuresequenzen, die die integrinspezifischen Bindungsstellen u.a. des FN imitieren und an Integrine binden. Dabei wird durch kompetitive Ausschaltung der für die Fibronectinbindung zuständigen Integrine eine Bindung der Zelle an FN verhindert. Die Integrinblockade soll den VEGF-sekretionsfördernden Effekt von Fibronectin beeinflussen.

#### 2.3.4.2 Versuchsprotokoll

Eine 48er MKP wurde mit auf 20 µg/ml verdünntem Fibronectin beschichtet. Die Platte wurde eine Stunde bei 37 °C und 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden für 24 Stunden auf H5-Nährmedium kultiviert. Anschließend wurden sie nach PBS-Spülung mit kaltem 0,25 %igem EDTA von den Kulturflaschen gelöst, abzentrifugiert, in frischem H5-Medium resuspendiert und gezählt. Die in PBS gelösten Antikörper (5 µg/ml) und RGD-Sequenzen (100-1000 µg/ml) wurden auf die vorher mit DPBS und H5-Medium gewaschenen Kammern der 24er MKP verteilt. Die

Zellen wurden zu je  $10^5/0,5$  ml H5 in die Kammern ausgesät und die MKP eine Stunde auf einem Schwenker bewegt. Damit wurde die Zelladhäsion verzögert und den Antikörpern bzw. RGD-Sequenzen mehr Zeit zur Bindung an die Integrine gegeben. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C für 12 Stunden inkubiert. Nach Erneuerung des H5-Nährmediums und weiteren 24 Stunden Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand abgenommen und mit einem VEGF-ELISA die VEGF-Menge bestimmt. Die Zelldichte in den Kammern der Platte wurde anhand eines MTT ermittelt.

Zur Differenzierung zwischen VEGF-Sekretion und VEGF-Produktion der Tumorzellen wurde bei ausgewählten Versuchsreihen am Ende durch Erstellung eines Zelllysats das intrazelluläre VEGF bestimmt.

#### 2.3.4.3 Deskriptive Auswertung

Aus der optischen Dichte von VEGF und MTT wurde ein Quotient errechnet, der Aussagen über das Verhältnis der VEGF-Produktion zur Zellmasse erlaubt.

### **2.3.5 Einfluss von VEGF auf die Integrinexpression von Schilddrüsentumorzellen der XTC-Zelllinie**

#### 2.3.5.1 Einleitung

Ziel dieser Untersuchung war es, den Einfluss von VEGF auf die Integrinexpression von Schilddrüsentumorzellen am Beispiel von XTC zu charakterisieren.

So sollte nachgeprüft werden, ob ein autokriner Regelkreis zwischen Integrinen und VEGF existiert, beispielsweise VEGF die VEGF-assoziierten Integrine hochregulieren kann. Die Zellen wurden unter hohen Konzentrationen von VEGF kultiviert und anschließend auf Veränderungen in der Integrinexpression untersucht.

#### 2.3.5.2 Versuchsprotokoll

Die Zellen vom Typ XTC wurden vor Beginn der Behandlung in Zellkulturflaschen für 24 Stunden in H5-Medium kultiviert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde dieses durch ein mit VEGF (siehe Tabelle 7) angereichertes Nährmedium ersetzt. Als Kontrollgruppe wurde eine Zellkulturflasche mit XTC-Zellen ohne VEGF-Zusatz auf H5-Medium kultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Integrinkonfigurationen der behandelten, als auch der unstimulierten Zellen anhand der Durchflusszytometrie (siehe 2.2.5) bestimmt und auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Die Versuche wurden in Triplets durchgeführt.

<b>Integrin</b>	<b>VEGF-Konzentrationen</b>		<b>Einheit</b>
Leer	0	0	ng/ml
Sekundärantikörper	20	50	ng/ml
α1	20	50	ng/ml
α2 CD49b	20	50	ng/ml
α3 CD49c	20	50	ng/ml
α4 CD49d	20	50	ng/ml
α5 CD49e	20	50	ng/ml
β1 CD 29	20	50	ng/ml
β2 CD 18	20	50	ng/ml
β3 CD 61	20	50	ng/ml
β 4 CD 104	20	50	ng/ml
α6 CD49f	20	50	ng/ml
αv	20	50	ng/ml

**Tabelle 7:** Die Tabelle zeigt die auf den XTC-Zellen untersuchten Antikörper und die VEGF-Konzentration im zur Kultur der Zellen verwendeten Nährmedium.

### 2.3.5.3 Deskriptive Auswertung

Die Rohwerte des FACS-Gerätes wurden in Excel übertragen und dort nach Errechnung eines Quotienten zur Interpolation der Eigen- und Sekundärantikörperfluoreszenz aufgearbeitet.

Formel zur Ermittlung des interpolierten Fluoreszenzwertes:

$$FwAK^1 * (1 / Fw Sek-AK) = Fw AK^2$$

Fw Fluoreszenzwert

AK Antikörper

Sek-AK Sekundärantikörper

<sup>1</sup> mit unspezifischer Eigen-u. Sek-AK-Fluoreszenz

<sup>2</sup> ohne unspezifische Eigen u. Sek-AK-Fluoreszenz.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Immunhistochemischer Nachweis von Integrinen bei verschiedenen Schilddrüsentumorzellen und Normalgewebe

##### 3.1.1 Einleitung

Zellen der Zelllinien XTC, HTC+, Hth74 und Thy1 wurden im Rahmen dieser Untersuchung immunhistochemisch auf folgende Fragestellungen untersucht:

- Welche Integrine werden von den Zellen exprimiert?
- Gibt es histotyp-assoziierte Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten in der Integrinexpression?
- Gibt es einen Unterschied in der Integrinexpression der karzinom-assoziierten Zelllinien und der des Normalgewebes?

##### 3.1.2 Integrinexpression der verschiedenen Zelllinien im Vergleich

Bei den untersuchten Zelllinien konnte immunhistochemisch ein breites Spektrum an Integrinen nachgewiesen werden (siehe exemplarisch Abbildungen I-VI).

Die Tabelle 8 zeigt die detaillierte Auflistung der Integrinexpressionen aller 4 Zelllinien. Alle untersuchten Zelllinien exprimieren die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  sowie  $\beta 1$  und  $\beta 3$ . Die Zelllinien Hth, HTC+ und Thy1 exprimieren außerdem das Integrin  $\alpha v$ . Das Integrin  $\alpha 5$  ist bei Hth und HTC+ Zellen zu finden. Das Integrin  $\alpha 6$  ist nur auf den Zellen der XTC Zelllinie nachweisbar. Nur auf Hth-Zellen kommt das Integrin  $\beta 7$  vor. Auf keiner der Zelllinien ist das Integrin  $\beta 4$  nachweisbar.

Vergleicht man die Tumorzelllinien mit der Zelllinie aus normalem Schilddrüsengewebe Thy1 (Tabelle 9), so fällt auf, dass nur die Tumorzelllinien  $\alpha 1$  und  $\beta 2$  exprimieren, bei Thy1 fehlen diese Integrine. Die Integrine  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 7$  sind ausschließlich, wenn auch nicht durchgängig, bei onkogenen Zelllinien nachweisbar.

**Tabelle 8:** Bestimmung der Integrinexpression verschiedener onkogener und physiologischer Schilddrüsenzelllinien mittels Immunhistochemie.

Integrin	HTh	HTC+	XTC	Thy1
Sek.-AK	○	○	○	○
$\alpha$ 1 (CD 49a)	+++	+++	+	○
$\alpha$ 2 (CD 49b)	++	+++	++	+++
$\alpha$ 3 (CD 49c)	++++	+++	+++	+++
$\alpha$ 4 (CD 49d)	+	○	○	○
$\alpha$ 5 (CD 49e)	+	++	+	○
$\beta$ 1 (CD 29)	++++	+++	+++	++++
$\beta$ 2 (CD 18)	+○	+	+	○
$\beta$ 3 (CD 61)	+++	+++	+++	+++
$\beta$ 4 (CD 104)	○	○	○	○
$\beta$ 7	++	○	○	○
$\alpha$ 6 (CD 49f)	○	○	+	○
$\alpha$ v	++	+++	+	+++

Lichtmikroskopische Analyse n=2, Methode der Quantifikation:

Die Expression wurde wie im vorherigen Kapitel beschrieben ermittelt und wie folgt aufgeführt:

sehr starke Expression: ++++

starke Expression: +++

moderate Expression: ++

schwache Expression: +

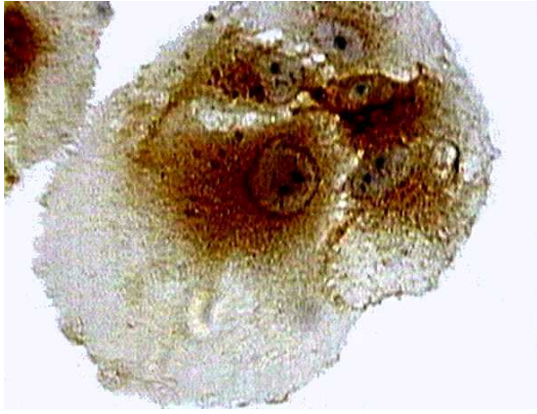
keine Expression: ○

**Tabelle 9:** Karzinom- und normale Schilddrüsenzelllinien im Vergleich

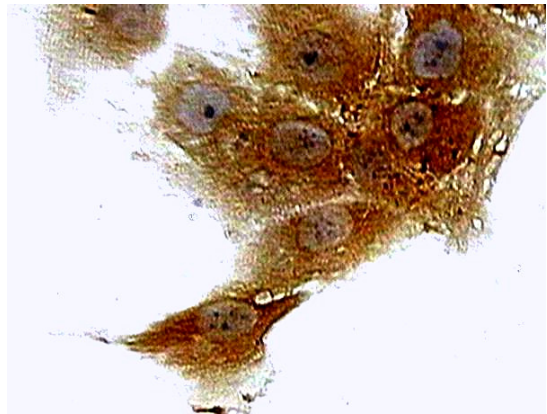
Integrin	Karzinom Zelllinien	Normale Zelllinie
$\alpha$ 1	●	○
$\alpha$ 2	●	●
$\alpha$ 3	●	●
$\alpha$ 4	●	○
$\alpha$ 5	●	○
$\beta$ 1	●	●
$\beta$ 2	●	○
$\beta$ 3	●	●
$\beta$ 4	○	○
$\beta$ 7	●	○
$\alpha$ 6	●	○
$\alpha$ v	●	●

Keine Expression ○

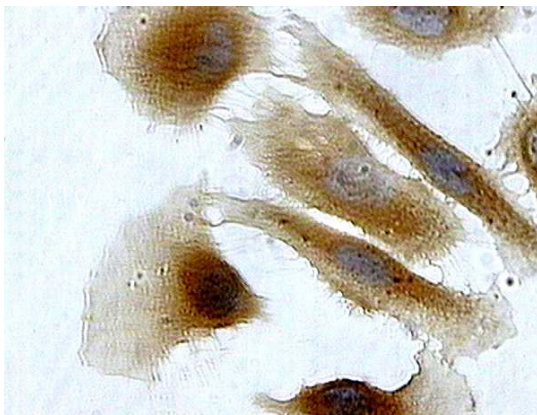
Expression: ●



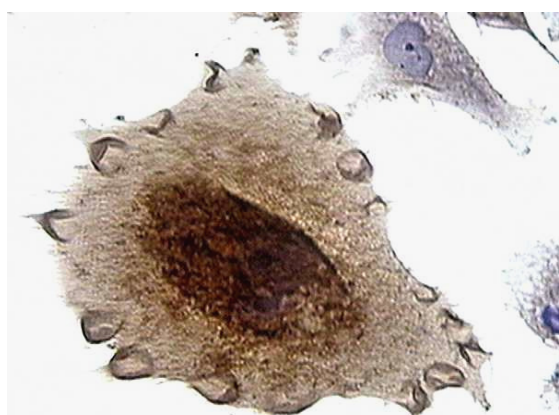
**Abbildung I:**  $\beta$ 1-Integrin markierte Hth-Zellen



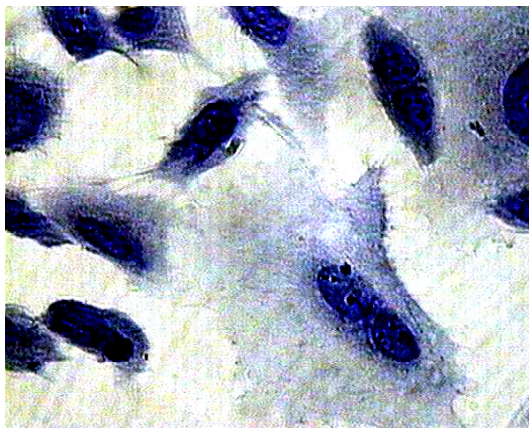
**Abbildung II:**  $\alpha$ 4-Integrin markierte Hth-Zellen



**Abbildung III:**  $\alpha$ 3-Integrin markierte XTC-Zellen



**Abbildung IV:**  $\beta$ 3-Integrin markierte XTC-Zellen



**Abbildung V:** unmarkierte XTC-Zellen



**Abbildung VI:**  $\beta$ 3-Integrin markierte HTC+-Zellen

Von den verschiedenen Tumor- und normalen Schilddrüsenzelllinien wird ein breites Spektrum von Integrinen exprimiert. Es zeigen sich sowohl histotyp-assoziierte Ähnlichkeiten als auch Unterschiede zwischen onkogenen und normalen Zelllinien.

