

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und
Gefäßchirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Professor Dr. med. Henning Dralle

Arbeitsgruppe Experimentelle und Chirurgische Onkologie
Leiter: Privatdozent Dr. rer. nat. Cuong Hoang-Vu



**Untersuchungen zur Expression von
Zellzyklusregulatorproteinen in Zelllinien
und Geweben der Schilddrüse**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jana Baumann
geboren am 18.05.1977 in Jena

Gutachter: Prof. Dr. Holzhausen
Prof. Dr. H. Dralle
Dr. C. Schmutzler

Verteidigungsdatum: 07.12.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000010016

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010016>]

Meiner Mutter

Referat und bibliographische Beschreibung

Der eukaryote Zellzyklus umfaßt die Entstehung zweier Tochterzellen aus einer Mutterzelle bis zur erneuten Teilung der beiden Tochterzellen. Kontrollpunkte im Zellzyklus haben die Aufgabe, im Falle einer DNS-Schädigung die Weitergabe der Erbsubstanz zu verhindern. P27, Cyclin E und Cyclin D3 steuern die Initiation der DNS-Replikation und Zellzyklusprogression. Eine Deregulation dieses G1/S-Kontrollpunktes, bedingt durch einen Mangel an Inhibitoreiweißen wie p27 oder durch eine Cyclin-Überexpression, führt zu einer autonomen Proliferation aberranter Zellen und damit zur Entstehung eines malignen Tumors.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Teilungsrate von 2 follikulären (FTC 133, FTC 238) und 2 undifferenzierten Schilddrüsenzelllinien (UTC C643, UTC 8505C) mittels MTT-Test ermittelt und mit der Expression von p27, Cyclin E und Cyclin D3 in den thyroidalen Zelllinien verglichen. Dabei ergab sich eine positive Korrelation zwischen dem Cyclin E/ Cyclin D3-Spiegel und dem Wachstumsverhalten der Schilddrüsenzelllinien, während die p27-Expression keinen Einfluß auf die Proliferationsrate hatte.

Weiterhin wurden 5 thyroideale Normalgewebe, 21 papilläre, 16 follikuläre und 15 undifferenzierte Schilddrüsenkarzinomgewebe auf ihre Expression von p27, Cyclin E und Cyclin D3 untersucht. Die nicht-transformierten Schilddrüsen-gewebe zeigten ähnlich wie die anaplastischen Schilddrüsenmalignome ein geringes Vorkommen von p27. Im Vergleich dazu fand sich eine p27-Überexpression in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (PTC, FTC). Cyclin E wurde von den thyroidalen Normalgeweben als auch von den papillären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen nur in geringem Maße exprimiert. Dagegen wiesen die follikulären Schilddrüsentumoren sehr hohe Cyclin E-Spiegel auf. Alle Schilddrüsennormalgewebe waren negativ für Cyclin D3. In der Mehrzahl der follikulären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome wurde eine Überexpression von Cyclin D3 gemessen, während nur in einer Lymphknotenmetastase eines papillären Schilddrüsen-tumors ein hohes Cyclin D3-Level auffiel. Lediglich in den FTC fand sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen hinsichtlich der Cyclin D3-Expression. Insgesamt korrelierte die Expression der oben genannten Zellzyklusregulatoren nicht mit dem pTNM-Stadium. Bezugnehmend auf die Theorie, dass sich undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome aus präexistenten gut-differenzierten Schilddrüsentumoren entwickeln, läßt der signifikante Unterschied in der p27-Expression zwischen den untersuchten papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu den anaplastischen Schilddrüsentumoren vermuten, dass p27 eine wichtige Rolle im Dedifferenzierungsprozess von thyroidalen Malignomen spielt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Verwendete Abkürzungen

	Seiten	
1	Einleitung	1
1.1	Zellzyklus	1
1.1.1	Genetische Stabilität von Zellen	1
1.1.2	Grundlagen des Zellzyklus	2
1.1.3	Regulation der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen	4
1.1.4	Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen	4
1.1.5	G1/S-Übergang	5
1.1.6	Der Begriff des <i>Restriction-Point</i>	5
1.1.7	Deregulation der Kontrollpunkte	6
1.1.8	p27	6
1.1.9	Cyclin E	7
1.1.10	Cyclin D3	8
1.2	Maligne Schilddrüsenneoplasien	8
1.2.1	Pathogenese und Einteilung der malignen Schilddrüsenneoplasien	8
1.2.2	Papilläres Schilddrüsenkarzinom	9
1.2.3	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom	9
1.2.4	Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom	10
1.2.5	pTNM-Klassifikation	10
1.3	Aufgabenstellung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Materialien und Geräte	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Zellkulturmaterialien	14
2.1.3	Verwendete Antikörper für die Westernblot-Analyse	14
2.1.4	Hilfsmittel und Dokumentationsmaterial	14
2.1.5	Geräte	15
2.2	Patientengewebe	15

2.3	Zelllinien	16
2.4	Zellkultivierung	17
2.4.1	Kulturmedium	17
2.4.2	Stammhaltung und Passagierung	17
2.5	MTT-Test	18
2.5.1	Prinzip	18
2.5.2	Bestimmung der Wachstumskinetiken mittels MTT-Test	18
2.6	Westernblot	18
2.6.1	Proteingewinnung	18
2.6.2	Herstellung der SDS-Gele	20
2.6.3	Probenauftragung und Elektrophorese	21
2.6.4	Semidry Blotting	22
2.6.5	Reversible Färbung mit Ponceau S	22
2.6.6	Behandlung der Membran mit Antikörpern	23
2.6.7	Chemilumineszenz	24
2.6.8	Auswertung	25
2.7	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse	27
3.1	Schilddrüsenzelllinien	27
3.1.1	Wachstumskinetiken im MTT-Test	27
3.1.2	Expression von p27, Cyclin E, Cyclin D3 in Schilddrüsenzelllinien	28
3.1.3	Assoziation zwischen Expression der Zellzyklusregulatoren und der Wachstumsrate in Schilddrüsenzelllinien	31
3.2	Schilddrüsengewebe	33
3.2.1	p27	33
3.2.2	Cyclin E	37
3.2.3	Cyclin D3	42

4	Diskussion	47
4.1	Schilddrüsenzelllinien	47
4.1.1	Einfluß von p27 auf die Wachstumskinetik in vitro	47
4.1.2	Einfluß von Cyclin E und Cyclin D3 auf die Wachstumskinetik in vitro	47
4.2	p27 in Schilddrüsengeweben	49
4.2.1	Expression von p27 in nicht-transformierten Schilddrüsen- geweben	49
4.2.2	Expression von p27 in FTC, PTC	49
4.2.3	Expression von p27 in UTC	50
4.2.4	p27-Expression und pTNM-Stadium	52
4.3	Cyclin E in Schilddrüsen- geweben	53
4.3.1	Expression von Cyclin E in nicht-transformierten Schilddrüsen- geweben	53
4.3.2	Expression von Cyclin E in FTC	53
4.3.3	Expression von Cyclin E in UTC, PTC	54
4.3.4	Cyclin E-Expression und pTNM-Stadium	56
4.4	Cyclin D3 in Schilddrüsen- geweben	56
4.4.1	Expression von Cyclin D3 in nicht-transformierten Schilddrüsen- geweben	56
4.4.2	Rolle von Cyclin D3 in Schilddrüsenkarzinomen	56
4.4.3	Cyclin D3-Expression und pTNM-Stadium	58
4.5	Assoziation zwischen p27, Cyclin E und Cyclin D3	58
4.6	Klinische Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse	60
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	63
	Medizinische Fachwörter	76
	Thesen der Dissertation	78

Abbildungsverzeichnis

	Seiten	
Abbildung 1	Phasen des Zellzyklus	2
Abbildung 2	Regulation des Zellzyklus	3
Abbildung 3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	21
Abbildung 4	Sandwich-Aufbau beim Semidry Blotting	22
Abbildung 5	Inkubation mit dem Primärantikörper	24
Abbildung 6	Inkubation mit dem Sekundärantikörper	24
Abbildung 7	Chemilumineszenz	24
Abbildung 8	Beschreibung der Variabilität der Expressionswerte der Positivkontrolle	26
Abbildung 9	Wachstumskinetik der Schilddrüsenzelllinien	27
Abbildung 10	Expression von p27, Cyclin E, Cyclin D3 in Schilddrüsenzelllinien	
	a) Westernblot	29
	b) graphische Darstellung	30
Abbildung 11	Assoziation zwischen Wachstumskinetik und Expression der Zellzyklusproteine in Schilddrüsenzelllinien	32
Abbildung 12	Expression von p27 in Schilddrüsengeweben	
	a) Westernblot	34
	b) graphische Darstellung	35
Abbildung 13	Korrelation zwischen p27-Expression und pTNM-Stadium	36
Abbildung 14	Expression von Cyclin E in Schilddrüsengeweben	
	a) Westernblot	39
	b) graphische Darstellung	40
Abbildung 15	Korrelation zwischen Cyclin E-Expression und pTNM-Stadium	41
Abbildung 16	Expression von Cyclin D3 in Schilddrüsengeweben	
	a) Westernblot	43
	b) graphische Darstellung	44
Abbildung 17	Cyclin D3-Expression in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen	45
Abbildung 18	Korrelation zwischen Cyclin D3-Expression und pTNM-Stadium	46
Abbildung 19	Steuerung des G1/S-Übergangs durch Cyclin E	48

Tabellenverzeichnis

		Seiten
Tabelle 1	Patientenmaterial	16
Tabelle 2	Zusatz von Proteaseinhibitoren	19
Tabelle 3	Pipettierschema für Verdünnungsreihe	19
Tabelle 4	Pipettierschema für SDS-Polyarcylamidgele	20
Tabelle 5	Zellzyklusproteine und ihr spezifisches Molekulargewicht in Kilo-Dalton	25

Abkürzungen

APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B-MYB	<i>B-Myeloblastosis</i>
BSA	Rinderserumalbumin
CAK	<i>CDK-activating Kinase</i>
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CKI	<i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxiribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
E2F	<i>Transkription Factor 2</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FM	Fernmetastase
FTC	<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>
G	<i>Gap Phase</i>
HBSS	<i>Hank's Balanced Salts</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
Hrsg	Herausgeber
LKM	Lymphknotenmetastase
Lsg	Lösung
M	Mitosephase
m-RNS	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenol-Tetrazolium-Bromid
N	Normalgewebe
NC	Nitrocellulose
NPAT	<i>Nuclear Protein Mapping To The ATM Locus</i>
Nr	Nummer
P	Primärtumor
PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphat Buffered Saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

pRb	Retinoblastomaprotein
PTC	<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>
R	<i>Restriction Point</i>
RNS	Ribonukleinsäure
S	Synthesephase
SCF	<i>Standrad Cubic Foot</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TNM	<i>Tumor Node Metastasis</i> (Tumorklassifikation)
TSH	<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>
Tween	<i>Polyoxyethylene Sorbitan Monolaureate</i>
UTC	<i>Undifferentiated / Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>
UV	Ultraviolett

1 Einleitung

Weltweit werden maligne Tumoren als zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen verzeichnet. Das Schilddrüsenkarzinom macht weniger als 1% aller bösartigen Neoplasien aus. Im endokrinen System stellt es das häufigste Malignom mit der höchsten Mortalität dar (Goerges, 2001). Die jährliche Inzidenz beträgt 20 bis 50 Fälle pro 1.000.000 Einwohner (Pfannenstiel et Saller, 1992). Frauen sind hinsichtlich des Auftretens von Schilddrüsenkarzinomen 2 bis 5 mal häufiger betroffen als Männer (Freitag et al., 1999). Da aber die thyroïdale Karzinogenese geschlechtsunabhängig ist, werden endogene Hormone als Promotoren vermutet (Fink et al., 1996). Dieser Einfluß ist jedoch nicht durch Literatur belegbar.

Während der letzten Jahre haben die Erfolge in der Aufklärung der Regulation des Zellzyklus das Verständnis der Krebsentstehung revolutioniert. Dennoch bleiben viele Fragen nach den komplexen Zusammenhängen der Tumorgenese und Metastasierung als auch nach der Interaktion von Schlüsselproteinen offen.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Expression von Zellzyklusmolekülen in Schilddrüsenzelllinien und -geweben, um Aufschlüsse über Regulationsmechanismen der Zellproliferation und thyroïdalen Karzinogenese zu gewinnen.

1.1 Zellzyklus

1.1.1 Genetische Stabilität von Zellen

Zelluläre DNS wird während der normalen Zellteilung ununterbrochen durch externe Stimuli wie UV-Licht, -Strahlung oder toxische Chemikalien beschädigt (Molinari, 2000). Die genetische Stabilität von Zellen basiert auf der adäquaten Reaktion auf DNS-verändernde Einflüsse.

Eine Zelle hat drei Möglichkeiten auf die Schädigung ihrer Erbsubstanz zu reagieren:

- Zellzyklusblock
- DNS-Reparatur
- Apoptose

Welcher Weg eingeschlagen wird, ist abhängig vom Zelltyp, Art und Intensität des Störfaktors sowie dem Zellzyklusstadium zum Zeitpunkt der Schädigung (Funk et Kind, 1997). Maligne Tumoren bilden sich durch die klonale Expansion einzelner Zellen, die durch mindestens zwei Genmutationen einen Selektionsvorteil erworben haben („two hit hypothesis“ nach Knudson, 1996). Diese Veränderungen oder Verluste betreffen Gene, die an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung beteiligt sind. Wird eine Mutation in einer normalen Zelle nicht repariert, sondern an die Tochterzellen weiter-

gegeben, entstehen aberrante Zellen, die eine erhöhte Teilungsrate aufweisen können. Im Verlauf ihrer klonalen Proliferation erhalten Tumoren schrittweise zahlreiche somatische Mutationen in verschiedenen Genen (klonale Tumorheterogenität: Fey, 1999). Einige Zellen verlieren den Zellkontakt und können sich autonom, d.h. unabhängig von äußeren Faktoren, teilen. Infiltration des umgebenden Gewebes, des Blut- und Lymphsystems mit der Ausbildung von Metastasen sind die Folge.

1.1.2 Grundlagen des Zellzyklus

Der eukaryote Zellzyklus umfaßt die Entstehung zweier Tochterzellen aus einer Mutterzelle bis zur erneuten Teilung der beiden Tochterzellen. Dieser kontinuierliche Prozess gliedert sich in verschiedene Abschnitte (Weinberg, 1999), die in Abbildung 1 dargestellt sind.

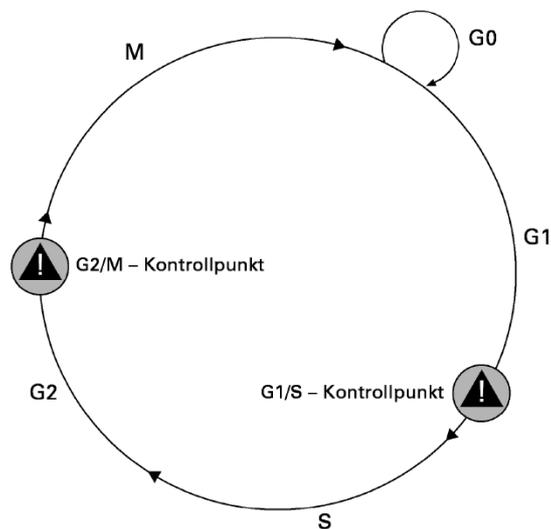


Abbildung 1: Phasen des Zellzyklus, modifiziert nach Funk et Kind, 1997

Durch den Einfluß von Wachstumsfaktoren treten die Zellen aus dem Ruhestadium (G0-Phase) in die G1-Phase ein. In dieser Zeit erreichen die Tochterzellen die Größe der Mutterzelle und synthetisieren Proteine für die anschließende Replikation der DNS (S-Phase). Die G2-Phase dient der Vorbereitung der nachfolgenden Zellteilung (M-Phase).

Es existieren nun Kontrollpunkte an mindestens zwei Stellen des Zellzyklus, zum einen am Übergang der G1-Phase in die S-Phase und zum anderen vor Beginn der M-Phase (Funk et Kind, 1997). Dabei handelt es sich um komplexe Signaltransduktionssysteme. Sie haben die Aufgabe, im Falle einer DNS-Schädigung die Weitergabe der Erbsubstanz zu verhindern. Die Wirksamkeit dieser Kontrollpunkte sowie der Fortgang der Zelle durch den Zellzyklus wird von Proteinkinasen gesteuert. Diese Enzyme sind als Monomere inaktiv. Ihre

Aktivierung erfolgt durch die Bildung von heterodimeren Molekülen mit ihren regulatorischen Partnerproteinen, den Cyclinen (Pines, 1999). Daher werden sie als Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases/ CDK*) bezeichnet. Cyclin-CDK-Komplexe verstärken ausgesendete Wachstumssignale durch Phosphorylierungen an Serin- und Threonin-Stellen von Schlüsselsubstraten. Solche Zielproteine können beispielsweise das Retinoblastomprotein (pRb) und seine Familienmitglieder p107, p130 sein (Lundberg et Weinberg, 1999). Eine geregelte Progression des Zellzyklus erfordert die Aktivierung von verschiedenen Cyclin/CDK-Komplexen während der einzelnen Kreislaufabschnitte (Abbildung 2).

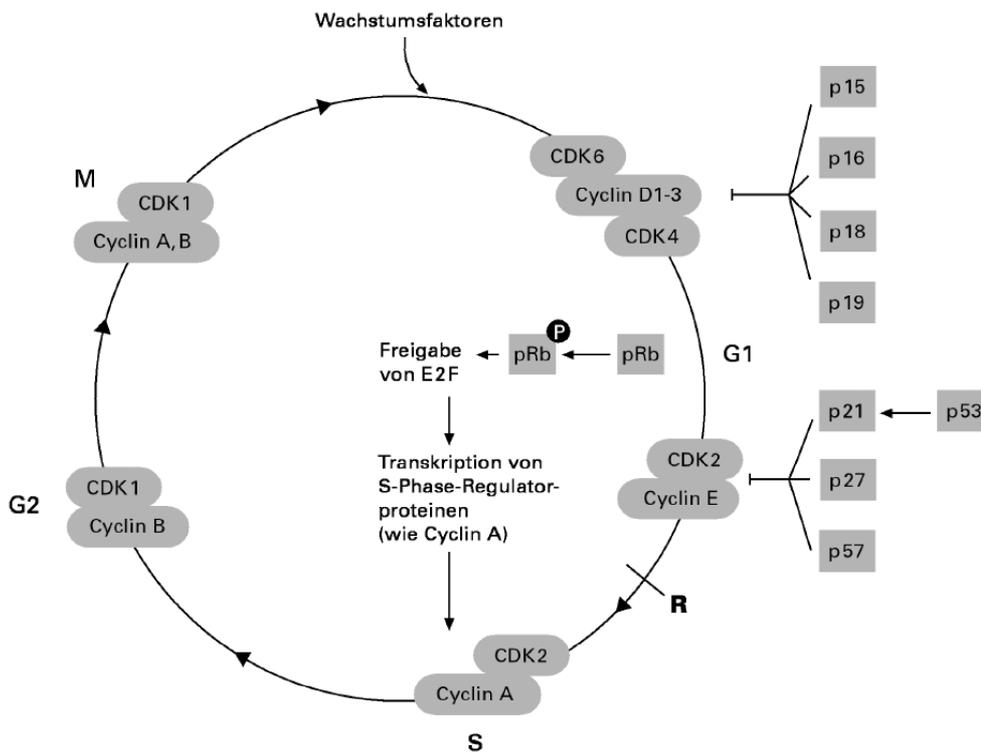


Abbildung 2: Regulation des Zellzyklus, modifiziert nach Funk et Kind, 1997

In den frühen 80er Jahren sind die Cycline und ihre Schwankungen während des Zellzyklus erstmals in Seeigeleiern entdeckt worden (Evans et al., 1983). Wie in Abbildung 2 gezeigt, steuern D-Cycline die G1-Phase und den G1/S-Übergang. Sie stellen die regulatorischen Untereinheiten von CDK4 und CDK6 dar. Der Eintritt in die S-Phase steht unter Kontrolle von Cyclin E, das mit CDK2 einen Komplex bildet. Für den korrekten Ablauf der DNS-Replikation sind Cyclin A/CDK2-Moleküle verantwortlich. Die G2-Phase und der Start der Mitose wird schließlich durch Heterodimere aus Cyclin B oder A und CDK1 reguliert (Pestell et al., 1999; Musunuru et Hinds, 1997a). Durch die variierenden Cyclin-Konzentrationen sind während der einzelnen Zellzyklusphasen nur ganz bestimmte Kinasen aktiv. Diese Kontrollvorgänge gewährleisten, dass nur

ein geringer Anteil der normalen Follikelzellen in der Schilddrüse proliferiert. Feedback-Mechanismen verhindern ein vorzeitiges Eintreten in die nächste Phase des Zellzyklus, bevor nicht die notwendigen makromolekularen Ereignisse vollständig abgeschlossen sind (Toyoshima et Hunter, 1994).

1.1.3 Regulation der Aktivität der Cyclin-abhängigen Kinasen

Die CDK-Spiegel bleiben während des Zellzyklus konstant. Ihre enzymatische Aktivität wird durch posttranslationale Modifikation auf drei verschiedenen Ebenen reguliert (Sherr, 1996).

1. Durch die Bindung des Cyclins an das N-terminale Ende des CDK-Moleküls kommt es zu strukturellen Veränderungen innerhalb der Substratbindungsregion, der sogenannten T-Schleife. Somit ist eine Interaktion mit dem Zielprotein möglich (McDonald et El-Deiry, 2000).
2. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen der Kinasen können zu ihrer Aktivierung oder Inhibition beitragen (Pestell et al., 1999).
3. CDK-Inhibitoren (CKI) hemmen speziell Cyclin/CDK Komplexe, die den Eintritt in die S-Phase steuern (Pines, 1999).

1.1.4 Inhibitoren der Cyclin-abhängigen Kinasen

CDK-Inhibitoren sind inaktivierende Proteinuntereinheiten der Kinasen. Sie werden in der Regel aufgrund ihres Molekulargewichts benannt (Fey, 2000). Man unterscheidet zwischen zwei Gruppen, die sich biochemisch und funktionell ähneln.

Zur ink4-Familie gehören p15, p16, p18 und p19, die eine homologe ankyrin-verwandte Sequenz aufweisen. Sie inhibieren speziell CDK4- und CDK6-Komplexe (Sherr, 1996). Dieser Sachverhalt ist in der Abbildung 2 dargestellt. Die cip/kip-Familie wird durch p21, p27 und p57 gebildet. Diese Proteine gleichen sich in ihrer amino-terminalen Domäne (Musunuru et Hinds, 1997b). Sie können in vitro Cyclin/CDK-Komplexe unselektiv hemmen, zeigen aber eine bevorzugte Effizienz gegenüber CDK2- und CDK4-Komplexen (Toyoshima et Hunter, 1994; Abbildung 2). Die Regulation der Kinaseaktivität erfolgt am S-Phase-Eintritt hauptsächlich durch p27 und während der restlichen Zellzykluspassage primär durch p21 (Nourse et al., 1994). Trotz ihrer strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit unterscheiden sich die Proteine in ihrer Aktivierung (Graña et Reddy, 1995). P21 wird im Falle einer DNS-Schädigung durch p53 induziert und ist für den p53-vermittelten G1-Block verantwortlich (El-Deiry et al., 1993). Dagegen beeinflussen extrazelluläre Signale den p27-Spiegel (Slingerland et Pagano, 2000). CDK-Inhibitoren fungieren als Tumorsuppressorproteine. Durch ihre Überexpression verbleiben Zellen mit verändertem Erbgut bis zur DNS-Reparatur in

der G1-Phase, gehen in G0-Phase über oder sterben apoptotisch (Pestell et al., 1999). Somit wird eine erneute Zellteilung der aberranten Tochterzellen verhindert (Kassen et Hofmockel, 2000).

1.1.5 G1/S-Übergang

Durch das Einwirken von Wachstumsfaktoren (Mitogenen) tritt die Zelle in den Zellzyklus ein. Dieser Vorgang wird durch die Induktion von einem oder mehreren D-Cyclinen gesteuert, die gebunden an CDK4 oder CDK6, pRb und seine verwandten Proteine phosphorylieren (Weinberg, 1995). Zusätzlich beeinflusst der Faktor E2F die Initiation der DNS-Replikation. Es handelt sich hierbei um ein Protein, das die Transkription von Genen reguliert, die an der Verdopplung der Erbsubstanz beteiligt sind (Pines, 1999). Wie in Abbildung 2 gezeigt, hebt die oben beschriebene Phosphorylierung die pRb-vermittelte Hemmung der E2F-Genexpression auf. Der Transkriptionsfaktor E2F bindet an die DNS und löst die Synthese von Regulatorproteinen aus, die für Passage des R-Punktes notwendig sind (Molinari, 2000).