### 3.2 Einfluss von blockierenden Integrinantikörpern auf die VEGF-Basalsekretion von Schilddrüsentumorzellen der XTC und HTC+ -Zellreihe

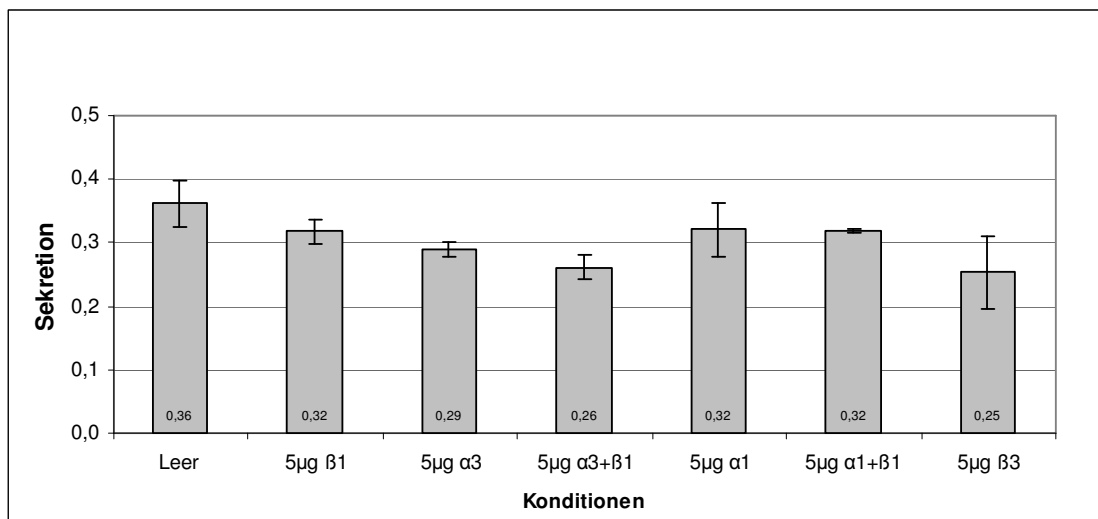
#### 3.2.1 Einleitung

Schilddrüsentumorzellen sezernieren VEGF. In den folgenden Untersuchungen sollte anhand der Schilddrüsentumorzelllinien XTC und HTC+ analysiert werden, welche Rolle Integrine in diesem Zusammenhang spielen. Durch spezifische Integrinantikörper wurden die auf der jeweiligen Tumorzelllinie am häufigsten vorkommenden Integrine selektiv blockiert, um folgende Fragestellung zu klären:

- Wird die VEGF-Sekretion durch Integrine getriggert?
- Kann man diese eventuelle Triggerung mit Antikörpern unterbinden?

#### 3.2.2 VEGF-Sekretion von XTC-Zellen unter Behandlung mit Integrinantikörpern

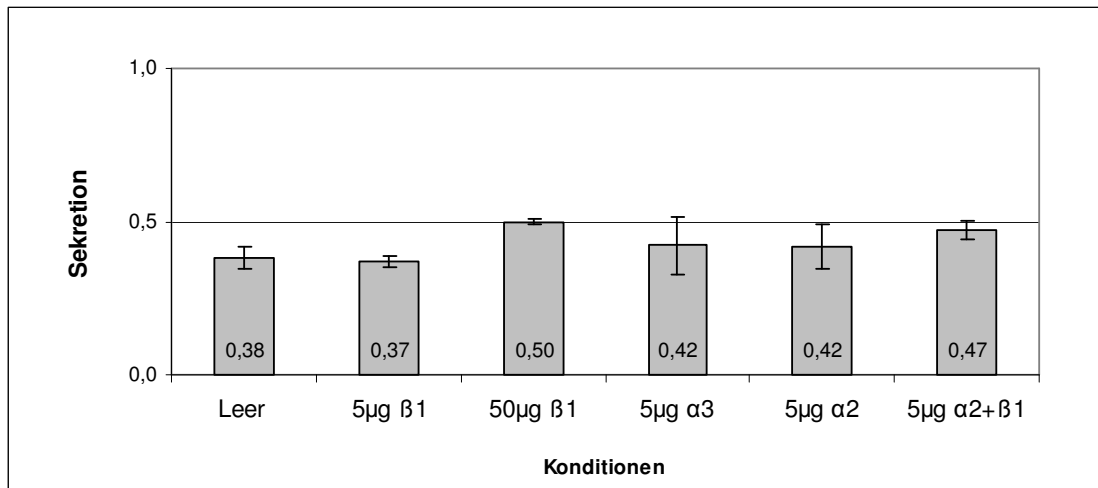
Die unten in Abbildung VII dargelegten Versuchsergebnisse nach 48h geben keine Hinweise auf eine Änderung der VEGF-Sekretion von XTC-Zellen unter Einfluss der Antikörper gegen die besonders mit der Angiogenese assoziierten Integrine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$  (siehe 1.6). Alle Quotienten und Standardabweichungen dieser Integrine liegen im Schwankungsbereich der Vergleichsgruppe (Kontrolle) ohne Antikörper.



**Abbildung VII:** Zellzahlreferenzierte VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von Schilddrüsenkarzinomzellen (Zelllinie XTC) nach Inkubation mit den folgenden Antikörpern (5µg/ml):  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$  sowie der Kombination  $\alpha 3 + \beta 1$  und  $\alpha 1 + \beta 1$ . „Leer“ ist die Kontrolle ohne Antikörper. Die Integrinmonomere  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$  sind auf den XTC-Zellen am deutlichsten exprimiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der aus n=2 Versuchen.

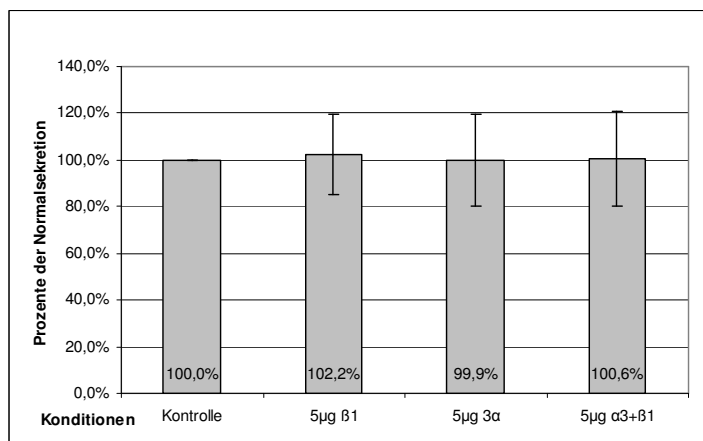
Auch die Kombination der Antikörper  $\beta 1\alpha 3$  und  $\beta 1\alpha 1$  zeigt keinen eindeutigen Effekt auf die angegebene VEGF-Sekretion, auch hier liegen die Mittelwerte mit ihrer Schwankungsbreite in der Nähe des Vergleichswertes.

Die in den Abbildung VIII gezeigten Resultate der besonders stark exprimierten Integrine  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 2$  lassen ebenfalls nicht auf einen Effekt schließen.



**Abbildung VIII:** Zellzahlreferenzierte VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von Schilddrüsenkarzinomzellen (Zelllinien XTC) nach Inkubation mit den folgenden Antikörpern: 5 µg/ml  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 2$  sowie der Kombination  $\beta 1+\alpha 2$  und 50 µg/ml  $\beta 1$ . Kontrolle („Leer“) ohne Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2 Versuchen.

Es gibt keine greifbaren Unterschiede in den VEGF-Quotienten. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration hier am Beispiel des  $\beta 1$ -AK zeigt ebenso wie eine Kombination der Antikörper ( $\beta 1$  und  $\alpha 2$ ) keine Hinweise auf eine Wirkung auf die VEGF-Sekretion.

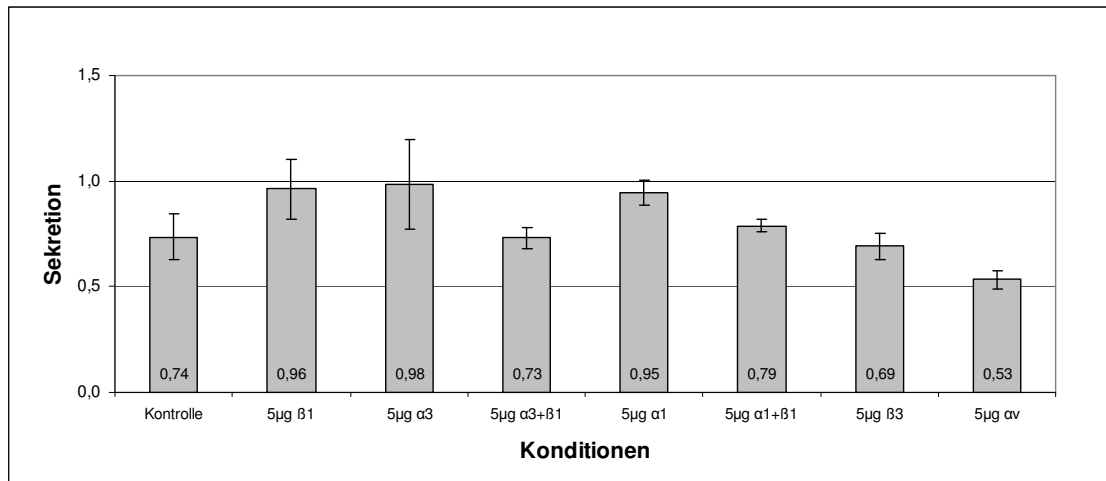


**Abbildung IX:** Zellzahlreferenzierte VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von XTC-Zellen nach Integrin-antikörperbehandlung. Zur Verdeutlichung wurden die Werte ( $\alpha 3$  u.  $\beta 1$ ) aus n=4 Versuchen in Prozent der Kontrolle ohne Antikörper angegeben.

Wie aus der Abb. IX zu entnehmen ist, gibt es keinen deutlichen Unterschied in der Sekretion zwischen mit Antikörpern ( $\alpha 3$  und  $\beta 1$ ) behandelten und unbehandelten Tumorzellen. Es kommt nur zu Schwankungen um den in etwa gleichen Mittelwert.

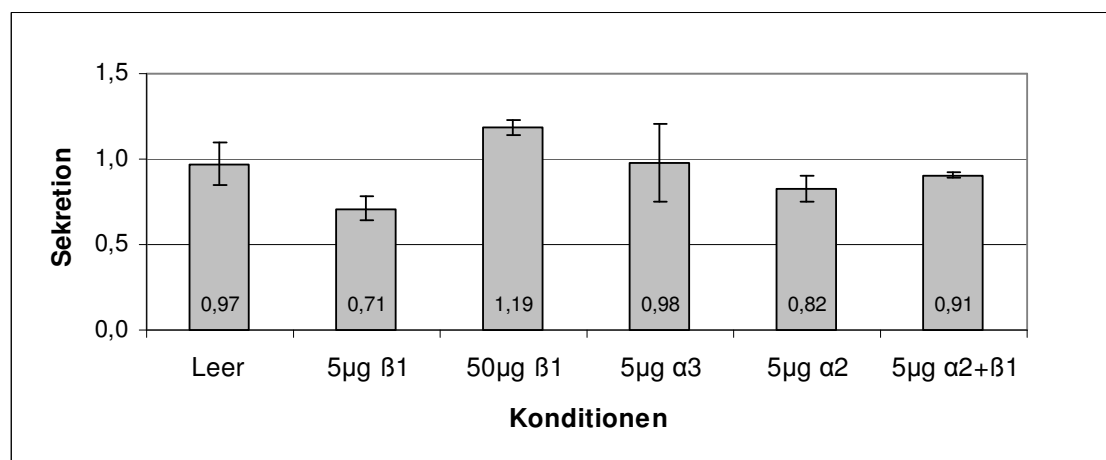
### 3.2.3 VEGF-Sekretion von HTC+-Zellen unter Behandlung mit Integrinantikörpern

Abbildung X zeigt die Versuchsergebnisse nach 48h Inkubation. Die Quotienten und Standardabweichungen der Integrine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$  liegen im Schwankungsbereich der Vergleichsgruppe (Kontrolle) ohne Antikörper.



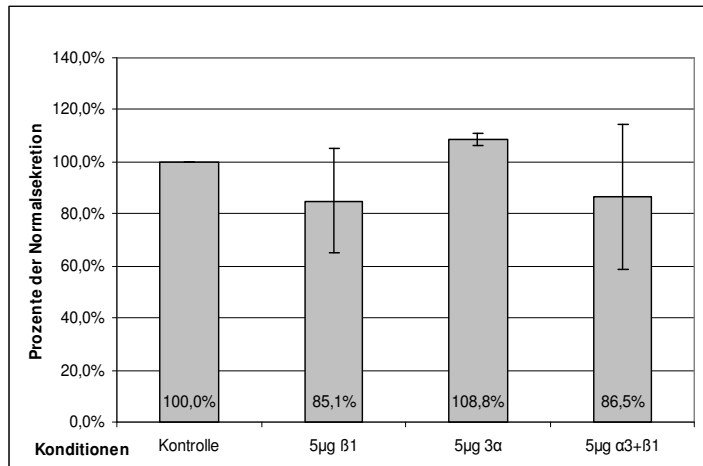
**Abbildung X:** Zellzahlreferenzierte VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von Schilddrüsenkarzinomzellen (Zelllinien HTC+) nach Inkubation mit den folgenden Antikörpern (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ):  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha v$  sowie der Kombination  $\alpha 3+\beta 1$  und  $\alpha 1+\beta 1$ . Kontrolle ohne Antikörper. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=2 Versuchen.

Die Ergebnisse weisen nicht auf eine eindeutige Änderung der VEGF-Sekretion von HTC+ Zellen unter Einfluss der Integrinantikörper hin. Auch die Kombinationen der Antikörper  $\beta 1\alpha 3$  und  $\beta 1\alpha 1$  zeigt keinen eindeutigen Effekt auf die VEGF-Sekretion, auch hier liegen die Mittelwerte mit der Schwankungsbreite in der Nähe des Vergleichswertes. Die Resultate der Versuche mit den stark exprimierten Integrinen  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$  und  $\alpha 2$  (Abb. XI) lassen ebenfalls nicht auf einen Effekt schließen.



**Abbildung XI:** Zellzahlreferenzierte VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von Schilddrüsenkarzinomzellen (Zelllinien HTC+) nach Inkubation mit den folgenden Antikörpern (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ):  $\beta 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 2$ , sowie der Kombination  $\beta 1\alpha 2$  und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$   $\beta 1$ . Kontrolle ohne Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte aus n=2 Versuchen.

Es gibt keine klaren Unterschiede in den VEGF-Quotienten. Die Erhöhung der Antikörperkonzentration des  $\beta$ 1-AK zeigt ebenso wie eine Kombination der Antikörper ( $\beta$ 1 und  $\alpha$ 2) keine Wirkung auf die VEGF-Sekretion.



**Abbildung XII:** Zellzahlreferenzierte VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von HTC+-Zellen nach Integrinantikörperbehandlung. Zur Verdeutlichung wurden die Werte ( $\alpha$ 3 u.  $\beta$ 1) aus n=4 Versuche in Prozent der Kontrolle ohne Antikörper angegeben.

Wie in der Abbildung XII zu sehen ist, gibt es keinen offensichtlichen Unterschied in der Sekretion zwischen mit Antikörpern ( $\alpha$ 3 und  $\beta$ 1) behandelten und unbehandelten HTC+ Tumorzellen. Es kommt anscheinend nur zu Schwankungen um den etwa gleichen Mittelwert.

Abschließend kann mit Blick auf die oben gezeigten Ergebnisse davon ausgegangen werden, dass die eingesetzten Antikörper keinen relevanten Einfluss auf die VEGF-Sekretion nehmen. Falls eine Triggerung durch Integrine bestehen sollte, wird diese von den Antikörpern weder unterbunden noch anderweitig beeinflusst.

### 3.3 Untersuchung der VEGF-Sekretion der Schilddrüsentumorzelllinien XTC und HTC+ auf verschiedenen Substanzen der extrazellulären Matrix

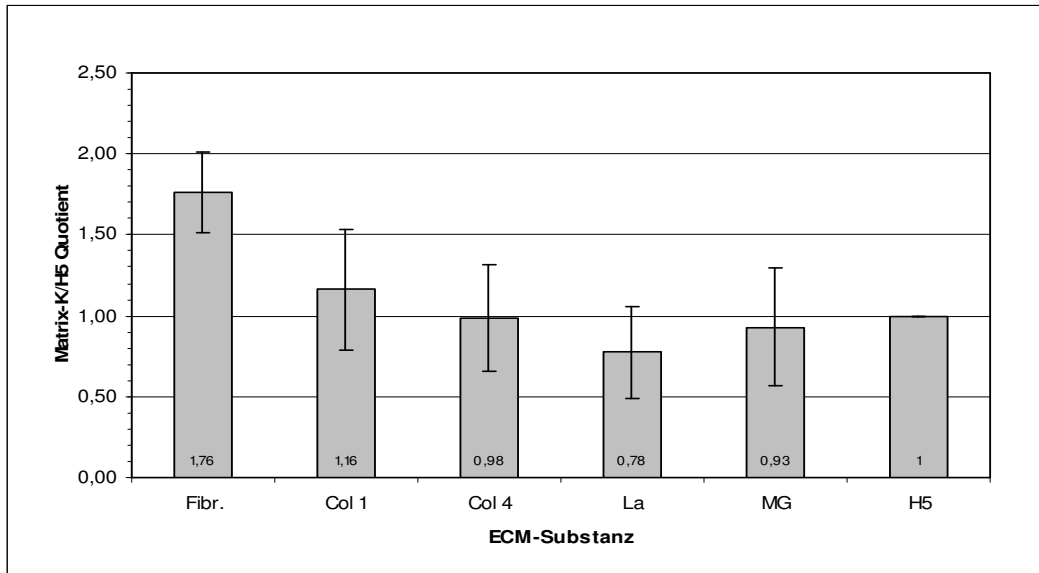
#### 3.3.1 Einleitung

Die VEGF-Sekretion und MTT-Werte von auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix kultivierten Schilddrüsentumorzellen der XTC- und HTC+-Zelllinien wurden im Hinblick auf folgende Fragestellungen untersucht:

- Haben Matrixkomponenten Einfluss auf die VEGF-Sekretion von Schilddrüsentumorzellen?
- Gibt es hinsichtlich des Einflusses von Matrixkomponenten Unterschiede zwischen verschiedenen Tumoren bzw. Tumorzelllinien?

### 3.3.2 VEGF-Sekretion von XTC-Zellen auf verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix im Vergleich zu einer XTC-Gruppe ohne Matrixkomponenten

Wie die graphische Aufarbeitung in Abbildung XIII zeigt, liegen die Werte der Zellen auf Laminin etwas unter den Vergleichswerten. Die Collagen I und Collagen IV-Werte verteilen sich um den Bereich des Vergleichswerts (H5).



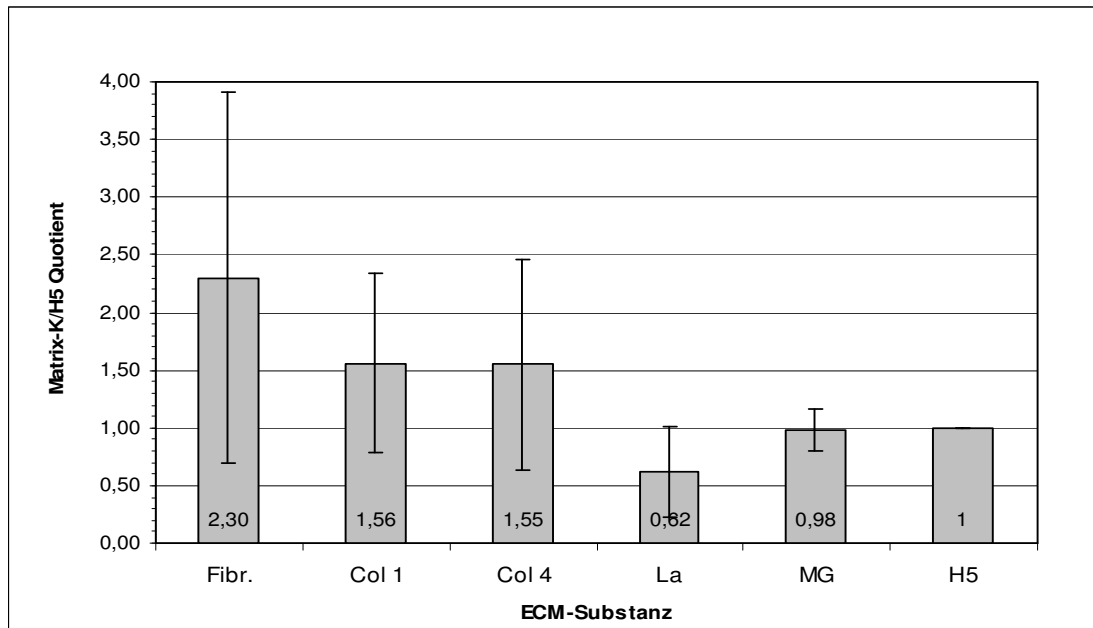
**Abbildung XIII:** VEGF-Produktion der XTC-Zelllinie auf Matrixsubstanzen. Mittelwerte der Matrixkomponente/H5-Quotienten der n=4 doppelt angelegten Versuche. Die benutzten Matrixkomponenten sind: Fibronectin (Fibr.), Kollagen I (Col.1), Kollagen IV (Col.4), Laminin (La) und Matrigel (MG). Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde der VEGF/MTT-Quotient der Zellen auf Matrixkomponenten durch den VEGF/MTT-Quotienten der Zellen ohne Matrixkomponente (H5) dividiert (H5 daher=1).

Die Zellgruppe auf Fibronectin liegt mit Mittelwert und Standardabweichung über dem des Vergleichswerts (H5). Die VEGF-Konzentration pro Zelle im Überstand liegt um 76 % höher als die der Vergleichsgruppe.

Die nach 24stündiger Inkubationszeit analysierten Resultate der HTC+-Zellen sind in der Abbildung XIV wiedergegeben. Die VEGF-Werte der HTC+-Zellen auf Kollagen I (Col.1), Kollagen IV (Col.4) und Fibronectin liegen jeweils um 56 % (Col.1), 55 % (Col.IV) bzw. 130 % (Fibr.) höher als der Vergleichswert ohne Matrixkomponenten (H5).

Die Aussagekraft dieser Werte wird jedoch durch die großen Standardabweichungen eingeschränkt. Die Zellen auf Matrigel unterscheiden sich nicht vom Vergleichswert, wohingegen die Werte der Zellen auf Laminin eher etwas unter dem des Vergleichswertes liegen, jedoch ist auch hier die Aussagekraft durch die hohe Standardabweichung eingeschränkt.





**Abbildung XIV:** VEGF-Produktion der HTC+-Zelllinie auf Matrixsubstanzen. Mittelwerte der n=3 doppelt angelegten Versuche. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurde der VEGF/MTT-Quotient der Zellen auf Matrixkomponenten durch den VEGF/MTT-Quotient der Zellen ohne Matrigel (H5) dividiert (H5 daher=1). Die benutzten Matrixkomponenten sind: Fibronectin (Fibr.), Kollagen I (Col.1), Kollagen IV (Col.4), Laminin (La) und Matrigel (MG). Der Wert der Zellen, die ohne Matrixkomponenten auf Mangelnährmedium (H5) gehalten wurden, dient als Vergleichswert (1).

Die Matrixkomponente Fibronectin, das zeigen die oben präsentierten Ergebnisse, scheint einen stimulierenden Einfluss auf die VEGF-Sekretion beider Tumorzelllinien zu haben. Dieser ist bei der XTC-Linie deutlicher als bei der HTC+-Linie. Die anderen Matrixkomponenten scheinen keinen Einfluss zu haben.

### 3.4 Beeinflussung der durch Fibronectin induzierten VEGF-Mehrsekretion von XTC-Zellen durch Integrin-Antikörper und RGD-Sequenzen

#### 3.4.1 Einleitung

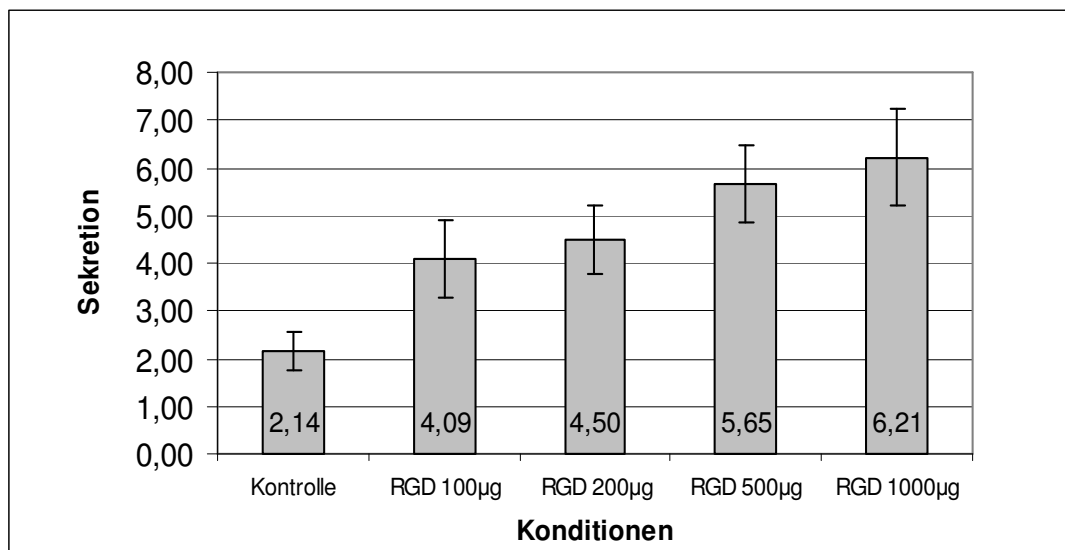
Die unter Punkt 3.3 ermittelte VEGF-Mehrsekretion der XTC-Zellen auf Fibronectin legen einen stimulierenden Effekt durch Fibronectin nahe. Um diesen weiter zu explorieren, wurde die folgende Versuchsreihe durchgeführt. Neben Integrinantikörpern wurden auch moderne RGD-Sequenzen, welche hochselektiv an die fibronectinspezifischen Integrine binden, eingesetzt.

Im Rahmen dieser Versuche soll die erhöhte VEGF-Sekretion der XTC-Zellen auf Fibronectin genauer auf Hinweise bezüglich einer in diesen Prozess eingebundenen Integrinaktivität untersucht werden. Dazu wurden folgende Fragen bearbeitet:

- Kann über bindungsspezifische Proteinsequenzen des Fibronectins Einfluss auf die integrinvermittelte VEGF-Sekretion genommen werden?
- Ist eine Einflussnahme auf diesen Prozess durch Antikörper gegen fibronectinspezifische Integrine möglich?
- Bezieht sich eine eventuelle Einflussnahme nur auf die Sekretion oder auch auf die intrazelluläre Produktion des VEGF?

### 3.4.2 Einfluss von RGD-Sequenzen auf die VEGF-Produktion und Sekretion von XTC-Zellen

Wie sich aus der Abbildung XV ersehen lässt, ist nach 24 Stunden Inkubation der VEGF/MTT-Quotient unter Behandlung mit RGD-Sequenzen erhöht.

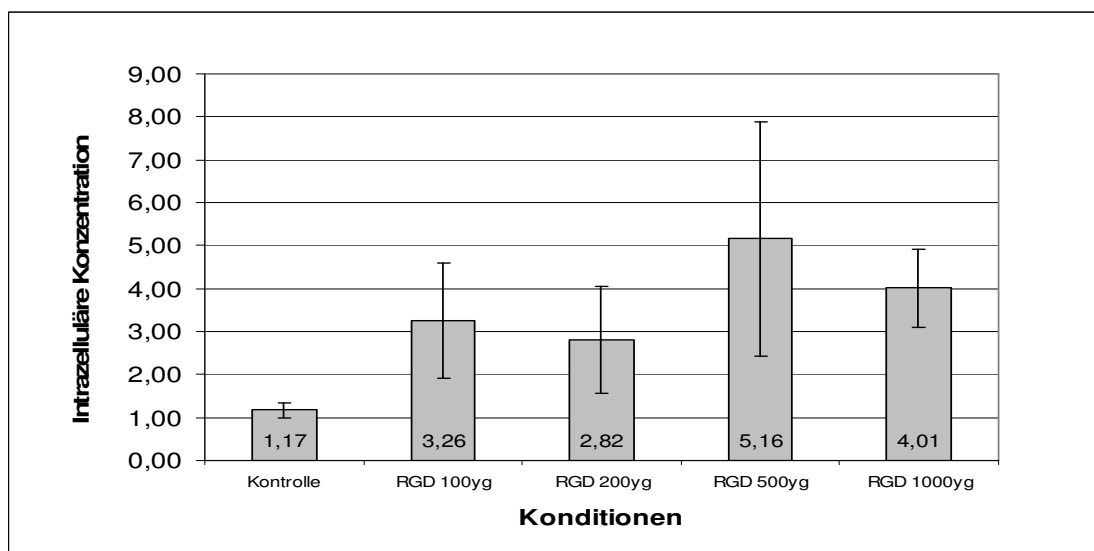


**Abbildung XV:** Zellzahlreferenzierte VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von Schilddrüsenkarzinomzellen (Zelllinien XTC) unter RGD-Behandlung. Wiedergegeben sind Mittelwerte der  $n=4$  doppeltangelegten Versuche mit Standardabweichung. Die Ansätze wurden auf Fibronectin und Mangelnährmedium H5 kultiviert. Es wurden Ansätze ohne RGD-Sequenzen (Kontrolle) sowie mit 100 µg/ml (RGD100µg), 200 µg/ml (RGD200µg), 500 µg/ml (RGD500µg) und 1000 µg/ml (RGD1000µg) RGD-Sequenzen behandelt.

Die Erhöhung beträgt unter Behandlung mit RGD-Sequenzen bei 100 µg/ml 91 %, bei 200 µg/ml 110 %, bei 500 µg/ml 164 % sowie bei 1000 µg/ml 190 %. Der Grad der

VEGF Sekretionssteigerung korreliert mit der RGD-Konzentration, was für einen Dosis-Wirkungseffekt spricht.