Dieser Prozess wird initial getriggert durch Cyclin D/CDK-Komplexe und dann beschleunigt durch Cyclin E/CDK2-Komplexe, die das pRb an verschiedenen Seiten phosphorylieren. Dabei stellt die komplette pRb-Phosphorylierung das Signal für den S-Phase-Eintritt dar (Lundberg et Weinberg, 1998). Die Aktivität des Cyclin E-Gens ist gleichzeitig Ziel und Regulator der E2F-Faktoren. In Form eines positiven Rückkopplungsmechanismus fördern pRb und E2F die Transkription des Cyclin E-Gens (Geng et al., 1996; Botz et al., 1996). Die Cyclin E-Proteinexpression erreicht am G1/S-Übergang ihr Maximum. Mit dem Beginn der DNS-Replikation wird Cyclin E durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse abgebaut. Cyclin A- und B-abhängige Kinasen halten den phosphorylierten Zustand von pRb aufrecht, bis die Zelle die Mitose beendet hat und wieder in die G1- oder G0-Phase eingetreten ist.

1.1.6 Der Begriff des *Restriction-Point*

Der G1/S-Übergang ist ein wichtiger Kontrollpunkt in Säugetierzellen. Arthur Pardee (1974) entdeckte, dass normale Zellen exogene mitogene Signale nur in der mittleren und späten G1-Phase aufnehmen. Überschreitet eine Zelle diesen R-Punkt, so tritt sie unwiderruflich in die nächste Phase des Zellzyklus über (Malumbres et Barbacid, 2001). Es kommt zur Verdopplung der DNS in der S-Phase. Werden während dieser Zeit keine mitogenen Stimulantien oder gar antiproliferative Signale empfangen, geht die Zelle in einen Ruhezustand über (Evan et Vousden, 2001). Zellen, die nicht in die G0-Phase wechseln können, stoppen an sekundären Stellen des Zellzyklus und sterben (Pardee, 1974).

1.1.7 Deregulation der Kontrollpunkte

Eine Deregulation der Kontrollpunkte führt dazu, dass sich Zellen unabhängig von exogenen Wachstumssignalen teilen. Ursache für diesen Kontrollverlust können eine vermehrte Expression von positiven Schlüsselproteinen (Cycline) oder ein Funktionsverlust bzw. Unterexpression von negativen Regulatoren (CDK-Inhibitoren) sein (Sherr, 1996). In verschiedenen humanen Malignomen sind Defekte im Bereich des G1/S-Übergangs mit Tumorentwicklung und progression assoziiert (Orr-Weaver et Weinberg, 1998; Pestell et al., 1999). Dagegen werden Alterationen des G2/M-Kontrollpunktes selten gefunden (Molinari, 2000).

1.1.8 p27

P27 wird durch ein Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 12 kodiert. Neuordnungen, Deletion und Mutationen innerhalb des p27/ Kip1-Gens kommen sehr selten vor (Kawamata et al., 1995; Ponce-Castañeda et al., 1995). Daher reflektiert die p27-Expression in vivo seine inhibitorische Aktivität.

Im Zellzyklus findet sich ein enger Zusammenhang zwischen den einzelnen Regulatorproteinen. P27 kann mit Cyclin E/CDK2-Komplexen in Form von zwei Arten interagieren. Auf der einen Seite bindet es bevorzugt an Cyclin E/CDK2-Moleküle und steuert durch deren Inhibition den Eintritt in die S-Phase am R-Punkt (Steeg et Abrams, 1997). Zum anderen ermöglicht die Phosphorylierung von p27 an seinem Threonin 187-Rest durch Cyclin E-abhängige Kinasen seine Proteolyse (Slingerland et Pagano, 2000). Die Fähigkeit von p27 entweder als Inhibitor oder Substrat für CDK2-Holoenzyme zu fungieren, scheint von der umgebenden ATP-Konzentration abhängig zu sein (Sheaff et al., 1997).

Cyclin D/CDK-Komplexe dienen als Reservoir für p27. Neben der N-terminalen Region, die für die CDK-Inhibition verantwortlich ist, besitzt p27 eine C-terminale Domäne, mit der es in vitro direkt an Cyclin D1-Moleküle binden kann (Toyoshima et Hunter, 1994). In Abwesenheit von Mitogenen oder bei Einwirkung von antiproliferativen Substanzen, wie TGF- β , steigt nicht nur die p27-Synthese an, sondern p27 wird auch von Cyclin D/CDK-Komplexen mit deren Abbau freigesetzt und führt zum G1-Block (Reynisdottir et al., 1995).

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass p27-*Knockout*-Mäuse zur Entwicklung von Tumoren neigen (Nakayama et al., 1996). Die Unterexpression von p27 in verschiedenen Malignomen (Cheville et al., 1998; Takata et al., 1999; Wu et al., 1999; Ohashi et al., 1999; Kim et al., 2000; Hommura et al., 2000; Kapranos et al., 2001; Kamai et al., 2001; Shibata et al., 2001; Li et al. 2002; Migita et al., 2002), läßt vermuten, dass sein Verlust auch eine bedeutende Rolle bei der Tumorentstehung und -progression im menschlichen Organismus spielt.

1.1.9 Cyclin E

Cyclin E ist ein wichtiges Regulatorprotein des G1/S-Übergangs in Säugetierzellen. Es besteht aus 395 Aminosäuren und wird durch ein Gen auf dem Chromosom 19 kodiert (Donnellan et Chetty, 1999). In humanen benignen und malignen Schilddrüsentumoren (Lazzereschi et al., 1998) sowie in kolorektalen Karzinomen (Li et al., 2001) fanden sich keine Alterationen oder Amplifikationen des Cyclin E-Gens. Überexpression von Cyclin E ist also das Ergebnis translationaler und posttranslationaler Mechanismen.

Cyclin E hat eine onkogenähnliche Wirkung. Bei Nacktmäusen, die Cyclin E überexprimierten, konnte durch die Verwendung eines brustgewebsspezifischen Promotors die Entwicklung von Mammakarzinomen beobachtet werden (Bortner et Rosenberg, 1997). Im Tierexperiment veranlaßte somit die Transkription von Cyclin E die Entstehung von Krebszellen im Brustdrüsengewebe.

Onkogen transformierte Rattenschilddrüsenzellen, die unabhängig von TSH wachsen, zeigten eine Überexpression von Cyclin E verbunden mit einer erhöhten Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lazzereschi et al., 1998). Der molekulare Mechanismus der Cyclin E-vermittelten Tumorgenese ist aber noch nicht vollständig geklärt. Eine Hypothese beinhaltet, dass die onkogene Aktivität von Cyclin E sich auf seine Funktion als positiver Zellzyklusregulator gründet. Bei diesem Modell würde eine Cyclin E-Überexpression, gleichgesetzt mit einer hohen CDK2-Kinaseaktivität, zum Kontrollverlust und unablässiger Zellproliferation führen.

Cyclin E hat neben der G1/S-Steuerung noch andere Funktionen, die zur malignen Transformation beitragen können:

1. Cyclin E beeinflusst wahrscheinlich noch andere Kinasen, da die onkogene Wirkung nicht auf die Aktivierung von CDK2 beschränkt ist (Geisen et Möröy, 2002).
2. Im Gegensatz zu Cyclin D1 ist Cyclin E in der Lage, den G1/S-Übergang unabhängig von pRb und E2F zu steuern (Lukas et al., 1997).
3. Zu Beginn der S-Phase wird Nucleophosmin/B23 an seinem Threonin199-Rest durch Cyclin E/CDK2 phosphoryliert. Dadurch zerfällt die Zentrosom-Nucleophosmin-Bindung und die Zentrosom-Duplikation wird initiiert (Lacey et al., 1999; Okuda et al., 2000; Tokuyama et al., 2001).
4. Cyclin E spielt beim Mitoseaustritt eine Rolle (D'Angiolella et al., 2001).
5. Die Verbindung zwischen einer Überexpression von Cyclin E (Hedberg et al., 2002a) und Aneuploidie läßt vermuten, dass hohe Cyclin E-Spiegel einen potentiellen Einfluß auf die genetische Stabilität haben. Dabei resultiert die Chromosomensatzveränderung möglicherweise aus der Beeinflussung von Dauer und Genauigkeit der DNS-Replikation (Spruck et al., 1999).

6. Es wurden verschiedene splice-Varianten von Cyclin E identifiziert, denen die Proteinsequenz für die CDK-Interaktion fehlt (Keyomarsi et al., 1995).

Eine aberrante Expression von Cyclin E korreliert sowohl mit einem fortgeschrittenem Stadium als auch Malignitätsgrad und hat eine prognostische Bedeutung in vielen Tumoren (Nielsen et al., 1996; Porter et al., 1997; Scott et Walker, 1997; Erlanson et al., 1998; Del Pizzo et al., 1999; Kamai et al., 2001; Li et al., 2001; Mueller-Tidow et al., 2001; Hedberg et al., 2002a).

1.1.10 Cyclin D3

Das Cyclin D3-Gen ist auf dem Chromosom 6 lokalisiert (Xiong et al., 1992). Alle D-Cycline zeigen ähnliche Sequenzen, die Fähigkeit zur Aktivierung derselben CDK-Gruppen und können durch ihre N-terminale Region mit pRb interagieren (Weinberg, 1995). Trotz ihrer strukturellen Verwandtschaft gibt es Hinweise auf differente, gewebsspezifische Funktionen. Sie unterscheiden sich zum einen durch das Maximum ihrer m-RNS- und Protein-Expression während des Zellzyklus (Musunuru et Hinds, 1997a):

- Cyclin D1: frühe G1-Phase
- Cyclin D2: späte G1-Phase
- Cyclin D3: G1/S-Übergang

Zum anderen kommen hohe Cyclin D3-Spiegel seltener als eine Cyclin D1-Überexpression vor (Bartkova et al., 1996). Die fehlende Kopplung von Cyclin D1 und D3 hinsichtlich ihrer Beziehung zu Apoptose und Zellproliferation läßt ebenfalls auf verschiedene Rollen bei der Tumorprogression schließen (Wong et al., 2001). Während des Differenzierungsprozesses von Myoblasten fand sich eine starke Expression von Cyclin D3. Im Gegensatz dazu stieg der Cyclin D2-Spiegel nur vorübergehend an und das Cyclin D1-Level blieb konstant (Kiess et al., 1995). In einer anderen Studie wurde der Zellzyklusaustritt und die Differenzierung von Myeloblasten zu neutrophilen Granulozyten durch Cyclin D2- oder Cyclin D3-Überexpression gehemmt (Kato et Sherr, 1993).

Eine aberrante Expression von Cyclin D3 konnte in verschiedenen Karzinomen nachgewiesen werden (Mammakarzinome: Bartkova et al., 1996; Pankreas-karzinome: Ebert et al., 2001; kolorektale Karzinome: Watson et al., 1999).

1.2 Maligne Schilddrüsenneoplasien

1.2.1 Pathogenese und Einteilung der malignen Schilddrüsenneoplasien

Bei der Pathogenese von Schilddrüsentumoren spielen neben einer genetischen Disposition (Carlisle et McDougall, 2001) auch ionisierende Strahlung eine Rolle. Kinder, die beispielsweise aufgrund einer unspezifischen Lymphadenitis im Halsbereich radiologisch behandelt wurden, entwickelten dosisabhängig papilläre Schilddrüsenkarzinome (Schmid, 1998). Die Untersuchungen

von Williams (1994) zeigten, dass bei Kindern in Weißrußland und der nördlichen Ukraine nach der Reaktorkatastrophe von Tschernobyl vermehrt Schilddrüsenkarzinome, insbesondere PTC, auftraten. Auch präexistente Schilddrüsenerkrankungen wie Strumen und Knoten, die über viele Jahre bestehen, zählen zu den ätiologischen Faktoren (Reiners et Farahati, 1999).

Etwa 95% der bösartigen Schilddrüsentumoren sind Karzinome, von denen wiederum zwei Drittel den differenzierten Formen, wie dem papillären und dem follikulären Schilddrüsenkarzinom, zugeordnet werden. Undifferenzierte Karzinome machen einen Anteil von 5-10% aus (Pfannenstiel et Saller, 1992). Auf die medullären Schilddrüsenkarzinome und andere, seltener vorkommende Neoplasien in der Schilddrüse, soll in dieser Arbeit nicht eingegangen werden.

1.2.2 Papilläres Schilddrüsenkarzinom

Das von den Follikelzellen ausgehende papilläre Schilddrüsenkarzinom ist mit 50-80% der häufigste Schilddrüsentumor (Schmid, 1998). Es tritt bevorzugt bei jungen Menschen auf, 80% der Patienten sind unter 40 Jahren (Hoffmann et al., 1999). Im Gegensatz zum FTC und UTC ist das PTC durch langsames, häufig multifokales Wachstum charakterisiert (Rosai et al., 1992b). Die Tumorzellen formen sogenannte Papillen, d.h. sie bilden ein einreihiges Epithel um einen gefäßhaltigen Bindegewebsstock (Rosai et al., 1992b). Weitere histologische Merkmale sind die dachziegelartige Überlappung der Zellkerne sowie das Vorkommen von Edinger-Milchglaskernen und umschriebenen Verkalkungsherden im Zytoplasma, die als Psammomkörperchen bezeichnet werden (Hofstaedter, 2001). Die Metastasierung erfolgt lymphogen in die zervikalen und supraklavikulären Lymphknoten. Erst im Spätstadium kommt es zur hämatogenen Aussaat. Die mittlere 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 85-90% (Reiners et Farahati, 1999).

1.2.3 Follikuläres Schilddrüsenkarzinom

Follikuläre Schilddrüsenkarzinome entstammen wie die PTC den Thyreozyten und finden sich bevorzugt in Regionen mit endemischem Jodmangelstruma. Der Altersgipfel liegt bei 40-60 Jahren (Coburn et Wanebo, 1995). Sie zeichnen sich durch bindegewebige Abkapselung und ein invasives, oft bereits über die Organgrenzen hinausgehendes Wachstum aus. Histologisch stellt sich das FTC als organoide maligne Neoplasie mit soliden, mikrofollikulären oder trabekulären Wachstumsformen dar (Rosai et al., 1992a). Charakteristisch ist die schon früh auftretende hämatogene Metastasierung, hauptsächlich in Lunge und Skelettsystem (Schmid, 1998). Regionäre Lymphknoten sind seltener befallen. Minimal-invasive FTC zeigen eine bessere Prognose (10-Jahres-Überlebensrate: 97,6%) im Vergleich zu den hoch-invasiven FTC mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 66,7% (Chow et al., 2002).

1.2.4 Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom

Undifferenzierte oder anaplastische Schilddrüsenkarzinome treten hauptsächlich bei älteren Menschen über 55 Jahren auf (Coburn et Wanebo, 1995). Gleichzeitig vorkommende gut-differenzierte Karzinomareale in 35-55% der UTC-Schnitte lassen einige Autoren vermuten, dass diese Geschwulst von präexistenten gut-differenzierten Schilddrüsentumoren ausgeht (Ordonez et al., 1991; Venkatesh et al., 1990; Goerges, 2001). Es handelt sich um hochmaligne Tumoren, die rasch das perithyroidale Gewebe infiltrieren (Reiners et Farahati, 1999). Das mikroskopische Bild wird geprägt durch polymorphe Zellen mit ausgedehnten Nekrosen und zahlreichen Mitosen (Rosai et al., 1992c). Kennzeichnend ist die frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung (Hoffmann et al., 1999). Trotz Therapie sterben mehr als die Hälfte der Patienten mit diesem Tumor innerhalb der ersten 6 Monate nach Diagnosestellung an den Folgen des lokalen Tumorwachstums. Die 5-Jahres-Überlebensrate wird mit < 5% angegeben (Schmid, 1998).

1.2.5 pTNM-Klassifikation

Zur Definition der Stadien von Krebserkrankungen wurden Richtlinien von der Union Internationale Contre Le Cancer (UICC) festgelegt. Die Einteilung in die einzelnen Kategorien erfolgt nach Ergebnissen aus bildgebenden Verfahren und klinischer Untersuchung.

Für die Schilddrüse gilt folgende Klassifikation (Wittekind et al., 2002):

T	Primärtumor
T x	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T 0	kein Anhalt für Primärtumor
T 1	Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse
T 2	Tumor mehr als 2 cm, aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse
T 3	Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung, begrenzt auf die Schilddrüse oder mit minimaler extrathyroidaler Ausbreitung
T4	Tumor mit Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel und Invasion der umgebenden Gewebe
N	regionäre Lymphknoten
N x	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N 0	kein Anhalt für regionäre Lymphknotenmetastasen
N 1	regionäre Lymphknotenmetastasen

Die histologische Untersuchung nach selektiver Halsausräumung erfolgt an 6 oder mehr Lymphknoten. Wenn die Lymphknoten tumorfrei sind oder die Zahl der üblicherweise beurteilten Lymphknoten nicht erreicht wird, soll pN0 klassifiziert werden.

- M Fernmetastasen
- M x Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
- M 0 keine Fernmetastasen
- M 1 Fernmetastasen

1.3 Aufgabenstellung

P27, Cyclin E und Cyclin D3 haben eine Schlüsselrolle bei der Verbindung zwischen Wachstumssignalen, Passage des G1/S-Kontrollpunktes und Zellzyklusprogression.

Die p27-Expression nimmt von den normalen Thyreozyten, über die benignen Neoplasien bis hin zu den Karzinomen der Schilddrüse deutlich ab (Lloyd et al., 1997; Erickson et al., 2000; Troncone et al., 2000). Über die Assoziation des p27-Spiegels mit den Differenzierungsgraden von malignen Schilddrüsentumoren liegen sehr unterschiedliche Ergebnisse vor: Tallini et al. (1999) und Lloyd et al. (1997) fanden eine signifikante Differenz in der p27-Expression zwischen differenzierten (FTC und PTC) und undifferenzierten (UTC) thyroidalen Karzinomen. Untersuchungen von Resnick et al. (1998) ergaben maximale p27-Level in FTC, die über PTC bis hin zu UTC weiter abfallen. Dagegen wiesen Erickson et al. (1998) konkordante Werte zwischen den einzelnen Schilddrüsentumoren nach.

Die Expression von Cyclin E und Cyclin D3 in normalen und transformierten thyroidalen Geweben ist bisher kaum erforscht. Ähnliche Cyclin E-Spiegel wurden in follikulären Adenomen und follikulären Varianten von PTC ermittelt (Wang et al., 1998). Während in der Studie von Brzezinski et al. (2004) die Cyclin E-Expression mit dem T-Stadium von papillären Schilddrüsenkarzinomen korrelierte, beobachtete Motti et al. (2003) in Strumen nur teilweise eine Cyclin D3-Expression. Im Vergleich dazu zeigten die von ihnen untersuchten follikulären Adenome hohe Cyclin D3-Spiegel.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, weitere Kenntnisse über die Expression und Bedeutung dieser Zellzyklusfaktoren in der Schilddrüse zu gewinnen.

Vier Schwerpunkte lassen sich zusammenfassen:

1. Expression von p27, Cyclin E und Cyclin D3 in Schilddrüsenzelllinien (Westernblot)
2. Korrelation zwischen der Expression der Regulatorproteine und der Wachstumsrate der Schilddrüsenzelllinien (MTT-Test)

3. Expression von p27, Cyclin E und Cyclin D3 in normalen und malignen Schilddrüsengeweben (Westernblot) unter Berücksichtigung von:
 - pTNM-Stadium
 - Differenzierungsgrad
 - Vergleich zwischen Expression in Primärtumoren versus Metastasengeweben
4. Koexpression einzelner Zellzyklusproteine

Folgende Ausgangshypothesen können formuliert werden:

1. Da p27, Cyclin E und Cyclin D3 gemeinsam die Initiation der DNS-Replikation regulieren, müßte die Expression der untersuchten Zellzyklusproteine mit der Wachstumsrate in den Schilddrüsenzelllinien korrelieren.
2. Entsprechend des Zellzyklusverständnis ist von der höchsten p27-Expression in den nicht-transformierten Geweben auszugehen, die in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomgeweben (PTC, FTC) abnimmt und Minimalwerte in den undifferenzierten Schilddrüsentumoren erreicht, da diese durch ihr aggressives Wachstumsverhalten und die geringste Überlebensrate charakterisiert sind.
3. Basierend auf der Rolle von Cyclin E beim Proliferationsvorgang sowie aufgrund seiner vielfältigen Funktionen bei der malignen Transformation wären niedrige Cyclin E-Spiegel in den Normalgeweben im Vergleich zu den Schilddrüsentumoren zu erwarten. Dabei könnten sich die undifferenzierten Karzinome durch besonders hohe Cyclin E-Spiegel auszeichnen.
4. Cyclin D3 ist zusätzlich am Differenzierungsprozess beteiligt. Somit ist mit einer unterschiedlichen Expression des Zellzyklusproteins in Normalgeweben, differenzierten und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen zu rechnen.
5. Aufgrund der gegensätzlichen Aufgaben von p27 und Cyclin E bzw. Cyclin D3 im Zellzyklus müßte eine p27-Überexpression mit einer Cyclin E- oder Cyclin D3-Unterexpression und umgekehrt verbunden sein.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid PAGE 40%	Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden
Aprotinin	Sigma, Deisendorf
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Bromphenolblau, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dinatriumhydrogen-phosphat-hydrat	Riedel de Häen, Seelze
ECL-Substrat	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfort, UK
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGTA (Ethylenglykol-bis- (2-aminoethyl)-tetraessigsäure)	Sigma-Chemical, St. Louis, USA
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Glycerol 20%	Merck, Darmstadt
Glycin	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisendorf
Magermilchpulver	Bio-Rad, München
2-Mercapto-Ethanol	Sigma-Chemical, St. Louis, USA
Methanol 99%	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriumchlorid	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Deisendorf
Proteinbestimmungsakit	Bio-Rad, München
Proteinmarker für Westernblot	GibcoBRL, Paisley, Scotland
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Chemical, St. Louis, USA
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Triton x-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween 20 (<i>Polyoxyethylene Sorbitan Monolaureate</i>)	Serva Electrophoresis, Heidelberg

2.1.2 Zellkulturmaterialien

Antibiotika (Penicillin: 10.000 U/ml, Streptomycin: 10 mg/ml)	Biochrom, Berlin
DMEM/F12-Nährmedium	GibcoBRL, Paisley, Scotland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Deisendorf
FCS (fötale Kälberserum)	GibcoBRL, Eggenstein
HBSS (<i>Hank's Balanced Salts</i>)	Sigma-Aldrich, Irvine, UK
MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenol- Tetrazolium-Bromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA-Lösung (0,5g Trypsin + 0,2g EDTA/l)	GibcoBRL, Eggenstein

2.1.3 verwendete Antikörper für die Westernblot-Analyse

Primärantikörper:

Anti-p27: monoklonaler IgG-Antikörper (Maus) gegen humanes p27	PharMingen, San Diego, USA
Anti-Cyclin E: monoklonaler IgG- Antikörper (Maus) gegen humanes Cyclin E	Biotechnology, Santa Cruz, USA
Anti-Cyclin D3: monoklonaler IgG- Antikörper (Maus) gegen humanes Cyclin D3	Biotechnology, Santa Cruz, USA

Sekundärantikörper:

Anti-Maus-IgG aus Ziege, konjugiert mit HRP (<i>Horseradish Peroxidase</i>)	Promega, Madison, USA
----------------------------------------------------------------------------------	-----------------------

2.1.4 Hilfsmittel und Dokumentationsmaterial

Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf-Netheter-Hinz, Hamburg
Frischhaltefolie	Melitta, Minden
Gewebekulturflaschen (Bodenfläche 75, 175 cm ²)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Hyperfilm-MP	Amersham Bioscience, Little Chalfort, UK
Mikrotiterplatten 96 Well	Laborfachhandel, Leipzig
Nitrocellulosemembran Hyband-P (Porengröße 0,45 µm)	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfort, UK
Zentrifugen-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen

2.1.5 Geräte

CO ₂ -Inkubator Biocenter	Heraeus, Gera
ELISA-Reader Rainbow	SLT, Crailsheim
Micro-Dismembrator S	B. Braun Biotech, Melsungen
Inkubator PersonalHyp	Stratagene, La Jolla, USA
Kühlzentrifuge Biofuge primo R	Heraeus, Gera
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Minigelkammer Protean II	Bio-Rad, München
Pipettierhilfe Eppendorf Multipette plus	Eppendorf-Netheter-Hinz, Hamburg
Reinraumwerkbank	Heraeus, Gera
Schüttler	Labortechnik, Burgwedel
Spannungsquelle	Biometra, Göttingen
Transferkammer	Biometra, Göttingen
Waage	Sartorius Basic, Göttingen
Zentrifuge Rotanta/RP	Hettich, Tuttlingen

2.2 Patientengewebe

Die Schilddrüsengewebe stammen von Patienten, die zur Operation ihres Tumors aus klinischer Indikation in die Allgemeinchirurgie des Universitätsklinikums Halle kamen. Voraussetzung für die Verwendung des Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen war das Einverständnis des Patienten und die Genehmigung durch die Ethik-Kommission der medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität.

Die Gewebeproben wurden im Rahmen der Operation entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert. Anhand von histopathologischen Befunden erfolgte die Klassifikation durch das Pathologische Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. In Tabelle 1 sind die untersuchten Schilddrüsengewebe zusammengestellt.