Die bei der Analyse des Zelllysats erhobenen Daten sind unten in Abbildung XVI graphisch dargestellt. Es ist zu erkennen, dass der VEGF/MTT-Quotient der Zellgruppen unter Behandlung mit RGD-Sequenzen erhöht ist. Die Erhöhung beträgt bei 100 µg RGD-Sequenz/ml 178 %, bei 200 µg/ml 141 %, bei 500 µg/ml 341 % sowie bei 1000 µg/ml 242 %. Die Standardabweichungen der Versuchsreihen sind relativ groß. Die intrazelluläre VEGF-Konzentration korreliert also mit der RGD-Konzentration der Behandlung, wenn auch nicht gänzlich linear.



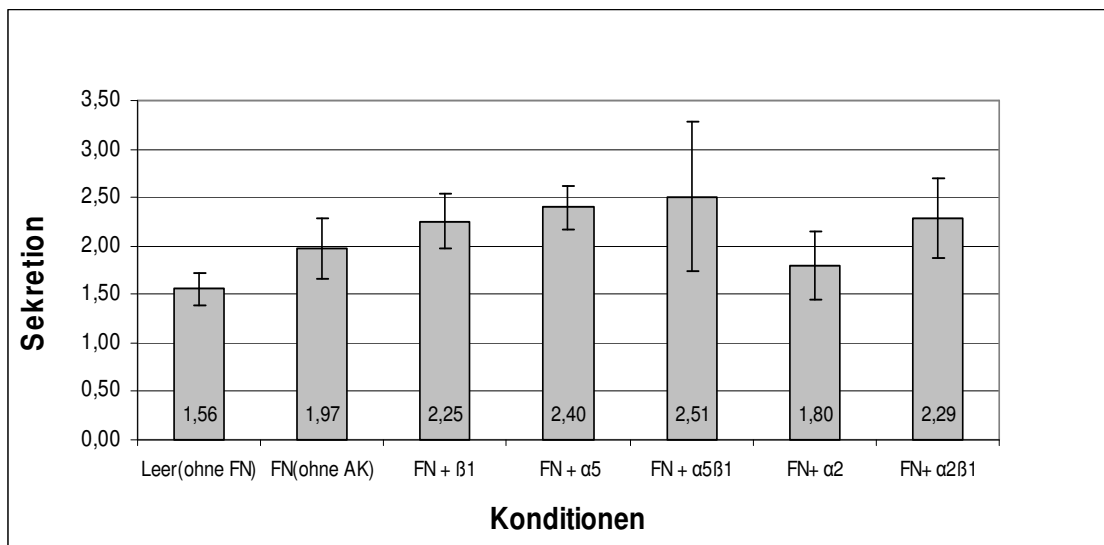
**Abbildung XVI:** Zellzahlreferenzierte intrazelluläre VEGF-Konzentration ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) von Schilddrüsenkarzinomzellen (Zelllinien XTC) unter RGD-Behandlung. Mittelwerte der  $n=2$  doppelt angelegten Versuche. Alle Ansätze wurden auf Fibronektin und Mangelnährmedium H5 kultiviert. Es wurden Ansätze ohne RGD-Sequenzen (Kontrolle) sowie mit 100µg/ml, 200µg/ml, 500µg/ml und 1000µg/ml RGD-Sequenzen untersucht.

In der Zusammenschau der Ergebnisse steigern die RGD-Sequenzen die extra- und intrazelluläre VEGF-Konzentration der XTC-Zellen in einem klaren Dosis-Wirkungseffekt.

### 3.4.3 Einfluss von Integrinantikörpern auf die VEGF-Sekretion von XTC-Zellen

Die in Abbildung XVII als Balkendiagramme veranschaulichten Ergebnisse zeigen, dass die Integrinantikörper  $\beta 1$  und  $\alpha 5$ , sowie die Kombination aus  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  keinen deutlichen Einfluss auf die VEGF-Werte der FN-stimulierten XTC-Zellen zu haben scheinen. Die Werte der VEGF/MTT-Quotienten bewegen sich mit ihrem Mittelwert in dem Bereich der Standardabweichung der Vergleichsgruppe ohne Antikörper (FN

ohne AK). Nur die Kombination aus  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  liegt geringfügig über diesem Wert, wird jedoch durch die große Standardabweichung relativiert. Der Mittelwert des Integrinantikörpers  $\alpha 2$  liegt mit 1,8 deutlicher unter dem des Vergleichswertes (FN) mit 1,97. Diese Differenz könnte auf einen blockierenden Einfluss des  $\alpha 2$ -Antikörpers hinweisen, wird jedoch von den relativ hohen Standardabweichungen der Werte in ihrer Aussagekraft gemindert. Der Wert der Kombination aus den Antikörpern  $\beta 1$  und  $\alpha 2$  weist auf keinen diesbezüglichen Effekt hin, er befindet sich im Bereich des Vergleichswertes.



**Abbildung XVII:** VEGF-Sekretion ( $OD_{VEGF}/OD_{MTT}$ ) unter Integrinantikörper-Behandlung. Mittelwerte der  $n=2$  doppelt angelegten Versuche. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse wurde der VEGF/MTT-Quotient errechnet. Alle Ansätze außer der Vergleichskontrolle (ohne FN) wurden auf Fibronectin (FN) und Mangelnährmedium H5 kultiviert. Die Zellgruppen wurden mit verschiedenen Integrinantikörpern ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) behandelt. Dabei handelte es sich um folgende Antikörper:  $\beta 1$  (FN+ $\beta 1$ ),  $\alpha 5$  (FN+ $\alpha 5$ ),  $\alpha 2$  (FN+ $\alpha 2$ ), der Kombinationen  $\beta 1$  und  $\alpha 5$  (FN+ $\alpha 5\beta 1$ ) sowie  $\beta 1$  und  $\alpha 2$  (FN+  $\alpha 2\beta 1$ ).

Zielsetzung dieses Versuchs war es, mittels der FN-spezifischen Integrinantikörper den stimulierenden Effekt von FN auf die VEGF-Sekretion aufzuheben. Dies war nicht möglich. Im Gegenteil, die Antikörper scheinen die VEGF-Sekretion zu erhöhen.

### 3.5 Einfluss von VEGF auf die Integrinexpression von Schilddrüsentumorzellen der XTC-Zelllinie

#### 3.5.1 Einleitung

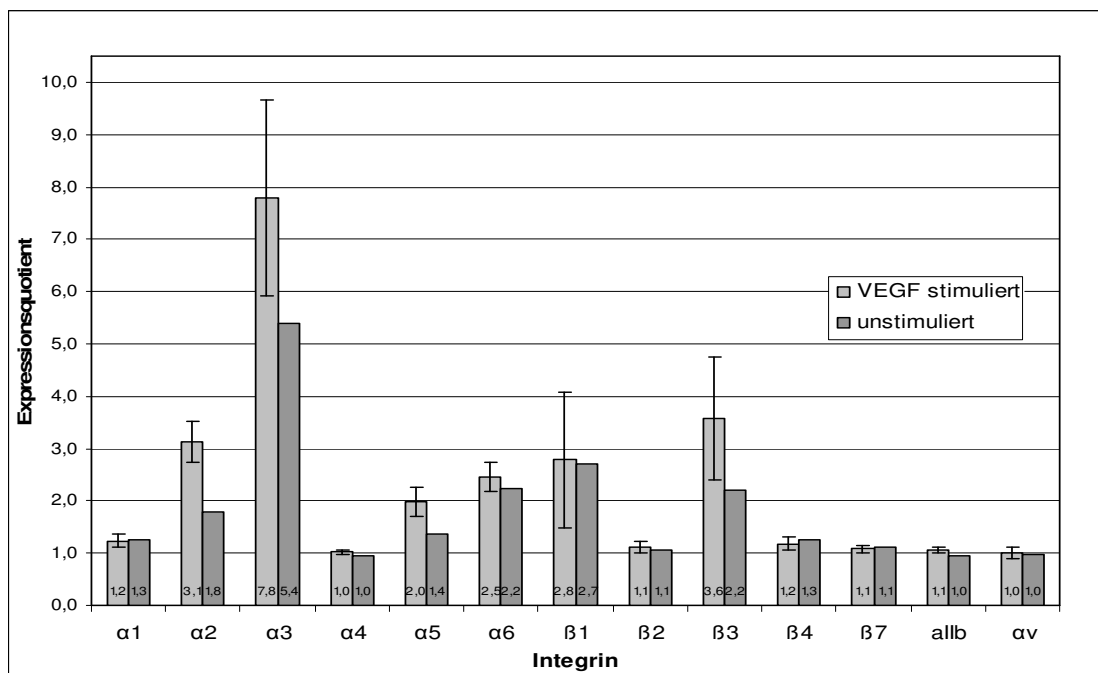
In den bisherigen Versuchen wurde der Einfluss von Integrinen auf die zelluläre VEGF-Produktion untersucht. Die im Folgenden vorgestellten Untersuchungsreihen,

die exemplarisch an der Tumorzelllinie XTC durchgeführt wurden, sollten Aufschluss über folgende Fragen geben:

- Hat VEGF Einfluss auf die Integrinkonfiguration von Schilddrüsentumorzellen im Sinne einer Expressionsveränderung, zum Beispiel im Rahmen eines Feedbackmechanismus?
- Falls es diesen Einfluss gibt, ist er dosisabhängig?

### 3.5.2 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Behandlung mit 10 ng/ml VEGF

Als erster Schritt wurde nach Stimulation mit 10 ng VEGF mittels FACS nach einem breiten Spektrum von Integrinen gescannt. Die Dosis wurde so gewählt, dass sie weit jenseits der durch die Zellen selbst produzierten VEGF-Menge lag.



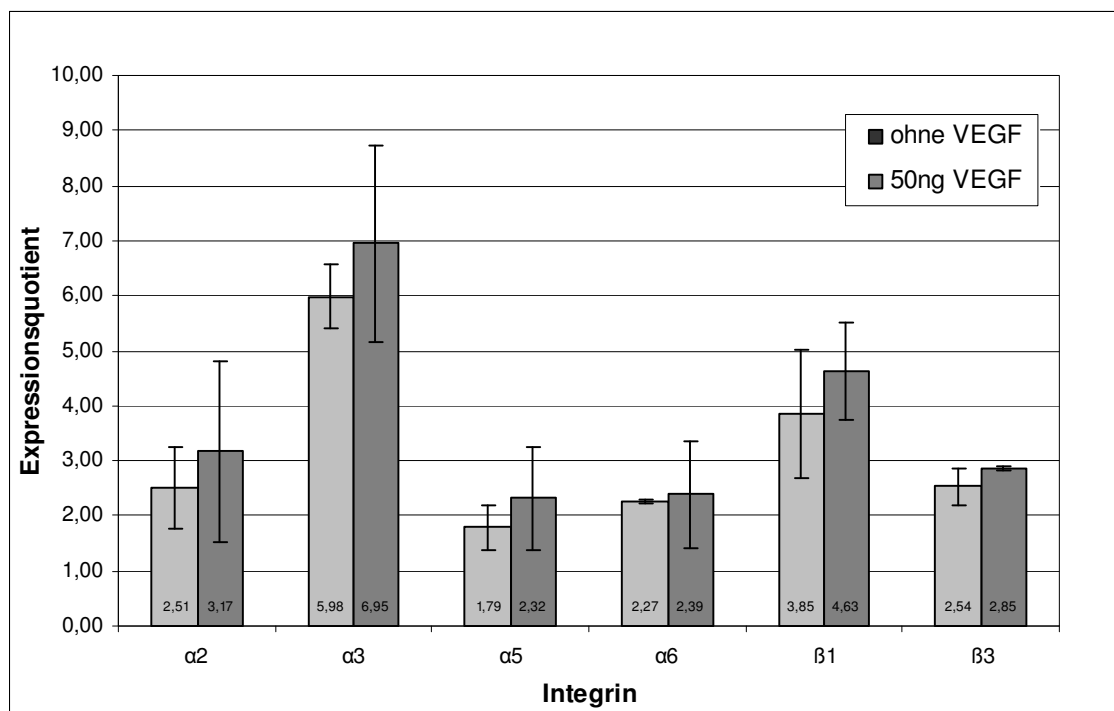
**Abbildung XVIII:** Mittelwert (MW) aus n=3 Versuchen. Mit FACS ermittelte Integrinexpression der XTC Zelllinie unter Behandlung (stimuliert) mit 10 ng/ml VEGF, im Vergleich mit unbehandelten (unstimulierten) XTC-Zellen. Untersuchung der Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$  und  $\beta 1$ - $\beta 4$  sowie  $\beta 7$   $\alpha V$  und  $\alpha IIb$ . Expressionsquotient 1 entspricht der unspezifischen Bindung der Sekundärantikörper (Kontrolle).

Die in Abbildung XVIII graphisch dargestellten Ergebnisse zeigen eine Expression der Integrine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 1$ - $\beta 3$ . Die Integrine  $\alpha 4$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 4$  und  $\beta 7$  werden nicht oder nur sehr vereinzelt exprimiert. Wie bereits in der Immunhistochemie gezeigt (3.1.2), werden besonders die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  sowie  $\beta 1$  und  $\beta 3$  stark exprimiert. Es besteht kein bedeutsamer Unterschied in der Integrinexpression zwischen mit VEGF

behandelten Zellen und nicht behandelten Zellen. Gleichwohl zeigt sich eine leichte Mehrexpression der Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$  und  $\beta 3$ , die auf einen Einfluss von VEGF hindeuten könnte, aufgrund der starken Standardabweichungen jedoch über keine sehr große Aussagekraft verfügt.

### 3.5.3 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Behandlung mit 50 ng/ml VEGF

Als zweiter Schritt wurden die Integrine genauer untersucht, die auf der XTC-Zelllinie am zahlreichsten vertreten waren, und bei denen sich ein Effekt am deutlichsten zeigen sollte. Diese wurden mit der 5-fachen Menge VEGF des Ausgangsversuchs inkubiert.

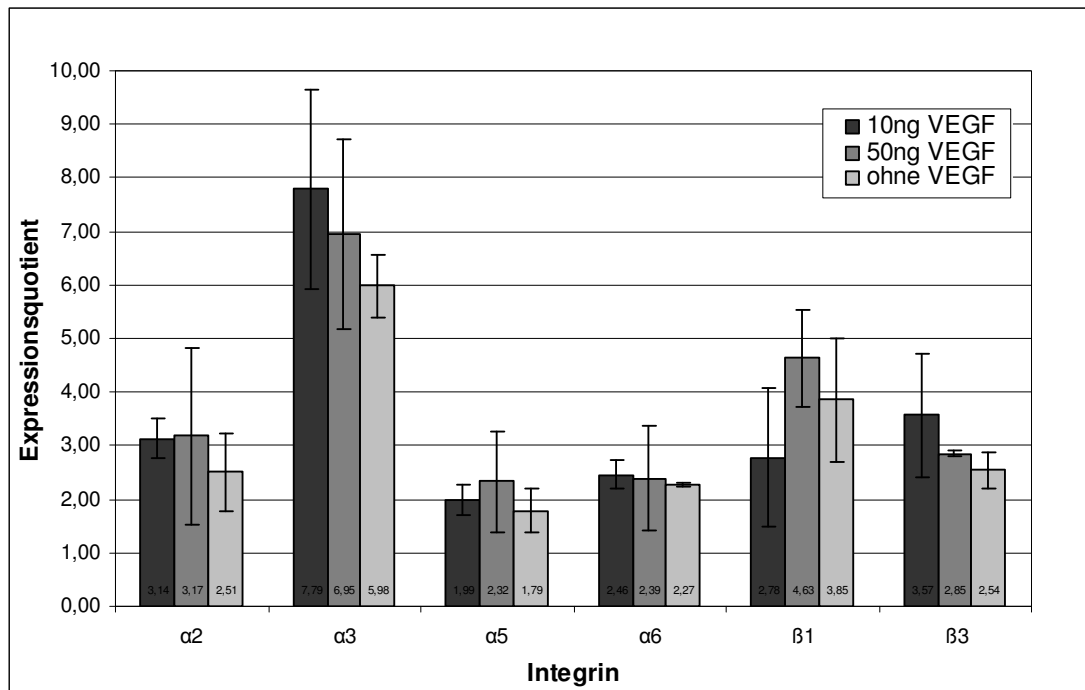


**Abbildung XIX:** Integrinexpression der meistexprimierten Integrine ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$ ) der XTC-Zelllinie unter Behandlung mit 50 ng/ml VEGF (Mittelwert aus n=2 Versuchen) im Vergleich mit unstimulierten XTC-Zellen (Mittelwert aus n=2 Versuchen).

Die in Abbildung XIX dargestellten Ergebnisse sind eine Auswahl der am stärksten exprimierten Integrine der XTC-Zelllinie. Die Expressionswerte der mit VEGF stimulierten Zellgruppe liegen abgesehen von geringen Schwankungen, dicht an denen der unstimulierten. Es zeigten sich demnach auch bei einer Behandlung mit 50 ng/ml VEGF keine wesentlichen Expressionsunterschiede mit dem Charakter eines Stimulationseffektes durch VEGF.

### 3.5.4 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Stimulation mit 10 und 50 ng/ml VEGF im Vergleich

Eine Zusammenfassung der Versuche (Abb. XX) zeigt nochmals deutlich, dass keine klaren Unterschiede in der Integrinexpression zwischen mit VEGF behandelten und unbehandelten Schilddrüsenkarzinomzellen bestehen. Es liegen somit auch keine Hinweise auf eine eventuelle Dosisabhängigkeit eines Stimulationseffektes vor.



**Abbildung XX:** Integrinexpression der XTC Zelllinie unter Stimulation mit 10 und 50 ng/ml VEGF im Vergleich mit unstimulierten XTC-Zellen.

### 3.6 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Von den verschiedenen onkogenen und normalen Schilddrüsenzelllinien wird ein breites Spektrum von Integrinen exprimiert. Es zeigen sich histiotyp-assoziierte Ähnlichkeiten unter den Tumorzelllinien, von denen die anaplastische Zelllinie Hth das breiteste Integrin-Spektrum aufweist. Einen klaren Unterschied zeigen die karzinomassoziierten Zelllinien gegenüber der Zelllinie des Normalgewebes, ihr Spektrum an exprimierten Integrinen ist deutlich breiter.

Die Inkubation der XTC- und HTC+-Zelllinien mit Integrin-Antikörpern hat keinen Einfluss auf ihre VEGF-Sekretion. Das Matrixprotein Fibronectin scheint als einzige Matrixkomponente, so zeigten die Ergebnisse, einen stimulierenden Einfluss auf die VEGF-Sekretion beider Tumorzelllinien zu haben. Dieser ist bei der XTC-Linie deutlicher ausgeprägt als bei der HTC+-Linie.

Zur weiteren Untersuchung dieses Phänomens wurden FN-blockierende RGD-Sequenzen und Antikörper eingesetzt, um den stimulierenden Effekt von FN aufzuheben oder zu beeinflussen. Die RGD-Sequenzen steigern die extra- und intrazelluläre VEGF-Konzentration der XTC-Zellen in einem klaren Dosis-Wirkungseffekt. Die gegen die FN-spezifischen Integrine gerichteten Antikörper sind nicht in der Lage die Stimulation zu unterbinden. Im Gegenteil: die Antikörper scheinen die VEGF-Sekretion eher zu erhöhen.

Schließlich wurde die Integrinexpression auf ihre Beeinflussbarkeit durch VEGF untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass keine deutlichen Unterschiede in der Integrinexpression zwischen mit verschiedenen VEGF-Konzentrationen behandelten und unbehandelten Schilddrüsenkarzinomzellen bestehen.



## 4. Diskussion

### 4.1 Immunhistochemischer Nachweis von Integrinen verschiedener Schilddrüsentumorzellen und Normalgewebe

#### 4.1.1 Integrinexpression physiologischer Schilddrüsenzellen

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf physiologischen (normalen) Schilddrüsenzellen die Integrine  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha v$   $\beta 1$  und  $\beta 3$  exprimiert werden. Die Integrine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 4$  sowie  $\beta 7$  konnten nicht nachgewiesen werden und sind somit nicht exprimiert.

Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen von anderen Arbeitsgruppen an physiologischen Schilddrüsenzelllinien (Vitale et al. 1996). Da Integrine immer als Heterodimere vorkommen, ist anzunehmen, dass die Normalzellen auf ihrer Oberflächenmembran die Dimere  $\alpha 2\beta 1$   $\alpha 3\beta 1$   $\alpha v\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  aufweisen. Dabei handelt es sich beim Integrin  $\alpha 2\beta 1$  um einen speziellen Rezeptor für die Adhäsion auf Kollagen und Laminin (Vitale et al. 1996). Das  $\alpha 3\beta 1$  Integrin ist ein bedeutsamer Rezeptor für Fibronectin, bindet aber auch Kollagen und Laminin. Das Integrin  $\alpha v\beta 1$  bindet neben Fibronectin auch Vitronectin (Pierschbacher and Ruoslahti 1984). Das Dimer  $\alpha v\beta 3$  ist ein Rezeptor, der, wie in der Einleitung ausgeführt, in vielen komplexen Abläufen der Zellfunktion eine zentrale Rolle spielt, beispielsweise über Aktivierung des MAP-Kinaseweges oder Triggerung eines intrazellulären  $Ca^{++}$ -Anstieges (Trusilino et al. 1998). Er bindet neben Fibronectin, Vitronectin, Kollagenen und Osteopontin auch verschiedene Faktoren der Gerinnung (Dardik et al. 2002).

#### 4.1.2 Integrinexpression von Tumor- und Normalzellen im Vergleich

Wie auch schon in anderen Studien gezeigt wurde (Dahlmann et al. 1998, Clezardin et al. 1998), konnte auch in dieser Arbeit immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass das Spektrum exprimierter Integrine bei Tumorzelllinien größer als bei normalem Schilddrüsenewebe ist. Neben den Integrinen  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$  werden zusätzlich von fast allen Tumorzelllinien die Integrine  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$ , und  $\beta 2$  exprimiert. Die entsprechenden Dimere sind  $\alpha 1\beta 1$  und  $\alpha 5\beta 1$ . Die mit  $\beta 2$  möglichen Dimere waren nicht Gegenstand dieser Untersuchungen, da diese bei den untersuchten Zelllinien nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert waren und somit kein relevanter Effekt bei der Untersuchung zu erwarten gewesen wäre. Bei dem Integrin  $\alpha 1\beta 1$  handelt es sich um

einen Rezeptor für Kollagen und Laminin, bei dem Integrin  $\alpha 5\beta 1$  um einen klassischen Rezeptor für Fibronectin (Ruoslahti und Reed 1994, Mortarini et al. 1992). Ferner konnte gezeigt werden, dass es zwischen den Tumorzelllinien Unterschiede in der Integrinexpression gibt: So exprimiert die Hürtelzelllinie XTC, anders als die beiden anderen Tumorzelllinien, kein  $\alpha v$  Monomer. Sie besitzt aber zusätzlich das  $\alpha 6$  Integrin, welches zusammen mit dem  $\beta 1$  Integrin einen Laminin-Rezeptor bildet. Die anaplastische Zelllinie Hth74 exprimiert im Gegensatz dazu die Integrinmonomere  $\alpha 4$  und  $\beta 7$ . Damit verfügt sie über die möglichen fibronektinspezifischen Integrindimere  $\alpha 4\beta 1$  und  $\alpha 4\beta 7$  (Mortarini et al. 1992). Die entdifferenzierteste Zelllinie scheint somit das breiteste Integrinspektrum zu bieten.

#### 4.1.3 Integrinkonfiguration und ihr Einfluss auf das Verhalten von Tumorzellen

Die mit Hilfe der Immunhistochemie offen gelegten Unterschiede in der Integrinexpression weisen auf die unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Zelllinien hin. Schilddrüsentumorzelllinien haben im Vergleich zu Zellen aus Normalgewebe aufgrund der nachgewiesenen Integrinstruktur möglicherweise ein verändertes und auch erweitertes Bindungsvermögen zur ECM. Dieser Effekt konnte auch durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden. Man geht davon aus, dass das Spektrum und die Stärke der Integrinexpression onkogener Zellen mit ihren Fähigkeiten zu Proliferation und Invasion korreliert (Dahlmann et al. 1998, Ensinger et al. 1998). Integrine haben, wie in der Einleitung näher erläutert, großen Einfluss auf die Zelle, daher kann man unterstellen, dass die Mehrexpression und die Veränderung des Integrinspektrums tiefgreifende Auswirkungen auf ihre Eigenschaften haben. Eine Umorganisation und Neuexpression der Integrine auf der Oberfläche eröffnet Tumorzellen die Möglichkeit der Migration aus ihrem natürlichen Umfeld (Demeure et al. 1994) sowie der Invasion und Adhäsion in andere Bereiche des Organismus, ohne der automatischen Selbstzerstörung (Anoikis) zum Opfer zu fallen. In diesem Zusammenhang scheint besonders die Bindung an Fibronectin eine wichtige Rolle zu spielen, diese verhindert beispielsweise die Apoptose von Schilddrüsenkarzinomzellen in serumfreien Zustand (Vitale et al. 1998). Dieser Mechanismus hilft den Tumorzellen die körpereigenen Kontrollmechanismen zu unterwandern. Weiter wurde die Wichtigkeit des Fibronectinrezeptors  $\alpha 5\beta 1$  für Schilddrüsentumorzellen demonstriert, um im Rahmen der Metastasierung beispielsweise auf der Knochenmatrix adhären zu können (Smit et al. 1998). Auch der Umstand, dass es

sich bei den von den Tumorzellen zusätzlich exprimierten Integrinen hauptsächlich um fibronektinspezifische Rezeptoren handelt, spricht für diese These.

Es gab Versuche, die veränderten Expressionsprofile aggressiver Tumore im Hinblick auf eine verbesserte Diagnose und Prognose im klinischen Alltag zu nutzen (Carlevato et al. 1996). Eine erhöhtes Vorkommen der Integrine  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  und  $\beta 4$  weist beispielsweise bei Mammakarzinomen auf eine schlechte Prognose hin (Clezardin et al. 1998). Die klinisch prognostische Relevanz unterschiedlicher Expressionsprofile maligner Schilddrüsenzellen wird derzeit in Studien weiterverfolgt, um eventuell in Zukunft bessere Prognoseprofile erstellen zu können (Lu et al. 2008).

#### **4.2 Einfluss verschiedener Substanzen der extrazellulären Matrix auf die VEGF-Sekretion von Schilddrüsentumorzellen der XTC- und HTC+-Zelllinie**

Die VEGF-Sekretion der XTC-Zellen auf den Matrixkomponenten Kollagen I, Kollagen IV und Matrigel unterscheidet sich nur marginal von der Sekretion der Vergleichsgruppe. Laminin scheint eine Reduktion der VEGF Produktion zu bewirken, dieser Effekt ist aber aufgrund der hohen Standardabweichung unsicher. Im Gegensatz dazu zeigen die auf Fibronektin adhärierenden Zellen eine VEGF-Sekretionserhöhung auf 176 % des Vergleichswertes ohne Matrixkomponente.

Das gleiche Bild zeigt sich bei der HTC+-Zelllinie. Auch hier haben die Matrixkomponenten Kollagen I, Kollagen IV und Matrigel keinen eindeutigen Einfluss auf die VEGF-Sekretion. Laminin scheint auch hier eine VEGF-Reduktion zu bewirken, die jedoch ebenfalls aufgrund der hohen Standardabweichung nur als Tendenz betrachtet werden kann. Die auf Fibronektin adhärierenden HTC+-Zellen zeigen, wie auch die XTC-Zellen, eine VEGF-Sekretionserhöhung bis auf 230 % des Sekretionswertes der Vergleichsgruppe. Diese Erhöhung ist aber nicht so konstant wie die der XTC-Zelllinie, was sich in der hohen Standardabweichung niederschlägt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass Fibronektin als einzige Matrixkomponente eindeutig eine stimulierende Wirkung auf die VEGF-Produktion von Schilddrüsentumorzellen besitzt. Dieser Effekt deutet sich bei beiden Zelllinien an. Die schon hohe Basalsekretion der Tumorzellen wurde durch die Adhäsion auf FN noch gesteigert. Die auf den Tumorzellen reichlich vorhandenen fibronektin-spezifischen Integrine haben offenbar über die zellinternen Signalkaskaden (siehe 1.5.3 und 1.6) Einfluss auf die VEGF-Produktion. Die Tatsache, dass Integrin- und VEGF-Rezeptoren miteinander assoziiert sein können, weist auf eine enge Verknüpfung der

Signalwege hin (Hoffmann et al. 2004, Borges et al. 2000). Auch der durch Integrine vermittelte mitogene Effekt von VEGF bei der Tumorangiogenese legt diesen Zusammenhang nahe (Viglietto et al. 1995).

Fibronektin ist neben Kollagen I ein wichtiger Faktor für die Entwicklung und Integrität des Gefäßsystems, ein Fehlen in der Embryonalentwicklung führt zu fatalen Defekten (Ruoslahti und Engvall 1997). Die Hemmung des FN-Rezeptors  $\alpha 5\beta 1$  hat den gleichen Effekt wie das Fehlen von FN, dieses hat somit neben seinen adhäsions- und wachstumsfördernden Eigenschaften (Mortarin et al. 1992) auch direkten Einfluss auf die Angiogenese. Weiter spielt die ECM und hier besonders die über das Integrin  $\alpha 5\beta 1$  vermittelte Bindung an FN eine besondere Rolle bei der Umgehung der Selbstzerstörung (Anoikis), die durch die FN-Bindung der Tumorzellen unterdrückt wird (Matola et al. 2000).