Tabelle 1: Patientenmaterial

Gewebetyp	Patienten	Histologie
Normalgewebe	5	nicht-involvierte Gewebe von karzinomhaltigen Schilddrüsen
PTC	15	gut-differenzierte papilläre Schilddrüsenkarzinome (Primärtumoren)
	5	Lymphknotenmetastasen von papillären Schilddrüsenkarzinomen
	1	Lungenmetastase eines papillären Schilddrüsenkarzinoms
FTC	14	gut-differenzierte follikuläre Schilddrüsenkarzinome (Primärtumoren)
	2	Lymphknotenmetastasen von follikulären Schilddrüsenkarzinomen
UTC	13	undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome (Primärtumoren)
	2	Lymphknotenmetastasen von undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen

2.3 Zelllinien

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Schilddrüsenzelllinien verwendet:

FTC 133

Die Zelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase eines 42-jährigen Patienten entwickelt, der an einem metastasierten follikulären Schilddrüsenkarzinom operiert worden war. Die Zellen bilden noch Thyreoglobulin und besitzen intakte EGF- und TSH-Rezeptoren (Goretzki et al., 1990).

FTC 238

Diese Zelllinie entstammt einer Lungenmetastase des gleichen Patienten, von dem die Zelllinie FTC133 etabliert wurde.

UTC C643

Die Zelllinie wurde aus einer Feinnadelbiopsie-Probe eines 76-jährigen Patienten mit undifferenziertem Schilddrüsenkarzinom entwickelt. Der Patient starb 5 Monate nach Diagnosestellung. Die Zelllinie zeichnet sich durch verschiedene Abnormalitäten, u.a. eine erhöhte Chromosomenzahl, aus (Heldin et al., 1988).

UTC 8505C

Die Zelllinie wurde aus einem Primärtumor einer 78-jährigen Patientin gewonnen. Histologisch handelte es sich aufgrund des hohen Anteils von undifferenzierten Zellen um ein undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom mit papillären Strukturen (Ito, 1994).

2.4 Zellkultivierung

2.4.1 Kulturmedium

Als Nährmedium diente DMEM/12 mit 10% fötalem Kälberserum (FCS), das vor Gebrauch bei 56°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert wurde. Durch den Zusatz von Serum erhalten die Zellen wichtige Hormone, Bindungs- und Anheftungsfaktoren (Fibronektin) sowie Wachstumsfaktoren (Lindl et Bauer, 1989). Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,2-7,3 erfolgte die sterile Filtration des Kulturmediums. Um eine bakterielle Kontamination zu vermeiden, wurden dem Medium pro Liter 10ml Antibiotika-Lösung (Penicillin: 10.000 U/ml, Streptomycin: 10 mg/ml ad aqua dest.) beigefügt.

Alle zellbiologischen Arbeiten fanden in einer Reinraumwerkbank mit vertikaler Luftströmung statt. Jedem Arbeitsgang ging eine Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion mit 70%igem Ethanol voraus.

2.4.2 Stammhaltung und Passagierung

Die verwendeten Schilddrüsenzelllinien lagerten in Kryoröhrchen unter flüssigem Stickstoff. Zur Kultivierung wurden die Zellen mit warmem Medium aufgetaut, abzentrifugiert und in einem definierten Volumen Kulturmedium resuspendiert. Durch diesen Vorgang konnte das Dimethylsulfoxid (DMSO) ausgewaschen werden, das beim stufenweisen Einfrieren der Zellen ihre Zerstörung durch Eiskristalle verhindert. Um Zellen in einer bestimmten Dichte aussäen zu können, muß die Zellzahl bestimmt werden. Dafür wurde ein Aliquot der Zellsuspension in ein Hämozytometer nach Neubauer gegeben und unter dem Mikroskop vier Großfelder ausgezählt (Lindl et Bauer, 1989). Die Beimpfung einer Gewebekulturflasche mit 75cm² Bodenfläche erfolgte in der Regel mit 5 x 10⁵ Zellen/ml. Alle Zelllinien wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert. Da die Zellen in vitro einer dichteabhängigen Wachstumshemmung unterliegen, mußten die Zellen beim Erreichen einer konfluenten Monolayer-Schicht gesplittet werden.

Mittels Trypsin/EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Boden abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Trypsinwirkung durch serumhaltiges Medium gestoppt. Durch das Zentrifugieren setzten sich die Zellen in Form eines Pellets ab. Das überschüssige Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen in einem definierten Mediumvolumen resuspendiert und gezählt. Die weitere Passagierung erfolgte in Gewebekulturflaschen mit 75 oder 175cm² Bodenfläche. Erst Zellen der 3. Passage wurden für Versuchszwecke verwendet, um mögliche Proliferationsartefakte durch die Kryokonservierung ausschließen zu können.

2.5 MTT-Test

2.5.1 Prinzip

Es handelt sich hierbei um einen Proliferationstest. MTT ist ein farbloses Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenol-Tetrazolium-Bromid), das in den Zellen durch mitochondriale Dehydrogenasen in wasserunlösliches Formazan reduziert wird. Die optische Dichte des violetten Farbstoffes verhält sich dabei direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen und korreliert mit deren Stoffwechselaktivität (Mosmann, 1983).

2.5.2 Bestimmung der Wachstumskinetiken mittels MTT-Test

Die Schilddrüsenkarzinomzellen wurden wie beim Splitten durch Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden abgelöst, in serumhaltigem Medium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurde jede Vertiefung der Mikrotiterplatten mit einer Zelldichte von $2,5 \times 10^4$ /ml beimpft.

Insgesamt wurden 3 Platten mit je 12 Well/ Zelllinie angelegt und bei 37°C im Brutschrank unter standardisierten Bedingungen inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Abnahme des Zellüberstandes und Zugabe von 200 µl Leermedium (DMEM/F12 ohne FCS) pro Well, das täglich gewechselt wurde. Ein MTT-Test fand nach 24, 48 und 72 Stunden statt. Dazu wurde eine Mikrotiterplatte aus dem Brutschrank genommen und in jede Kultur 20 µl MTT-Lösung (25 mg MTT ad 5 ml HBSS) pipettiert. Während der 4-stündigen Inkubation reagierte das MTT durch enzymatische Katalyse zu Formazan. Nach Absaugen des MTT-Leermediums wurde das auskristallisierte Formazan-Produkt mit DMSO gelöst. Die Bestimmung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm mit Hilfe eines ELISA-Readers. Von allen 12 Meßwerten pro Zelllinie wurde der Mittelwert gebildet.

2.6 Westernblot

2.6.1 Proteingewinnung

Für die Proteinisolation wurde ein Proteinextraktions-Puffer folgender Zusammensetzung verwendet:

150 mM Natriumchlorid
20 mM Tris-HCl pH = 7,5
0,5 mM EDTA pH = 8,0
0,5 mM EDTA pH = 7,5
0,5% Triton x-100
ad aqua dest.

Tabelle 2: Zusatz von Proteaseinhibitoren

Proteaseinhibitor	Konzentration
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	1 mM
Leupeptin	25 µg/ml
Aprotinin	25 µg/ml

Alle Arbeitsvorgänge fanden unter Eiskühlung statt. Die kultivierten Schilddrüsenkarzinomzellen wurden zunächst abzentrifugiert, das überschüssige Medium vorsichtig abgesaugt und die Zellen wieder in PBS-Puffer gelöst. Nach erneuter Zentrifugation erfolgte die Resuspension der Pellets in Proteinextraktions-Puffer. Dieser enthielt Inhibitoren in der oben angegebenen Konzentration (Tabelle 2), um die beim Auftauen aktivierten proteolytischen Enzyme zu hemmen. Es wurden jeweils 200 µl Zellsuspension pro Zelllinie für die Proteingewinnung verwendet.

Nach der Homogenisierung der Schilddrüsengewebe erfolgte die Lösung des gewonnenen Pulvers in jeweils 300 µl Proteinextraktions-Puffer. Der gesamte Inhalt mußte in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und 30 Minuten in Eis gestellt werden. Anschließend wurden die Proben in eine Kühlzentrifuge transferiert und bei 4°C und einer Umdrehungszahl von 1500 U/ min zentrifugiert. Nach 30 Minuten hatten sich die Proteine im Überstand angereichert. Die Flüssigkeit über dem Pellet wurde vorsichtig abpipettiert, in ein anderes Eppendorf-Röhrchen überführt und jeweils 5 µl dieser Polypeptidlösung für die Proteinvermessung gesondert aufbewahrt. Bei -20°C erfolgte dann die Lagerung der Eiweißlösungen.

Direkt nach der Präparation wurden die Proteinlösungen vermessen. Alle Arbeitsvorgänge fanden auch hier unter Eiskühlung statt. Zunächst mußte eine Verdünnungsreihe für die Bestimmung der Eichkurve hergestellt werden.

Tabelle 3: Pipettierschema für Verdünnungsreihe

	pipettiertes Volumen
0,2 mg/ml	1 µl 1%ige BSA-Lsg + 49 µl Proteinextraktions-Puffer mit Inhibitoren
0,5 mg/ml	2,5 µl 1%ige BSA-Lsg + 47,5 µl Proteinextraktions-Puffer mit Inhibitoren
1 mg/ml	5 µl 1%ige BSA-Lsg + 45 µl Proteinextraktions-Puffer mit Inhibitoren
1,5 mg/ml	7,5 µl 1%ige BSA-Lsg + 42,5 µl Proteinextraktions-Puffer mit Inhibitoren
2 mg/ml	10 µl 1%ige BSA-Lsg + 40 µl Proteinextraktions-Puffer mit Inhibitoren

Tabelle 3 verdeutlicht die dafür erforderlichen Proteinkonzentrationen. Die Proben und Standard-Lösungen wurden auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Zur schnellen Quantifizierung kleiner Proteinmengen eignet sich die Methode nach Bradford (1976). Dazu wurden Substanz S und Substanz A des Proteinbestimmungskits nach Anweisung des Herstellers gemischt und 25 µl dieser Arbeitsreagenz in jede Vertiefung gegeben. Anschließend mußten 200 µl Reagenz B pro Well so zupipettiert werden, dass keine Luftblasen entstanden. Nach 15 Minuten erfolgte die Messung der Extinktion mit Hilfe eines ELISA-Readers. Durch die Regressionsgleichung der Eichkurve konnten dann die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben berechnet werden.

2.6.2 Herstellung der SDS-Gele

Tabelle 4: Pipettierschema für SDS-Polyacrylamidgele

	Sammelgel (4%)	Trenngel (10%)
Sammelgel-/ Trenngel-Puffer	630 µl	3,8 ml
40% Acrylamid	620 µl	3,75 ml
SDS-Stammlösung	50 µl	150 µl
APS-Stammlösung	50 µl	150 µl
TEMED	5 µl	6 µl
aqua dest.	3,6 ml	7,1 ml

Sammelgel-Puffer: 1 M Tris-HCl pH = 6,8
 Trenngel-Puffer: 1,5 M Tris-HCl pH = 8,8
 SDS-Stammlösung: 10% ad aqua dest.
 APS-Stammlösung: 10% ad aqua dest. (frisch angesetzt)

Für zwei Minigele wurden die in Tabelle 4 zusammengestellten Ansätze pipettiert und zwischen zwei Glasplatten gegeben, die an beiden Seiten durch 1 mm dicke *Spacer* getrennt wurden. Unter Zugabe von APS und TEMED kommt es bei Raumtemperatur zur Vernetzung von monomerem Acrylamid. Die Übersichtungung mit aqua dest. verhinderte das Eindringen von Luftsauerstoff während der Polymerisation. Nach 30 Minuten wurde das überstehende aqua dest. verworfen und das Sammelgel nach demselben Prinzip gegossen. Das Einfügen eines Kammes zwischen die Glasplatten ermöglichte die Bildung von Taschen mit je ca. 50 µl Inhalt. Nach Erstarrung des Sammelgels konnten die Kämmen entfernt werden.

2.6.3 Probenauftragung und Elektrophorese

Elektrophorese-Puffer (Laemmli-Loading-Puffer) -Stammlösung:

125 mM Tris-HCl pH = 6,8

4% SDS

20% Glycerol

2% Bromphenol

10% 2-Mercapto-Ethanol

ad aqua dest.

Elektrophorese-Puffer (Laemmli-Loading-Puffer):

Die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10 mit aqua dest. verdünnt.

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht sowie den Vergleich mit geeigneten Markerproteinen bekannter Größe.