Auch andere Komponenten der ECM sind proangiogene Faktoren. Wie bereits erwähnt, ist unter anderem Kollagen Typ I für die Gefäßentwicklung unabdingbar. Ebenso Laminin und Kollagen IV, ihr Fehlen führt beispielsweise zu Nierenerkrankungen auf der Ebene von Gefäßfehlbildungen bei der Glomeruliumausbildung (Ruoslahti und Engvall 1997). Ihre Rezeptoren sind auf Schilddrüsentumorzellen vorhanden (siehe 4.1.1). VEGF beeinflusst wahrscheinlich integrinvermittelt über diese ECM-Bestandteile die Angiogenese.

### **4.3 Einfluss von blockierenden Integrinantikörpern auf die VEGF-Basalsekretion von Schilddrüsentumorzellen der XTC und HTC+ -Zellreihe**

Es wurde nachgewiesen, dass Integrine durch ihre Funktion und Expression die VEGF-induzierte Angiogenese vermitteln. Beispielsweise wurde die Inhibition der VEGF-induzierten Angiogenese durch Integrinantikörper demonstriert (Friedlander et al. 1995, Brooks et al. 1994b). Die hier vorgestellte Versuchsreihe untersuchte den Einfluss blockierender Integrinantikörper auf die VEGF-Produktion von Schilddrüsentumorzellen ohne ECM-Kontakt. Damit sollten die bereits aus der Literatur bekannten Verknüpfungen von Integrin- und VEGF-Signalwegen näher untersucht werden.

Die in diesem Versuch in etablierter Konzentration (Brooks et al. 1994b) eingesetzten Antikörper  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\alpha v$  sowie die Kombinationen  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha v\beta 3$  hatten weder Einfluss auf die VEGF-Sekretion der XTC-Zelllinie noch auf die

der HTC+-Zelllinie. Die VEGF-Sekretion der behandelten Zellen unterschied sich in beiden Zellpopulationen nicht deutlich von der der unbehandelten Vergleichsgruppe. Auch eine Erhöhung der Antikörperkonzentration auf das 10fache der von etablierten Arbeitsgruppen verwendeten Konzentration am Beispiel des sehr stark exprimierten  $\beta$ 1-Integrins zeigte keinen Effekt. Es zeigt sich somit zusammenfassend, dass eine Einflussnahme auf VEGF-Produktion und Sekretion zumindest bei Schilddrüsentumorzellen auf Integrinebene sehr schwierig ist. Ihre VEGF-Sekretion scheint einer komplexen Steuerung zu unterliegen. Unter anderem stellen TSH und EGF einen Stimulus für die VEGF-Sekretion der Schilddrüsentumorzellen dar (Hoffmann et al. 2004, Soh et al. 1996).

Es liegt somit kein Hinweis auf eine Hemmung der VEGF-Sekretion durch die Blockierung der ausgewählten Integrine vor. Man kann folglich nicht von einer Triggerung der VEGF-Sekretion der Tumorzelllinie durch die untersuchten Integrine ausgehen. Ein integrinvermittelter Effekt ist evtl. nicht in Zellsuspensionen, wie im o.g. Versuch, sondern nur in strukturierten Zellverbänden mit ECM-Kontakt nachweisbar.

#### **4.4 Beeinflussung der durch Fibronectin induzierten VEGF-Mehrsekretion von XTC-Zellen durch Integrin-Antikörper und RGD-Sequenzen**

##### 4.4.1 Einfluss von RGD-Sequenzen auf die VEGF-Produktion und Sekretion von XTC-Zellen

Die fibronektinspezifische Bindungsstellensequenz RGD scheint einen stimulierenden Einfluss auf die VEGF-Sekretion der XTC-Zellen zu besitzen (siehe 3.4.2). Die VEGF-Sekretion pro Zellmasse (VEGF-Quotient) steigt proportional je nach Konzentration von 100 bis 1000  $\mu$ g/ml RGD. Die Stimulation erfolgt also konzentrationsabhängig. Je mehr RGD Sequenzen an die fibronektinspezifischen Integrine binden, umso mehr wird die VEGF-Sekretion getriggert.

Die Analyse des Zelllysats hat ergeben, dass neben der VEGF-Konzentration im Zellüberstand auch die intrazelluläre VEGF-Konzentration durch die RGD-Sequenzen gesteigert wird. Diese Steigerung ist ebenfalls konzentrationsabhängig, weist jedoch relativ starken Messungsschwankungen (große Standardabweichungen) auf. Die erhöhten intrazellulären VEGF-Konzentrationen weisen auf eine erhöhte VEGF-Produktion der Schilddrüsentumorzellen hin.

RGD-Sequenzen sind, wie schon in der Einleitung erläutert (siehe 1.4.3 u. 1.5.4), kurze Tripeptide, die die Bindung von fibronektinspezifischen Integrinen an FN verhindern können (Gehlsen et al. 1988). Gemäß den Ergebnissen der hier vorgestellten Versuchsreihe scheinen diese kurzen Proteinsequenzen einen stimulierenden Effekt auf die VEGF-Sekretion und -Synthese der Tumorzellen zu haben, wobei man aufgrund der integrinspezifischen RGD-Bindung und gemäß der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften eher einen hemmenden Einfluss erwartet hätte. Es könnte entweder eine intrinsische Aktivität der RGD-Sequenzen im Sinne einer FN-Bindungsimitation die Ursache sein oder eine Stressreaktion der Tumorzellen auf die durch RGD inhibierte FN-Bindung vorliegen. Die Dosisabhängigkeit des Effektes, die auch schon bei anderen Versuchen mit RGD-Sequenzen gefunden wurde, legt eher eine intrinsische Aktivität nahe. Es erscheint sehr wahrscheinlich, dass die RGD-Sequenzen die FN-Bindung imitieren, was den VEGF-stimulierenden Effekt von FN aus den Vorversuchen (3.3) bestätigen würde.

FN stimuliert die Proliferation und den Stoffwechsel von Thyreozyten. RGD-Sequenzen können diesen Einfluss aufheben (Vitale et al. 1997) und gar den Zelltod durch die Unterbindung des Fibronektinkontakts initiieren (Vitale et al. 1998). Daher scheinen die hier verwendeten RGD-Sequenzen offensichtlich einen anderen Effekt auf die VEGF-Sekretion zu haben als auf die Proliferation. In Versuchen mit Melanomzellen wurde ein RGD-induzierter intrazellulärer Kalziumanstieg gemessen (Allman et al. 2000), was auf eine intrinsische Aktivität der Proteinsequenzen hinweisen könnte. Diese Aktivierung intrazellulärer Signalwege könnte unter Umständen auch zu der erhöhten VEGF-Produktion der XTC-Zellen geführt haben. In gewissen Fällen kann es zu einer Steigerung der Bindung an Fibronektin kommen, was ebenfalls eine VEGF-Mehrproduktion zur Folge hätte (Pierschbacher u. Ruoslahti et al. 1984). Schließlich ist auch eine Stressreaktion der von der Anoikis bedrohten Zellen möglich. Zur Klärung sind weitere Untersuchungen nötig.

#### 4.4.2 Einfluss von Integrinantikörpern auf die fibronektingetriggerte VEGF-Sekretion von XTC-Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung (siehe 3.4.3) weisen nicht auf einen Einfluss der Integrinantikörper  $\beta 1$ ,  $\alpha 2$  und  $\alpha 5$  auf die fibronektingetriggerte VEGF-Sekretion bei XTC-Zellen hin. Auch in Kombination von  $\alpha$  und  $\beta$ -Antikörper zur Imitation heterodimerer Antikörper waren sie nicht in der Lage, die VEGF-Sekretion

effektiv zu beeinflussen. Die Sekretion der mit dem Antikörper  $\alpha 2$  inkubierten XTC-Zellen war niedriger als die der Vergleichsgruppe. Dieser Effekt war jedoch gering und nicht konstant genug, um über eine ausreichende Aussagekraft zu verfügen.

Wenn die erhöhte VEGF-Sekretion der XTC-Zellen auf FN durch spezifische Integrine wie  $\alpha 2\beta 1$  oder  $\alpha 5\beta 1$  vermittelt werden würde, müsste sie durch Integrintantikörper inhibierbar sein, vorausgesetzt diese besitzen keine intrinsische Aktivität. Die Auswahl an Antikörpern, die hier zur Anwendung kam, hätte prinzipiell einen gewissen Einfluss auf die VEGF-Sekretion haben müssen. Die Ergebnisse in Abbildung XVII (siehe 3.4.3) legen allerdings bei genauerer Betrachtung eine intrinsische Aktivität nahe: die Zellen mit Antikörperbehandlung scheinen etwas mehr VEGF zu produzieren als die ohne. Die Werte verfügen jedoch aufgrund der großen Standardabweichung nicht über eine ausreichende Aussagekraft. In der Literatur ist bisher keine intrinsische Aktivität der benutzten Antikörper beschrieben worden. Dass die Antikörper in der Zusammenschau keinen signifikanten Effekt hatten, kann verschiedene Gründe haben. Zum einen könnte das Spektrum der benutzten AK zu klein gewesen sein.  $\alpha 5\beta 1$  ist ein wichtiger FN-Rezeptor;  $\alpha 5$  wird jedoch nur schwach exprimiert, möglicherweise spielt ein anderer FN-Rezeptor, der nicht erfasst wurde, eine größere Rolle bei der FN-Bindung. Bei dem  $\beta 1$ -Antikörper hingegen wäre aufgrund seines häufigen Vorkommens eine Einflussnahme zu erwarten gewesen. So haben Untersuchungen an Zellen anderer Entitäten gezeigt, dass Fibronectinwirkungen durch u. a.  $\beta 1$ -Antikörper aufgehoben werden können (Leeni et al. 2000). Da er jedoch nur eine Hälfte des Rezeptor-Dimeres bindet, muss dies in der vorliegenden Versuchsreihe nicht zwangsläufig der Fall sein. Eine weitere Ursache für die o. g. Ergebnisse könnte sein, dass die benutzten Antikörper mäßige intrinsische Aktivität besitzen und ähnlich wie FN die entsprechenden Signalkaskaden aktivieren können und daher kein signifikanter Unterschied in der VEGF-Produktion nachzuweisen ist.

Die Arbeitsgruppe um Bhaskar fand beispielsweise bei der Untersuchung verschiedener Antikörperklone zur klinischen Verwendung heraus, dass sich diese in ihren funktionsblockierenden Eigenschaften deutlich unterschieden: inhibierende Eigenschaften zeigte nur ein Teil der Klone (Bhaskar et al. 2007).

Da die Inkubation der FN-assoziierten Integrine mit Antikörpern keinen Effekt auf VEGF hat, müssen hier Funktionsuntersuchungen weitere Klärung bringen.

Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung waren auf dem Markt nur monomere Antikörper getestet und verfügbar. Mit in der Zwischenzeit verfügbar gewordenen

heterodimeren Antikörpern könnte geklärt werden, ob die angenommene Einflusskette wirklich besteht.

In Zukunft werden Medikamente, die über die Blockierung von Integrinrezeptoren wirken, wie beispielsweise der  $\alpha 5\beta 1$ -Integrinantikörper Volociximab<sup>®</sup> (M200), einen immer wichtigeren Stellenwert einnehmen und das Indikationsspektrum in der Therapie von Karzinomen erweitern (Ramakrishnan et al. 2007). Daher stellt die weitere Untersuchung der Integrinfunktionen eine wichtige Aufgabe und Grundlage für die weitere Entwicklung von Therapieansätzen dar.

#### **4.5 Einfluss von VEGF auf die Integrinexpression von Schilddrüsentumorzellen der XTC-Zelllinie**

##### 4.5.1 Integrinexpression der XTC-Zelllinien nach Stimulation mit 10 und 50 ng/ml VEGF

Nach Stimulation mit 10 ng/ml VEGF zeigten sich in der Auswertung der FACS-Untersuchung keine eindeutigen Unterschiede in der Expression der Integrine  $\alpha 1$ - $\alpha 6$ ,  $\beta 1$ - $\beta 4$  sowie  $\beta 7$  und  $\alpha v$  zwischen den Thy1- und XTC-Zellen. Die vorhandenen Differenzen lassen auf leichte physiologische Schwankungen in der Integrinexpression schließen. VEGF hat in dieser Konzentration scheinbar keinen Einfluss. Es wurde auch keine Neuexpression eines Integrins durch die VEGF-Stimulation beobachtet.

Bei der Stimulation der Zellen mit 50 ng/ml VEGF und Untersuchung einer Auswahl stark exprimierter Integrine ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  und  $\beta 3$ ) konnten ebenfalls keine Expressionsunterschiede zur unstimulierten Vergleichsgruppe festgestellt werden.

VEGF hat scheinbar keinen Einfluss auf die Integrinexpression, der hier exemplarisch untersuchten Zelllinie. Somit kann gefolgert werden, dass es auch keinen autokrinen Regelkreis zwischen VEGF und Integrinen gibt.

Trotz der engen Interaktion von VEGF-Rezeptoren und Integrinen (Veikkola et al. 2000), die von der Lokalisation her eng beieinander liegen und deren Signalwege sich überkreuzen, ist hier kein Nachweis eines direkten Einwirkens von VEGF auf die Integrinkonfiguration gelungen. In Versuchen mit Gefäßendothelzellen konnte nachgewiesen werden, dass Wachstumsfaktoren wie VEGF die Expression von  $\alpha v\beta 3$ -Integrinen während der Angiogenese (Eliceiri et al. 1998) über Tyrosinphosphorylierung triggern (Soldi et al. 1999). Auch EGF erhöht die Expression von Integrinen ( $\alpha 2$ ) und stimuliert zusätzlich die zelluläre Migration (Chen et al.



1993). Es bestehen also Unterschiede zwischen Endothelzellen und endokrin aktiven Schilddrüsentumorzellen. Wie die Ergebnisse zeigen, sind in erster Linie Endothelzellen das Ziel der VEGF-vermittelten Änderung des Integrinbesatzes und nicht die Schilddrüsentumorzellen. Dies kann in der zentralen Rolle der Endothelzellen bei Angiogenese und Angioneogenese begründet liegen, die eine höhere Flexibilität des Integrinbesatzes erfordert, um sich an die verschiedenen Körpergewebe adaptieren zu können.

Auch für Schilddrüsenzellen ist der Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Integrinexpression nachgewiesen worden, beispielsweise konnte durch TGF-Beta1 eine vermehrte Expression von  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -Integrinen stimuliert werden (Claisse et al. 1999). Dieser Einfluss auf die Expressionvariabilität des Integrinbesatzes reicht jedoch sicherlich nicht so weit, wie der von VEGF auf Endothelzellen. Ein weiterer interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist, dass TSH neben einer Änderung der Integrinexpression (erhöhtes  $\alpha\text{5}\beta\text{1}$ ) auch die Produktion von FN bei Schilddrüsenkarzinomzellen stimuliert (Demeure et al. 1994). Es stellt sich die Frage, ob die ECM-Substanzen nicht ebenfalls die Integrinkonfiguration von Tumorzellen steuern oder zumindest Einfluss auf sie haben.

Von welchen weiteren Faktoren die Integrinexpression der Schilddrüsenkarzinomzellen abhängt, bleibt ein für weitere Forschungen interessantes Aufgabengebiet.

## 5. Zusammenfassung

### 5.1 Deutsche Zusammenfassung

Schilddrüsenkarzinome sind die häufigste maligne Erkrankung endokriner Organe. Sie lassen sich in vier Entitäten mit unterschiedlicher Differenzierung und Prognose klassifizieren: follikuläres, papilläres, anaplastisches und medulläres Karzinom. Als entscheidender Faktor für die Tumorprogression wurde die Fähigkeit der Schilddrüsenkarzinomzellen zur Angiogenese erkannt, die ihnen ein uneingeschränktes Wachstum und die Invasion des umgebenden Gewebes ermöglicht.

Die Angiogenese ist für eine Vielzahl von Karzinomen ein pathophysiologisch entscheidender Schritt. Aus diesem Grund rückt die antiangiogene Therapie immer mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

Das Ziel dieser Arbeit war es, anhand eines Zellkulturmodells verschiedener Schilddrüsenkarzinome ein Bild der Interaktion von Integrinen, VEGF und der extrazellulären Matrix (ECM) zu erstellen. Das bessere Verständnis des Zusammenwirkens dieser für die Angiogenese essentiellen Faktoren ist die Voraussetzung für die Entwicklung effektiver Therapiestrategien.

In den Versuchsreihen wurden die Hürtelzelllinie XTC, die follikuläre Zelllinie HTC+, die anaplastische Zelllinie Hth74 sowie eine aus normalem Schilddrüsengewebe isolierte Zelllinie Thy1 untersucht. Immunhistochemisch wurde das Integrinspektrum der onkogenen (XTC, HTC+, Hth74) und normalen Schilddrüsenzellen (Thy1) ermittelt. Alle Zellen exprimieren eine große Bandbreite von Integrinen, wobei die Zelllinie des Normalgewebes im Vergleich das schmalste Spektrum besitzt. Es zeigen sich histiotyp-assoziierte Ähnlichkeiten unter den Tumorzelllinien, von denen die entdifferenzierteste (Hth74) das breiteste Spektrum aufweist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Schilddrüsenkarzinomzellen über ein erweitertes Bindungsvermögen zur ECM verfügen. Man geht davon aus, dass das Spektrum und das Ausmaß der Integrinexpression onkogener Zellen mit ihren Fähigkeiten zu Proliferation und Invasion korrelieren. Diese Veränderung des Integrinspektrums hat tiefgreifende Auswirkungen auf ihre Eigenschaften, hierbei scheint besonders die Bindung an Fibronectin eine wichtige Rolle zu spielen.

Zwei Tumorzelllinien (XTC, HTC+) wurden auf verschiedenen Matrixkomponenten inkubiert und mittels ELISA auf ihre VEGF-Sekretion untersucht. Fibronectin (FN) führte als einziges der getesteten Matrixproteine zu einer erhöhten VEGF-Sekretion.

Die steigernde Wirkung von FN auf die VEGF-Sekretion untermauert die in der Literatur beschriebene wichtige Rolle von FN in der Angiogenese.

Die Inkubation der Tumorzelllinien (XTC, HTC+) ohne Matrixkomponenten mit einer Auswahl der zu dieser Zeit (2000 bis 2002) am besten untersuchten und verfügbaren Integrinantikörper hatte keinen Einfluss auf ihre VEGF-Sekretion. Da die Blockierung der Integrine keine Reduktion der hohen VEGF-Basissekretion der Schilddrüsenkarzinomzellen bewirkte, ist vom Vorliegen einer komplexen Steuerung der VEGF-Sekretion auszugehen, die nicht ausschließlich von integrinvermittelten Signalen abhängt.

In einer weiteren Untersuchung an XTC-Zellen wurden integrinblockierende RGD-Sequenzen bzw. Antikörper eingesetzt, um den stimulierenden Effekt von FN auf VEGF aufzuheben. Die RGD-Sequenzen steigerten die extra- und intrazelluläre VEGF-Konzentration der XTC-Zellen in einem klaren Dosis-Wirkungseffekt. Die FN-spezifischen Integrinantikörper hatten keinen Einfluss auf die VEGF-Sekretion. Da die RGD-Sequenzen, anstelle der erwarteten Absenkung, zu einer Steigerung der VEGF-Konzentration führten, muss diskutiert werden, dass sie über eine intrinsische Aktivität mit Initiierung intrazellulärer Signalwege im Sinne einer Outside-in Signaltransduktion verfügen. Die VEGF-Synthese der Schilddrüsentumoren scheint somit integrinvermittelt von der extrazellulären Matrix (FN) beeinflusst zu sein.

Der Einfluss von VEGF auf das Integrinspektrum von XTC-Zellen wurde mittels FACS analysiert. Es zeigte sich keine Veränderung der Integrinkonfiguration durch VEGF. Die Bedeutung von Wachstumsfaktoren für die Integrinexpression ist nachgewiesen. Die Untersuchung des Einflusses von VEGF auf die Integrinexpression der XTC-Zellen im Sinne eines Inside-out Regelkreises konnte trotz der bekannten engen Interaktion von VEGF-Rezeptoren und Integrinen keinen autokrinen Regelkreis nachweisen.

Es konnte gezeigt werden, dass Schilddrüsenkarzinome ähnlich wie andere Karzinome auf die Expression von Integrinen und deren Interaktion mit der extrazellulären Matrix angewiesen sind, um sich der Angiogenese bedienen zu können. Diese Arbeit stellt eine ausführliche Untersuchung einer Vielzahl von Integrinen dar und ist eine der Ersten, die versucht, über RGD-Sequenzen und blockierende Antikörper Einfluss auf die VEGF-Sekretion von Schilddrüsenkarzinomzellen zu nehmen. Weitere Versuche sind zur genaueren Exploration der untersuchten Zusammenhänge nötig. Inhibitoren der integrinvermittelten Angiogenese wie Volociximab® werden in der Zukunft einen

Schwerpunkt der medikamentösen Tumorbehandlung bilden, schon heute stellen sie neben der Chemotherapie eine wertvolle Therapieoption dar.

## 5.2 Englische Zusammenfassung / Summary

Thyroid carcinomas are the most frequent malignancy of endocrine organs. They can be classified in four entities of various differentiation and prognosis. Follicular, papillary, anaplastic and medullary carcinomas. An important factor of cancer progression was recognized in the capacity of thyroid carcinoma cells to angiogenesis, procuring them an unlimited growth and the invasion of the surrounding tissue. For a great number of carcinomas the angiogenesis is a capital pathophysiological step. For this reason the antiangiogen therapy places itself more and more in the center of scientific interest.

The aim of this thesis was to give a survey of the interaction of integrins, VEGF and the extracellular matrix (ECM) by using a cell culture model of different thyroid carcinomas. A better understanding of the interaction of these factors essential to the angiogenesis is the precondition for the development of effective therapy strategies.

In the test series the Hurthle cell line XTC, the follicular cell line HTC+, the anaplastic cell line and the cell line Hth74 as well as a cell line isolated from natural thyroid tissue (Thy1) were examined. The spectrum of the integrins of the oncogenic (XTC, HTC+, Hth74) and the normal cells (Thy1) was found out by immunohistochemical tests.

All cells expressed a great spectrum of integrins whereas in comparison the cell line of normal tissue contains the smallest spectrum. Histiotypical associated similarities appear among the cancer cell lines, out of which the undifferentiated (Hth74) shows the largest spectrum. These results suggest that the thyroid cancer cells dispose of an enlarged possibility of adhesion to ECM. It is assured that the spectrum and the extent of the integrin expression of cancer cells correlate with their abilities of proliferation and invasion. This change of their integrin expression has radical effects on their biological properties. In this context the linking to Fibronectin seems to play an important role.

Two cancer cell lines (XTC, HTC+) were incubated on different matrix components and the VEGF expression was examined via ELISA. Fibronectin (FN) was the only of the tested matrix proteins that induced an increase of VEGF secretion. The stimulation of the VEGF secretion by FN confirms the important role of FN in angiogenesis which

is also described in the literature. The incubation of the two cancer cell lines (XTC, HTC+) without matrix components with a choice of the best examined and available integrin antibodies at this time had no effect on the VEGF secretion. Since the blockade of integrins had no reducing effect on the high VEGF basic output of thyroid cancer cells, the regulation of the VEGF secretion is assumed to be very complex and does not only depend on integrin signalling.

In a further examination of XTC cells, integrin antibodies and integrin blocking RGD sequences (RGDS) were used to suppress the stimulating effect of FN on VEGF. The RGD sequences increased the intra- and extra cellular VEGF concentration of the XTC cells proportional to the RGDS-concentration. The FN specific integrin antibodies had no influence on the VEGF secretion. Since the RGDS led to an increase of the VEGF concentration and not to a suppression, as expected, it must be discussed, that they dispose of an intrinsic activity with initiation of intracellular signal pathways in the sense of an “Outside-in” signalling.

The VEGF-synthesis of thyroid cancers seems thus to be influenced by the extra cellular matrix (FN) via integrins. The influence of VEGF on the integrin spectrum of XTC cells was analysed by FACS. There was shown no change of the integrin expression by VEGF. The importance of growth factors on the integrin expression is demonstrated in the literature. The examination of the influence of VEGF on the integrin expression of the XTC cells in the sense of an “Inside-out“ control loop could not prove an autocrine control loop in spite of the well known close interaction of integrins and VEGF receptors.

It could be shown that thyroid cancers similar to other cancers depend on the expression of integrins and their interaction with the extra cellular matrix (ECM) in order to use angiogenesis.

This thesis represents a detailed examination of a great number of integrins and is one of the first which has tried to exert influence on the VEGF secretion of thyroid cancer cells via RGDS and integrin antibodies. Further examinations are needed to explore these detailed interactions. Inhibitors of the integrin mediated angiogenesis like Volociximab® will be a focus of the medical cancer therapy in the future. Today they are already a useful option of therapy besides the chemotherapy.

## 6. Literaturverzeichnis

- Algire GH and Chhalkley HW  
Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic implants.  
J. Natl Cancer Inst. 1945, 6:73-85.
- Allman R; Cowburn P; Mason M,  
In vitro and in vivo effects of a cyclic peptide with affinity for the  $\alpha 3$  integrin in human melanoma cells  
European Journal of Cancer Part A 2000, 36(3):410-422.
- Bader B L, Rayburn H, Crowley D, and Hynes R O  
Extensive Vasculogenesis, Angiogenesis, and Organogenesis Precede Lethality in Mice Lacking All  $\alpha$  Integrins  
Cell. 1998, 95(4):507-19.
- Bauer AJ, Patel A, Terrell R, Doniparthi K, Saji M, Ringel M, Tuttle RM, Francis GL. Systemic administration of vascular endothelial growth factor monoclonal antibody reduces the growth of papillary thyroid carcinoma in a nude mouse model.  
Ann Clin Lab Sci. 2003, 33(2):192-9.
- Bauer JS, Schreiner CL, Giancotti FG, Ruoslahti E, Juliano RL.  
Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: collaborative interactions among integrins.  
J Cell Biol. 1992, 116(2):477-87.
- Bhaskar V, Zhang D, Fox M, Seto P, Wong MH, Wales PE, Powers D, Chao DT, Dubridge RB, Ramakrishnan V.  
A function blocking anti-mouse integrin  $\alpha 5\beta 1$  antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo.  
J Transl Med. 2007, 5: 61.
- Borges E, Jan Y, Ruoslahti E.  
Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain.  
J Biol Chem. 2000, 275(51):39867-73.
- Bucher O, Wartenberg H.  
Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.  
12th ed. Bern: Huber, Jan 1997: 11-21.
- Brooks PC, Clark RAF, Cheresh DA  
Requirement of vascular integrin  $\alpha v\beta 3$  for Angiogenesis  
Science. 1994, 264(5158):569-71.
- Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA  
Integrin  $\alpha v\beta 3$  Antagonists Promote Tumor Regression by Inducing Apoptosis of Angiogenic Blood Vessels  
Cell, 1994b, 79:1157-1164.
- Byzova TV, Kim W, Midura RJ, Plow EF  
Activation of Integrin  $V3$  Regulates Cell Adhesion and Migration to Bone Sialoprotein  
Experimental Cell Research 2000, 254, No. 2:299-308
- Carlevato M-T, Trusolino L, Serini G, Valente G, Orlandi F, Angeli A, Cortesina G, & Marchisio P-C.  
Differential integrin expression in thyroid and laryngeal carcinomas  
Cancer Research 1996, 16:2379-2384.

Chen JD, Kim JP, Zhang K, Sarret Y, Wynn KC, Kramer RH, Woodley DT  
Epidermal growth factor (EGF) promotes human keratinocyte locomotion on Collagen by increasing the  $\alpha 2$  integrin subunit.  
Experimental Cell Research 1993, 209: 216-223.

Claisse D, Martiny I, Chaqour B, Wegrowski Y, Petitfrere E, Schneider C, Haye B, Bellon G.  
Influence of transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) on the behaviour of porcine thyroid epithelial cells in primary culture through thrombospondin-1 synthesis.  
J Cell Sci. 1999, 112 (Pt 9):1405-16.

Clark EA, Brugge JS.  
Integrins and signal transduction pathways: the road taken.  
Science 1995 Apr 14;268(5208):233-9.

Clezardin P  
Recent insights into the role of integrins in cancer metastasis  
Cellular and Molecular Life Sciences 1998, Vol. 54, Issue 6:541-548.

Coppolino, Marc G, Dedhar, Shoukat  
Bi-directional signal transduction by integrin receptors  
The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2000, Vol 32, 2:171-188.

Dahlmann T, Grimelius L, Wallin G, Rubin K, Westermarck K  
Integrins in thyroid tissue upregulation of  $\alpha 2\beta 1$  in anaplastic thyroid carcinoma  
European Journal of Endocrinology 1998, 138:104-112.

Dardik R, Shenkman B, Tamarin I, Eskaraev R, Harsfalvi J, Varon D, Inbal A.  
Factor XIII mediates adhesion of platelets to endothelial cells through alpha(v)beta(3) and glycoprotein IIb/IIIa integrins.  
Thromb Res. 2002, 105(4):317-23.