Vor dem Auftragen der Polypeptidlösungen erfolgte ihre Denaturierung im Wasserbad bei 93°C für 5 Minuten mit anschließender Schockgefrierung. In die erste Tasche des Gels wurde jeweils 10 µl der Markerproteinlösung und in die restlichen Vertiefungen die Probenlösungen gegeben (Abbildung 3). Dabei betrug die Menge des zu untersuchenden Proteins 50 µg pro Spur. Außerdem wurde bei jedem Gel eine Positivkontrolle (Lysat der Zelllinie HT29) mitgeführt. Die zwei gelenthaltenden Glasplatten wurden in die Elektrophoreseapparatur eingehängt, so dass zwei voneinander getrennte Kammern entstanden. Beide Kammern mußten mit Laemmli-Loading-Puffer aufgefüllt werden. Bei der Methode nach Laemmli (1970) wandern negative, mit SDS beladene Proteine in Polyacrylamidgelen innerhalb eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Feldes zur Anode. Während der 1½ bis 2-stündigen Elektrophoresedauer betrug die Stromstärke 35 mA. Die PAGE wurde gestoppt, bevor die vor den Substanzen laufende Bromphenolblaulinie das Gel verließ. Aufgrund ihrer Größendifferenz wandern die Eiweiße mit unterschiedlicher Geschwindigkeit (kleine schnell, große langsam) und trennen sich daher in verschiedene Banden auf.

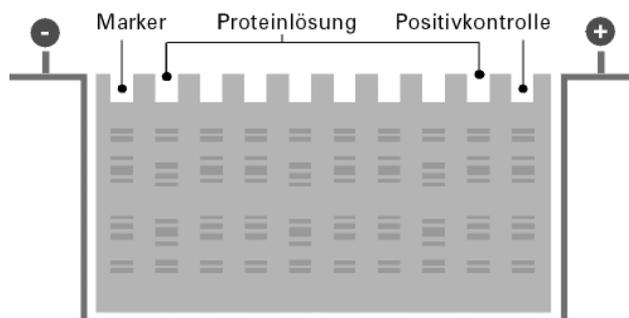


Abbildung 3: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.6.4 Semidry Blotting

Transfer-Puffer:

24,8mM Tris

186,5mM Glycin

20% Methanol

ad aqua dest.

Als Blotting bezeichnet man den Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Oberfläche einer immobilisierten Nitrocellulose-Membran. Bei diesem Vorgang werden die Eiweiße durch nicht-kovalente Wechselwirkungen an die Membran gebunden und dadurch für Antikörper-Nachweisreaktionen zugänglich gemacht (Jacobson, 1994).

Filterpapiere und Nitrocellulose-Membran wurden auf die Größe der zu blottenden Gele zugeschnitten. Durch Markierung der Gele und der Blot-Membran ließen sich Verwechslungen der Proteinlaufrichtungen ausschließen. Während der nachfolgenden Arbeitsvorgänge wurde die Membran vorsichtig mit einer Pinzette an den Rändern angefaßt, um Verfälschungen des Ergebnisses durch mechanischen Druck oder Hautproteine zu verhindern. Nach dem Sandwich-Aufbau (Abbildung 4) wurden die Gele auf die Membran gelegt und ohne Einschluß von Luftblasen zwischen Transfer-Puffer-getränkte Filterpapiere plaziert. Der Transfer-Puffer erzielte eine ausreichende Sättigung. Zusätzlich wurde durch das in ihm enthaltene Methanol die Membranbindungsfähigkeit erhöht. Der Elektrotransfer erfolgte zwischen zwei Graphitplatten mit hoher Leitfähigkeit und dauerte bei konstanter Stromstärke, die der Fläche der zu blottenden Gele entsprach, 25-30 Minuten. Maximal vier Gele konnten gleichzeitig übertragen werden.



Abbildung 4: Sandwich-Aufbau beim Semidry Blotting

2.6.5 Reversible Färbung mit Ponceau S

Ponceau-Lösung:

6mM Ponceau S

1% Essigsäure

ad aqua dest.

Die vollständige Reversibilität der Methode (Salinovich et Montelaro, 1986) ermöglichte die schnelle Überprüfung des kompletten Proteintransfers vor der Immundetektion (De Mario, 1994).

Dazu wurde die Nitrocellulose-Membran für 5 Minuten in Ponceau S-Lösung gefärbt und anschließend mit Methanol wieder entfärbt, bis klare Proteinbanden vor schwachem Hintergrund zu sehen waren. Nach Dokumentation der Bandenmuster wurde die Blot-Membran bis zur Weiterbearbeitung bei + 4°C, in Frischhaltefolie verpackt, aufbewahrt.

2.6.6 Behandlung der Membran mit Antikörpern

PBS-Puffer (*Phosphat Buffered Saline*) -Stammlösung pH = 7,4:

1,4M Natriumchlorid
26,9mM Kaliumchlorid
42,7mM Dinatriumhydrogen-phosphat-hydrat
11,5mM Kaliumhydrogenphosphat
ad aqua dest.

PBS-T-Puffer:

Die Stammlösung wurde im Verhältnis 1:10 mit aqua dest. verdünnt und 1 ml Tween 20 pro Liter zupipettiert.

Blockerlösung:

2,5% BSA (Rinderserumalbumin)
2,5% Magermilchpulver
ad PBS-T-Puffer

Um eine spezifische Antikörperbindung an das Epitop zu gewährleisten, müssen überschüssige Polypeptidbindungsstellen der Nitrocellulose-Membran blockiert werden (Van Dam, 1994). Dazu wurde eine Proteinlösung aus Rinderserumalbumin und Magermilchpulver in der oben angegebenen Konzentration verwendet. Die Nitrocellulose-Membran mußte mit ausreichend Blockerlösung für 1 Stunde überschichtet werden.

Zur Immundetektion wurden die Antikörper jeweils in einer Gebrauchsverdünnung von 1:1000 ad Blockerlösung und PBS-T-Puffer im Verhältnis 1:5 eingesetzt. Zuerst erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, der an das nachzuweisende Protein bindet (Abbildung 5). Die Inkubationszeit betrug bei 22°C 1 Stunde.

Danach wurde die Nitrocellulose-Membran 4 x je 10 Minuten in einer Färbewanne mit PBS-T-Puffer gewaschen. Auf diese Weise konnten die überschüssigen, nicht spezifisch gebundenen Antikörper entfernt werden. Alle Waschvorgänge fanden auf einem Schüttler bei moderater Schüttelgeschwindigkeit und Raumtemperatur statt. Der PBS-T-Puffer wurde nach jedem Waschschrift verworfen.

Nach erneuter Blockierung (wie oben) für 30 Minuten begann bei 22 °C die Inkubation mit dem Zweit-Antikörper, der mit einem Enzym (Peroxidase) gekoppelt ist. Dieser markierte Sekundärantikörper bindet an die Antigen-Antikörper-Komplexe (Abbildung 6). Nach weiteren 30 Minuten wurde wieder gewaschen (4 x 10 Minuten, wie oben). Nun war an den Stellen, wo sich das nachzuweisende Protein befand, die Peroxidase über die beiden Antikörper fest gebunden.

2.6.7 Chemilumineszenz

In der vorliegenden Arbeit wurden die gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe durch *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) nachgewiesen. Dabei löst die spezifisch gebundene Peroxidase beim Umsatz des Substrates eine Lichtemission aus, die zu einer Farbreaktion führt (Durrant et Fowler, 1994).

Das Chemilumineszenz-Substrat wurde nach Anweisung des Herstellers gemischt und die Membran für einige Minuten überschichtet. Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurde die Nitrocellulose-Membran mit Frischhaltefolie versiegelt und anschließend einem Röntgenfilm exponiert. Die Photonen, die bei der enzymatischen Reaktion entstanden, schwärzten den Film an den Stellen der Immunkomplexe (Abbildung 7). Unterschiedlich lange Belichtungszeiten garantierten die Dokumentation von starken Banden als auch schwächeren Signalen.



Abbildung 5: Inkubation mit dem Primärantikörper



Abbildung 6: Inkubation mit dem Sekundärantikörper

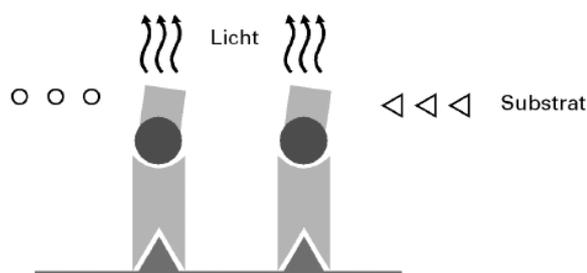


Abbildung 7: Chemilumineszenz

2.6.8 Auswertung

Tabelle 5: Zellzyklusproteine und ihr spezifisches Molekulargewicht

Zellzyklusprotein	Molekulargewicht in Kilo-Dalton
p27	18-29 kDa
Cyclin E	50-55 kDa
Cyclin D3	30-46 kDa

Anhand der Markerproteine wurde die molare Masse der Banden bestimmt. Jeder Antikörper hat als Glykoprotein ein spezifisches Molekulargewicht, so lässt sich das gesuchte Eiweiß (z.B. Cyclin E) anhand des an ihm gebundenen Antikörpers identifizieren. Tabelle 5 zeigt die einzelnen Zellzyklusproteine und ihr Molekulargewicht.

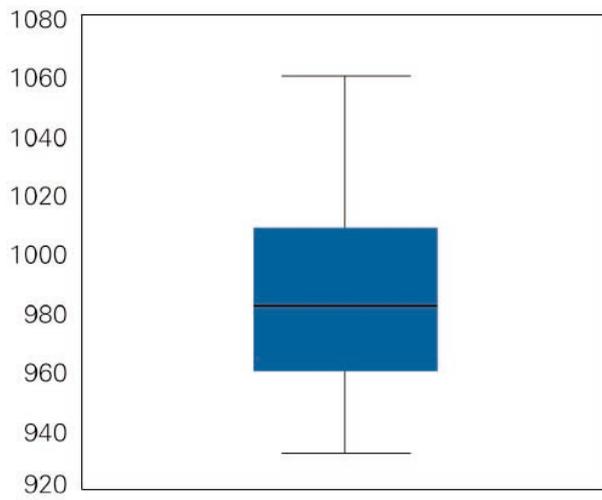
Die densitometrische Bestimmung der Bandenintensität wurde mit Hilfe des Computerprogramms Kodak Digital Science 1D 3.02 vorgenommen.

2.7 Statistische Auswertung

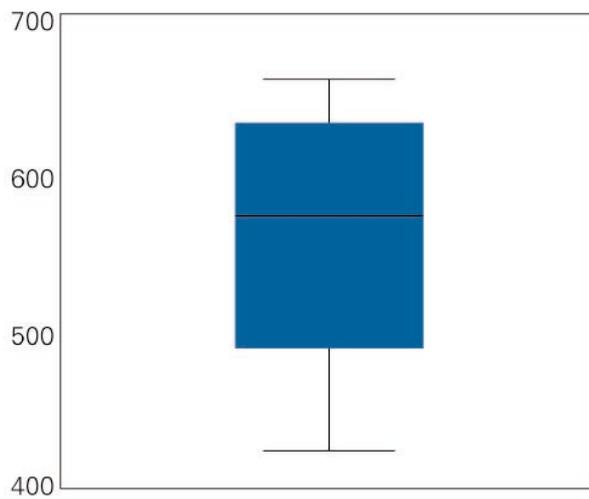
Nach dem Modell von Lloyd et al. (1997) diente eine konstante Polypeptidmenge der kolorektalen Zelllinie HT29 als Positivkontrolle für die Immunoblot-Analyse. Von allen Absorptionswerten der Positivkontrolle für ein bestimmtes Zellzyklusprotein (Abbildung 8) wurde der Mittelwert gebildet und 100% gesetzt. Die Expressionszahlen der untersuchten Schilddrüsenzelllinien und -gewebe werden nachfolgend in Prozent bezogen auf die Positivkontrolle angegeben.

Anhand der Cyclin D3-Spiegel in den Tumorgeweben war durchschnittlich von einer Schwankung der Probenexpression von 25% gegenüber der Positivkontrolle auszugehen. Daher wurden Werte über 125% bezogen auf die Positivkontrolle als Überexpression definiert.

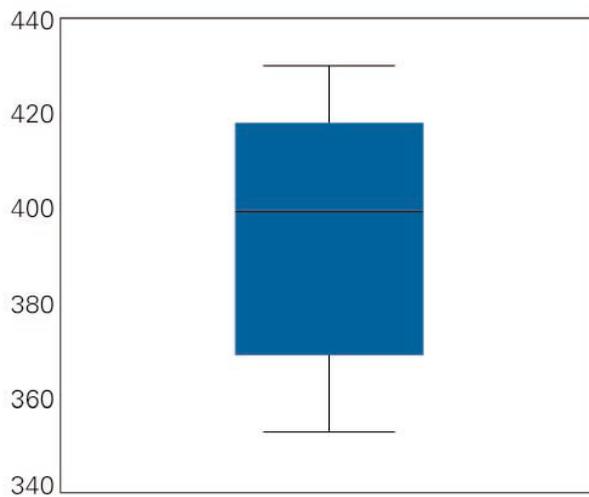
Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson gab Auskunft über die Assoziation zwischen Wachstumsrate und Bandenstärke der Regulatorproteine in den Schilddrüsenzelllinien. In Vierfeldertafeln (χ^2 -Test) wurde die Zellzyklusproteinexpression in den Schilddrüsengeweben jeweils mit dem pTNM-Stadium, Differenzierungsgrad und Primärtumoren versus Lymphknotenmetastasen verglichen. Für die Bestimmung der Koexpression der untersuchten Zellzyklusproteine fand der U-Test nach Mann und Whitney Anwendung. P-Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SPSS 10.0.