Dorrell MI, Aguilar E, Schepke L, Barnett FH, Friedlander M.  
Combination angiostatic therapy completely inhibits ocular and tumor angiogenesis.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104(3):967-72.

Dvorak HF, Orenstein NS, Carvalho AC, Churchill WH, Dvorak AM, Galli SJ, Feder J, Bitzer AM, Rypysc J, Giovinco P.  
Induction of a fibrin-gel investment: an early event in line 10 hepatocarcinoma growth mediated by tumor-secreted products.  
J Immunol. 1979, 122(1):166-74.

Dvorak HF, Dvorak AM, Manseau EJ, Wiberg L, Churchill WH.  
Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression.  
J Natl Cancer Inst. 1979, 62(6):1459-72.

Eble JA, Haier J.  
Integrins in cancer treatment.  
Curr Cancer Drug Targets. 2006, 6(2):89-105.

Eliceiri BP, Klemke R, Strömblad S, and Cheresh DA  
Integrin v3 Requirement for Sustained Mitogen-activated Protein Kinase Activity during Angiogenesis  
J. Cell Biol. 1998, 140:1255-1263.

Ensinger CH, Obrist P, Bacher-Stier C, Mikuz G, Moncayo R, & Riccabona G.  
 $\beta 1$ -integrin expression in papillary thyroid carcinoma  
Cancer Research 1998, 18: 33-40.

- Ferrara N, Henzel WJ  
Pituitary follicular cells secrete a novel growth factor specific for vascular endothelial cells.  
BBRC 1989, 161:851-8.
- Ferrara N, Houli LM, Jackeman L, Leung DW  
Molecular and biological properties of the VEGF family of proteins  
Endocrin Rev. 1992, 13:18-32.
- Ferrara N, Davis-Smyth T,  
The biology of vascular endothelial growth factor  
Endocrin Rev 1997, 18:4-25.
- Folkman J, Hochberg M.  
Self-regulation of growth in three dimensions.  
J Exp Med. 1973, 138(4):745-53.
- Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Chersesh DA.  
Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha$  v integrins  
Science. 1995, 270(5241):1500-2.
- Greeblatt M and Shubik P  
Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique  
J Natl. Cancer Inst. 1968, 41:111-124.
- Gehlsen KR, Argraves WS, Pierschbacher MD, Ruoslahti E.  
Inhibition of in vitro tumor cell invasion by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptides.  
J Cell Biol. 1988, 106(3):925-30.
- Giancotti FG und Ruoslahti E  
Integrin Signaling  
Science 1999, 285: 1028-1033.
- Hanahan D, Folkman J.  
Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis.  
Cell. 1996, 86(3):353-64.
- Hassan I, Wunderlich A, Slater E, Hoffmann S, Celik I, Zielke A.  
Antisense p53 decreases production of VEGF in follicular thyroid cancer cells.  
Endocrine. 2006, 29(3):409-12.
- Hoffmann S, Hofbauer LC, Scharrenbach V, Wunderlich A, Hassan I, Lingelbach S, Zielke A.  
Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors.  
J Clin Endocrinol Metab. 2004, 89(12):6139-45.
- Hoffmann S, Maschuw K, Hassan I, Reckzeh B, Wunderlich A, Lingelbach S, Zielke A. Differential pattern of integrin receptor expression in differentiated and anaplastic thyroid cancer cell lines.  
Thyroid. 2005, 15(9):1011-20.
- Hynes RO.  
Integrins: a family of cell surface receptors.  
Cell. 1987, 48(4):549-54.
- Hynes RO  
Integrins: Versatility Modulation, and Signaling in Cell Adhesion  
Cell 1992, Vol.69:11-25.
- Illario M, Cavallo AL, Monaco S, Di Vito E, Mueller F, Marzano LA, Troncone G, Fenzi G, Rossi G, Vitale M.



Fibronectin-induced proliferation in thyroid cells is mediated by  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin through Ras/Raf-1/MEK/ERK and calcium/CaMKII signals.  
J Clin Endocrinol Metab. 2005, 90(5):2865-73.

Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK, Alitalo K.  
Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice.  
Science. 1997, 276(5317):1423-5.

Joukov V, Sorsa T, Kumar V, Jeltsch M, Claesson-Welsh L, Cao Y, Saksela O, Kalkkinen N and Alitalo K  
Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C  
EMBO J. 1997, 16: 3898-3911.

Kelly T, Molony L, and Burridge K  
Purification of two smooth muscle glycoproteins related to integrin. Distribution in cultured chicken embryo fibroblasts  
J. Biol. Chem. 1987, 262: 17189-17199

Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA.  
Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 with the central cell-binding domain of fibronectin.  
Am J Pathol. 2000, 156(4):1345-62

Klagsbrun M, Moses MA  
Molecular angiogenesis.  
Chem Biol. 1999, 6(8):R217-24.

Kondo S, Asano M, Suzuki H.  
Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody.  
Biochem Biophys Res Commun. 1993, 194(3):1234-41.

Lauren J, Gunji Y, Alitalo K.  
Is angiopoietin-2 necessary for the initiation of tumor angiogenesis?  
Am J Pathol. 1998, 153(5):1333-9.

Leeni K, Reidar G, Jyrki H, Hannu L.  
Integrins  $\alpha$ 5 $\beta$ 1,  $\alpha$ v $\beta$ 1, and  $\alpha$ v $\beta$ 6 Collaborate in Squamous Carcinoma Cell Spreading and Migration on Fibronectin  
Experimental Cell Research 2000, Vol. 255, No. 1:10-17.

Liotta LA  
Tumor invasion and metastases – role of the extracellular matrix  
Cancer Res. 1986, 46(1):1-7.

Lu S, Simin K, Khan A, Mercurio AM.  
Analysis of Integrin  $\beta$ 4 Expression in Human Breast Cancer: Association with Basal-like Tumors and Prognostic Significance.  
Clin Cancer Res. 2008, 14(4):1050-8.

Mahabeleshwar GH, Feng W, Phillips DR, Byzova TV.  
Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis.  
J Exp Med. 2006, 203(11):2495-507.

Marti HH, Risau W.  
Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95(26):15809-14.

Matola Tdi, Müller F, Fenzi G, Rossi G, Bifulco M, Marzano LA a Vitale M.  
Serum withdrawal-induced apoptosis in thyroid cells is caused by loss of fibronectin-integrin interaction  
*J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85(3):1188-93.

Mattei MG, Borg JP, Rosnet O, Marme D, Birnbaum D.  
Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to  
human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively.  
*Genomics.* 1996, 32(1):168-9.

Malinda KM, Kleinman HK.  
The laminins.  
*Int J Biochem Cell Biol.* 1996, 28(9):957-9.

Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A.  
High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of  
vasculogenesis and angiogenesis.  
*Cell.* 1993, 72(6):835-46.

Demeure MJ, Doffek KM, Rezaee M, Goretzki PE, Wilson SD.  
Diminished expression of the alpha 5 beta 1 integrin (fibronectin receptor) by invasive clones of a  
human follicular thyroid cancer cell line.  
*World J Surg.* 1994, 18(4):569-75.

Mortarini R, Gismondi A, Santoni A, Parmiani G, Anichi A.  
Role of the  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin receptor in the proliferative response of quiescent human melanoma cells to  
fibronectin  
*Cancer Research* 1992, 52:4499-4506.

Nermut MV, Green NM, Eason P, Yamada SS, and Yamada KM  
Electron microscopy and structural model of human fibronectin receptor  
*EMBO J.* 1988, 7(13):4093-9.

Pal S, Datta K, Mukhopadhyay D.  
Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor  
(VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma.  
*Cancer Res.* 2001, 61(18):6952-7.

Pierschbacher MD, Ruoslahti E.  
Variants of the cell recognition site of fibronectin that retain attachment-promoting activity.  
*Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984, 81(19):5985-8.

Pierschbacher MD, Ruoslahti E  
Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule.  
*Nature.* 1984, 309(5963):30-3.

Poltorak Z, Cohen T, Sivan R, Kandelis Y, Spira G, Vlodaysky I, Keshet E, Neufeld G.,  
VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix.  
*J Biol Chem.* 1997, 272(11):7151-8.

Ruoslahti E  
Fibronectin and its Receptors  
*Annu Rev Biochem.* 1988, 57:375-413.

Ruoslahti E, Reed JC  
Review: Anchorage Dependence, Integrins and Apoptosis  
*Cell* 1994, 77:577-478.

Ruoslahti E  
Protein, Structure RGD and other recognition sequences for integrins.  
*Annu Rev Cell Dev Biol.* 1996, 12:697-715.

Ruoslahti E, Engvall E

Integrins and vascular extracellular matrix assembly.

J Clin Invest. 1997, 100(11 Suppl):S53-6.

Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R.

Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor.

Science. 1986, 232(4755):1250-3.

Schvartz, I; Seger D; Shaltiel S

Vitronectin

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 1999, 31, Issue: 5:539-544.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF.

Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.

Science. 1983, 219(4587):983-5.

Senger DR, Claffey KP, Benes JE, Perruzzi CA, Sergiou AP, Detmar M.

Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor:

Regulation through alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins.

Cell Biology 1997, 94:13612-13617.

Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E.

Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1995, 92(3):768-72.

Setty S, Kim Y, Fields GB, Clegg DO, Wayner EA, Tsilibary EC.

Interactions of type IV collagen and its domains with human mesangial cells.

J Biol Chem. 1998, 273(20):12244-9.

Silletti S, Cheresh D A

A link between integrins and MMPs in angiogenesis

Fibrinolysis and Proteolysis 1999, 13, No. 6:226-238.

Slavin J.

Fibroblast growth factors: at the heart of angiogenesis.

Cell Biol Int. 1995, 19(5):431-44.

Smit JWA, van der Pluijm G, Vloedgraven HJ, Lowik CW., Gosling BM.

Role of integrins in the attachment of metastatic follicular thyroid carcinoma cell lines to bone.

Thyroid. 1998, 8(1):29-36.

Soh EY, Sobhi SA, Wong MG, Meng YG, Allan E, Siperstein, Clark OH, Duh QY.

Thyroid stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines

Surgery 1996, 120(6):944-947.

Soh EY, Duh QY, Sobhi SA, Young DM, Epstein HD, Wong MG, Garcia YK, Min YD, Grossman RF, Siperstein AE, Clark OH.

Vascular endothelial growth factor expression is higher in differentiated thyroid cancer than in normal or benign thyroid.

J Clin Endocrinol Metab. 1997, 82(11):3741-7.

Soldi R, Mitola S, Strasly M, Defilippi P, Tarone G, Bussolino F.

Role of alpha v beta 3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2.

EMBO J. 1999, 18(4):882-92.

Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P.

Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor.  
Biochem Biophys Res Commun. 1992, 187(3):1579-86.

Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, Margulies IM, Liotta LA.  
Laminin receptor on human breast carcinoma cells.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1983, 80(2):444-8.

Thomlinson RH, Grey LH  
The histological structure of some human lung cancers and possible implications for radiotherapy  
Br J Cancer 1955, 9:539-49.

Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidart JM, Martin GR.  
Laminin-a glycoprotein from basement membranes.  
J Biol Chem. 1979, 254(19):9933-7.

Timpl R.  
Macromolecular organization of basement membranes.  
Curr Opin Cell Biol. 1996, 8(5):618-24.

Trusilino L, Serini G, Cecchini G, Besati C, Ambesi-Impiombat FS, Marchisio PC, Filippi R  
Growth Factor-dependent Activation of  $\alpha v\beta 3$  integrin in Normal epithel cells: Implecation for tumor invasion  
J Cell Biol. 1998, 142(4):1145-56.

Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K.  
Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors.  
Cancer Res. 2000, 60(2):203-12.

Vieira JM, Santos SC, Espadinha C, Correia I, Vag T, Casalou C, Cavaco BM, Catarino AL, Dias S, Leite V.  
Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop.  
Eur J Endocrinol. 2005, 153(5):701-9.

Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G, Fusco Persico M G  
Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human tumors and cell lines  
Oncogene, 1995, 11:1569-1579.

Vitale M, Illario M, Di Matola T, Casamassima A, Fenzi G, Rossi G  
Integrin binding to immobilized collagen and fibronectin stimulates the proliferation of human thyroid cells in culture.  
Endocrinology. 1997, 138(4):1642-8.

Vitale M, Matola T di, Fenzi G, Illario M, Rossi G  
Fibronectin is required to prevent thyroid cell apoptosis through an integrin-mediated adhesion mechanism  
J Clin Endocrinol Metab. 1998, 83(10):3673-80.

Warren BA and Shubik P  
The growth of blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch  
Lab. Invest. 1966, 15:464-478.

Weaver, Valerie M, Roskelley, Calvin D  
Extracellular matrix: the central regulator of cell and tissue homeostasis  
Trends in Cell Biology, 1997, 7, Issue: 1:40-42.

Yeh CH, Peng HC, Huang TF  
Cytokines Modulate Integrin  $\alpha v\beta 3$ -Mediated Human Endothelial Cell Adhesion and Calcium Signaling

Experimental Cell Research, 1999, 251, No. 1:57-66

Yurchenco PD, Schittny JC  
Molecular architecture of basement membranes.  
FASEB J. 1990, 4(6):1577-90.

Zielke A, Tezelman S, Jossart GH, Wong M, Siperstein AE, Duh QY, Clark OH Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hurthle cell origin.  
Thyroid. 1998, 8(6):475-83.

## **Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren folgende Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Basler, Baum, Christiansen, Daut, Feuser, Gotzen, Griss, Grundmann, Hasilik, Hellinger, Hesse, Hofmann, Kern, Krieg, Lennartz, Mueller, Müller, Niessing, Oertel, Schmidt, Schulz, Seitz, Steiniger, Sundermeyer, Vohland, Voigt, Weihe.

Meine akademischen Lehrer in Innsbruck waren folgende Herren:

Bibel, Dierich, Dietze, Fritsch, Glossmann, Göttinger, Jaschke, Kofler, Mikuz, Pfeiffer, Poewe, Puschendorfer, Striessnig, Winkler, Zorowka.

Meine akademischen Lehrer in Kassel waren folgende Herren:

Hesterberg, Melchior.

Mein akademischer Lehrer in Clermont-Ferrand war folgender Herr:

Aumaitre.

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei Herrn Univ. Prof. Dr. med. A. Zielke für die Betreuung der Arbeit und bei Herrn PD Dr. med. S. Hoffmann für die Überlassung des interessanten Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt dem Team der AG Schilddrüse der Klinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie, insbesondere Fr. Dr. Wunderlich, für ihre freundliche Hilfsbereitschaft.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, besonders meiner Schwester Feriel Amari sowie meiner Frau Natascha Schnitzer für die moralische Unterstützung.