Expression von p27



Expression von Cyclin E



Expression von Cyclin D3

Abbildung 8: Beschreibung der Variabilität der Expressionswerte der Positivkontrolle

3 Ergebnisse

3.1 Schilddrüsenzelllinien

3.1.1 Wachstumskinetiken (MTT-Test)

Die Schilddrüsenzelllinien unterschieden sich in ihrem Proliferationsverhalten (Abbildung 9). Anhand des Anstiegs der Wachstumskurve wurde die Teilungsrate pro Stunde ermittelt.

Die folliculäre Zelllinie FTC 133 wies mit 115 mal pro Stunde die höchste Proliferationsrate auf. FTC 238-Zellen replizierten sich nur 90 mal in 60 Minuten. Vergleicht man das Wachstum der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen untereinander, zeigte sich eine Teilungsrate von 62,5 mal pro Stunde in UTC C643 und 45 mal pro Stunde in UTC 8505C. Somit hatte UTC 8505C die langsamste Wachstumskinetik der untersuchten Schilddrüsenzelllinien.

Insgesamt fand sich eine höhere Proliferationsrate in folliculären gegenüber undifferenzierten Schilddrüsenzelllinien. Dabei teilten sich FTC 238-Thyreozyten doppelt so schnell wie UTC 8505C-Zellen. FTC 133-Thyreozyten replizierten sich rund 63 mal innerhalb von 33 Minuten, während UTC C643-Zellen dafür etwas mehr als eine Stunde benötigten.

Konfluenz in den Wells wurde bei keiner der Schilddrüsenzelllinien nach 72 Stunden beobachtet.

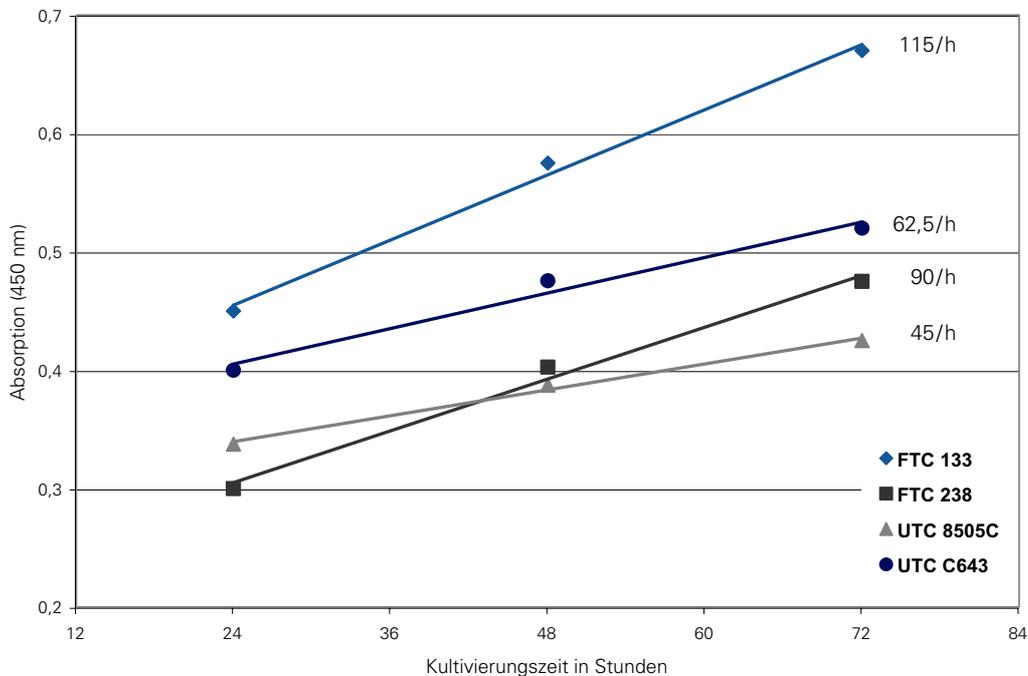


Abbildung 9: Wachstumskinetik der Schilddrüsenzelllinien

3.1.2 Expression von p27, Cyclin E, Cyclin D3 in Schilddrüsenzelllinien

Die Expressionsergebnisse der einzelnen Zellzyklusproteine sind in Abbildung 10 zusammengefaßt.

FTC 133, UTC C643 und UTC 8505C zeigten eine starke Reaktion auf den p27-Antikörper (Abbildung 10a). Weiterhin ließ sich bereits auf dem Film die zarte Bande der Schilddrüsenzelllinie FTC 238 erkennen. Wie in der graphischen Übersicht (Abbildung 10b) dargestellt, ergaben sich Expressionszahlen von mehr als 50% bezogen auf die Positivkontrolle für die Schilddrüsenzelllinien FTC 133, UTC C643 und UTC 8505C. Dabei wurde der höchste p27-Spiegel in FTC 133 mit fast 90% der Positivkontrolle ermittelt. Im Gegensatz dazu betrug die p27-Expression in FTC 238 nur etwa ein Viertel der Positivkontrolle.

Die untersuchten Schilddrüsenzelllinien wiesen ein unterschiedliches Expressionsverhalten für Cyclin E auf (Abbildung 10a). Eine stärkere Bande konnte nur in den folliculären Schilddrüsenzelllinien beobachtet werden. Bezogen auf die Positivkontrolle wurden in FTC 133 Expressionswerte von 73%, in FTC 238 von 57%, in UTC C643 von 44% und in UTC 8505C von rund 28% gemessen. Das Säulendiagramm in Abbildung 10b verdeutlicht den nahezu linearen Abfall der Cyclin E-Expression von der Schilddrüsenzelllinie FTC 133 über FTC 238 und UTC C643 bis hin zu UTC 8505C.

Ähnlich den Cyclin E-Spiegeln unterschieden sich die Schilddrüsenzelllinien in ihrer Cyclin D3-Expression (Abbildung 10a). Die schwächste Expression von Cyclin D3 wurde in UTC 8505C detektiert. Dagegen fand sich in FTC 133 eine Bandenintensität, die mit der Reaktionsstärke der Positivkontrolle vergleichbar war. Tatsächlich wurden bei der densitometrischen Auswertung identische Expressionswerte für die Positivkontrolle und FTC 133 bestimmt. Die Schilddrüsenzelllinien FTC 238 sowie UTC C643 zeigten Cyclin D3-Spiegel von 85% und 71% der Positivkontrolle. Während die Cyclin D3-Expression in UTC 8505C nur ein Drittel der Positivkontrolle erreichte. Die Deszendenz der Cyclin D3-Expression von der Schilddrüsenzelllinie FTC 133 über FTC 238 und UTC C643 bis hin zu UTC 8505C wird auch hier durch die Abbildung 10b hervorgehoben.

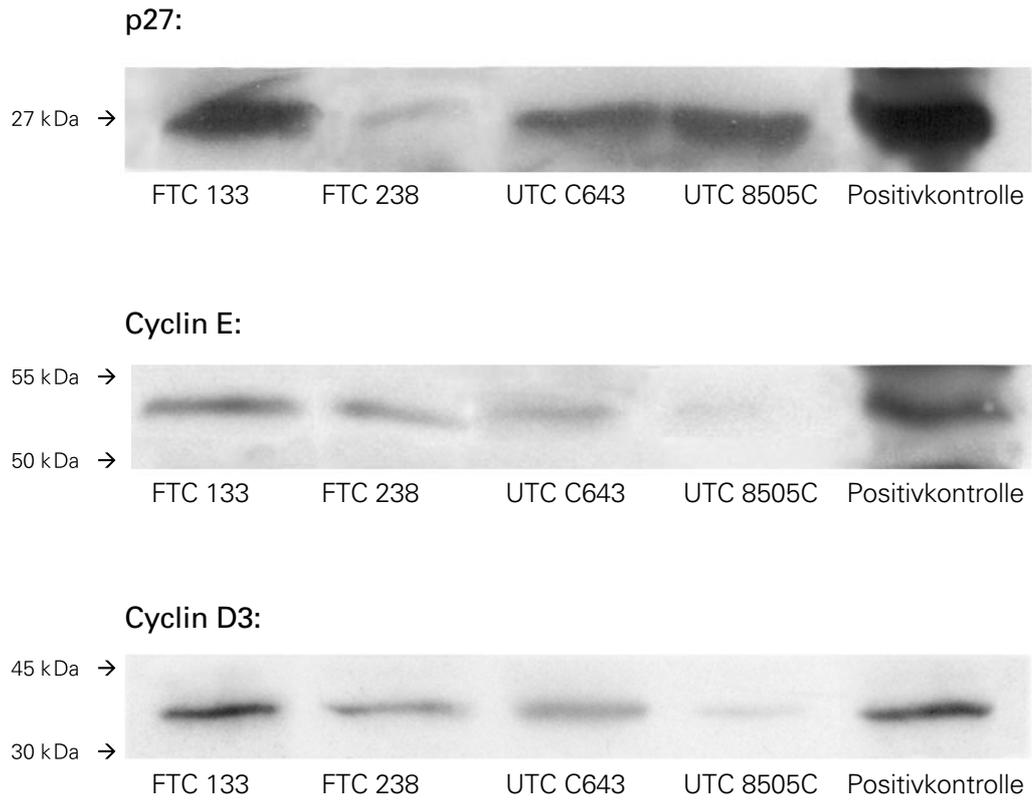


Abbildung 10a: Westernblot-Analyse der Expression von p27, Cyclin E, Cyclin D3 in Schilddrüsenzelllinien

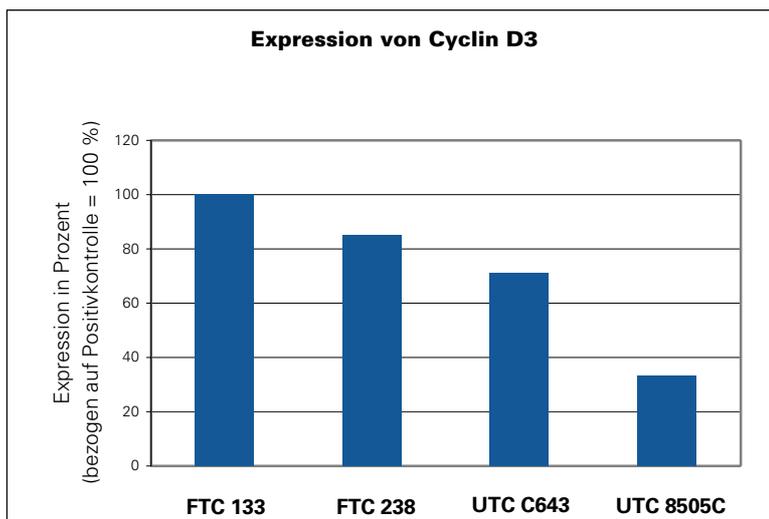
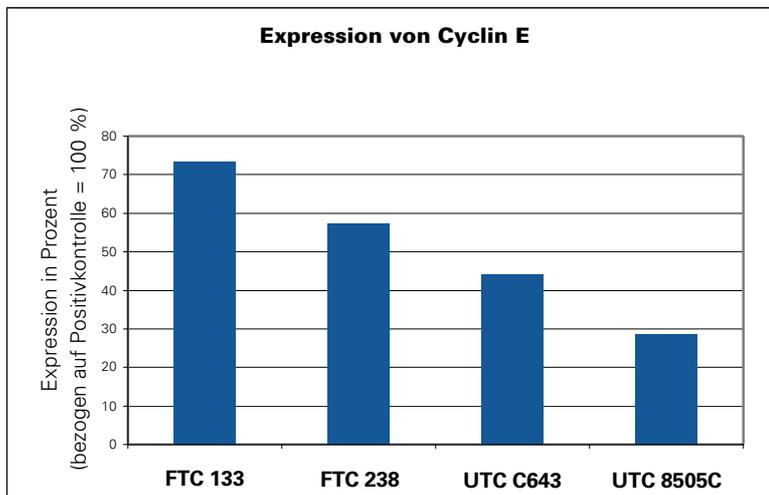
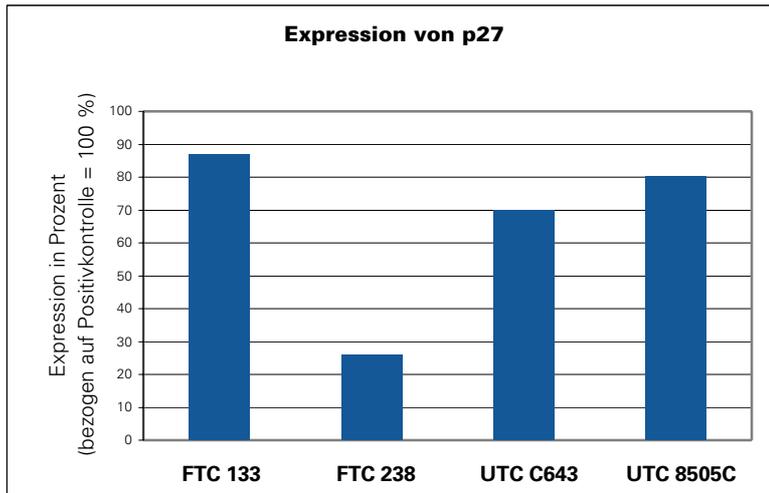


Abbildung 10b: graphische Darstellung der Expression von p27, Cyclin E, Cyclin D3 in Schilddrüsenzelllinien

3.1.3 Assoziation zwischen Expression der Zellzyklusregulatoren und der Wachstumsrate in Schilddrüsenzelllinien

Um den Merkmalszusammenhang zwischen Wachstumskinetik und Expression von p27, Cyclin E und Cyclin D3 zu untersuchen, wurden die gemessenen Werte in je einem Diagramm für jedes Zellzyklusprotein dargestellt (Abbildung 11). Zusätzlich erfolgte die Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson (k).

Bei der Schilddrüsenzelllinie FTC 238 führte das vergleichsweise geringe Vorkommen von p27 nicht zu einer Zunahme der Proliferation. Umgekehrt ging ein p27-Spiegel über 50% der Positivkontrolle in FTC 133, UTC C643 und UTC 8505C nicht mit einer erhöhten Replikationsrate einher. Die Expression von p27 war somit nicht mit der Wachstumsrate der Schilddrüsenzelllinien assoziiert ($p = 0,454$).

Dagegen hatte eine hohe Expression von Cyclin E und Cyclin D3 in den follikulären Schilddrüsenzelllinien einen Anstieg der Proliferationsrate zur Folge. Die undifferenzierten Schilddrüsenzelllinien wiesen entsprechend ihrer niedrigeren Cyclin E- und Cyclin D3-Spiegel auch ein langsames Wachstum im Vergleich zu FTC 133 und FTC 238 auf. Es fand sich also eine signifikant positive Korrelation zwischen dem Proliferationsverhalten und der Expression von Cyclin E ($p = 0,003$) und Cyclin D3 ($p = 0,029$) in den untersuchten Schilddrüsenzelllinien. Der Korrelationskoeffizient betrug für Cyclin E 0,994 und für Cyclin D3 0,941, so dass von einer linearen Beziehung zwischen den Cyclin-Spiegeln und der Wachstumskinetik in vitro auszugehen ist.

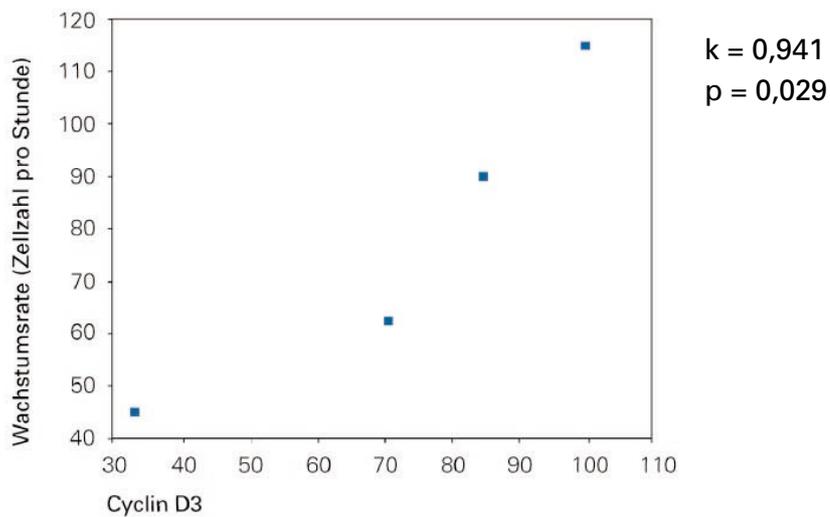
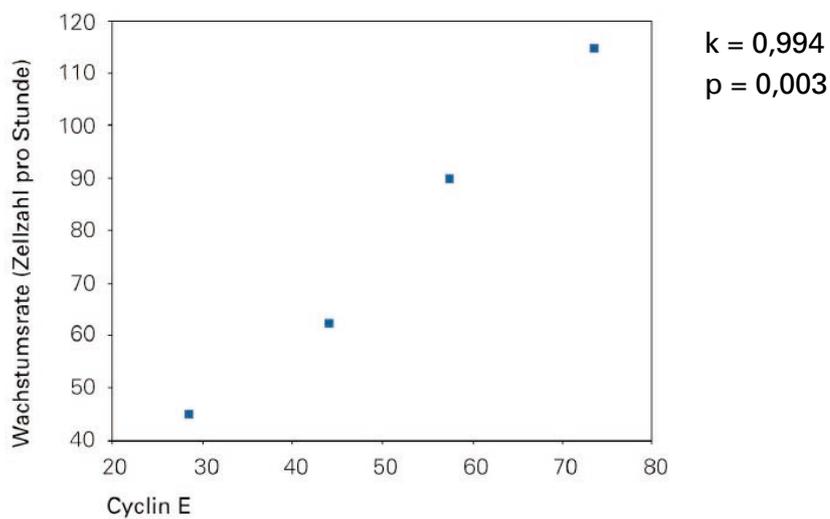
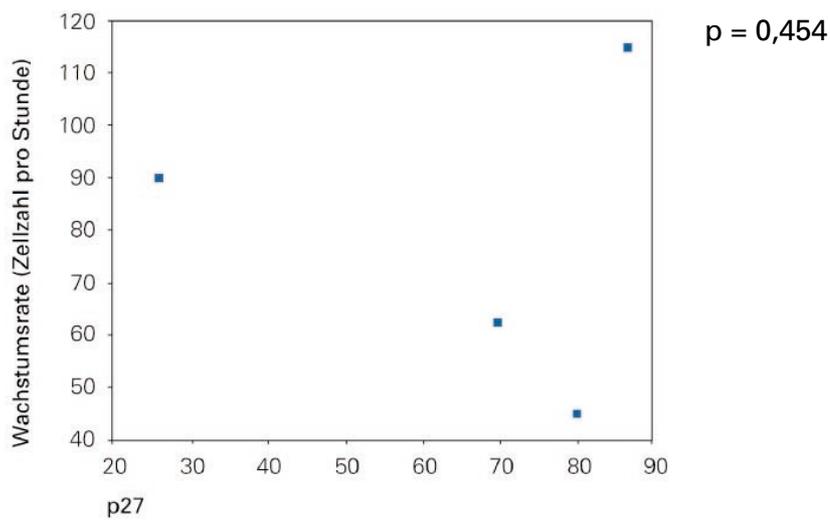


Abbildung 11: Assoziation zwischen Wachstumskinetik und Expression der Zellzyklusproteine in Schilddrüsenzelllinien

3.2. Schilddrüsengewebe

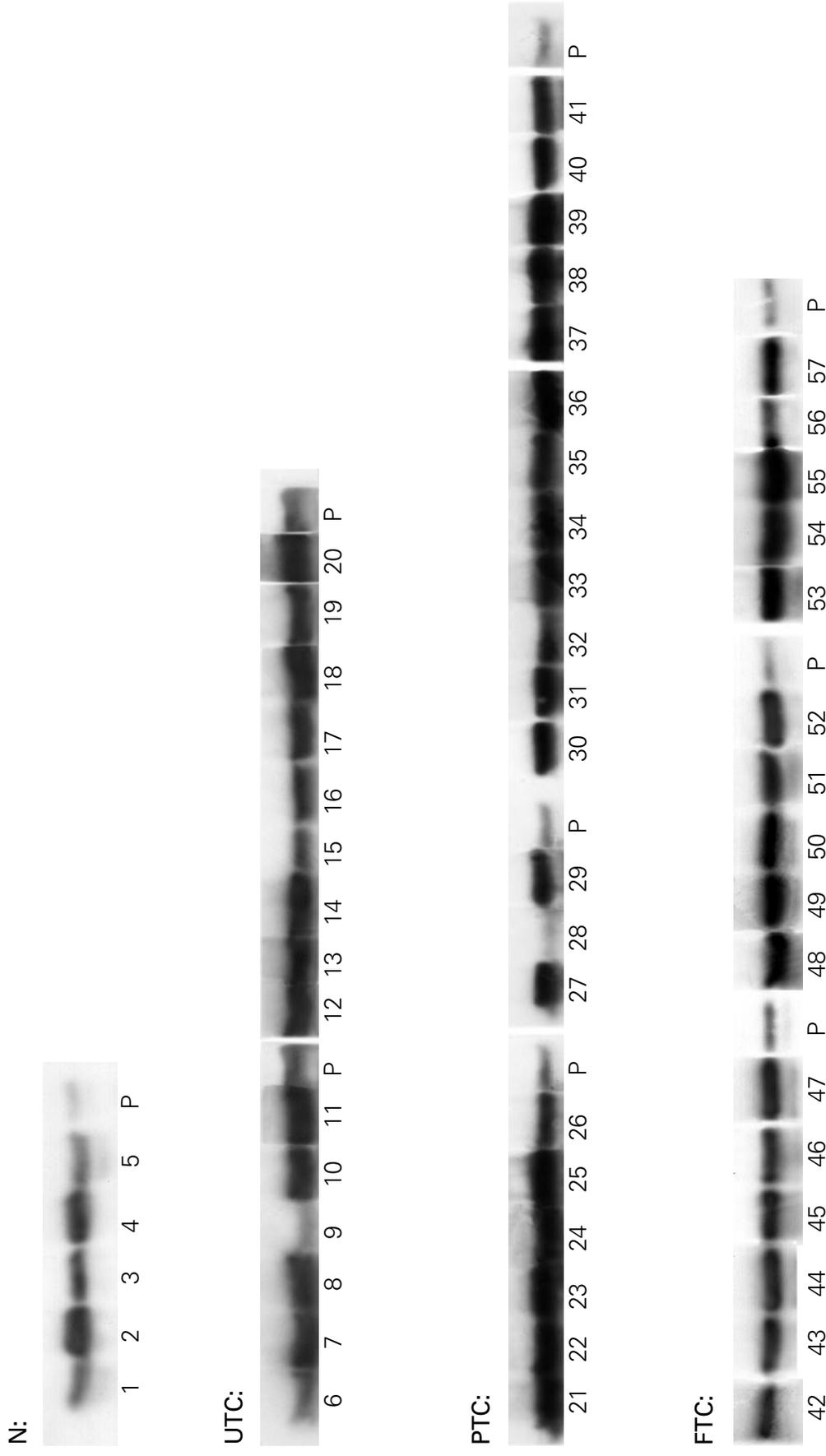
3.2.1 p27

In Abbildung 12 sind die Westernblot-Ergebnisse unter Verwendung des p27-Antikörpers dargestellt.

Die untersuchten Normalgewebe stammten alle von Patienten, die gleichzeitig an einem Schilddrüsenkarzinom erkrankt waren. Diese benachbarten nicht-neoplastischen Schilddrüsengewebe exprimierten den Zellzyklusregulator p27 in Höhe von 98 bis 115% bezogen auf die Positivkontrolle (Abbildung 12b). Vergleichbare p27-Spiegel wurden auch in den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen detektiert. Entsprechend der zarten Bande auf dem Röntgenfilm (Abbildung 12a) ergab sich im undifferenzierten Tumorgewebe Nr. 9 nur eine Expression von 91% der Positivkontrolle. Folglich ließ sich eine Unterexpression in allen untersuchten Normalgeweben und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen ermitteln (Abbildung 12b). Wie die Abbildung 12a verdeutlicht, fand sich in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen mit Ausnahme der Gewebe-Nr. 28 eine tiefschwarze Bandenfärbung. Bei der densitometrischen Bestimmung wurden Expressionswerte von durchschnittlich 167% der Positivkontrolle, den Ausreißer ausgeschlossen, gemessen (Abbildung 12b). Somit zeigten alle follikulären Schilddrüsenkarzinome sowie 20 von 21 untersuchten papillären Schilddrüsenkarzinomen (95%) eine Überexpression von p27, während in den undifferenzierten Tumoren vergleichsweise nur geringe p27-Spiegel beobachtet wurden ($p = 0,000$). Lediglich das papilläre Schilddrüsenkarzinom Nr. 28 wies mit 85% der Positivkontrolle eine Unterexpression von p27 auf.

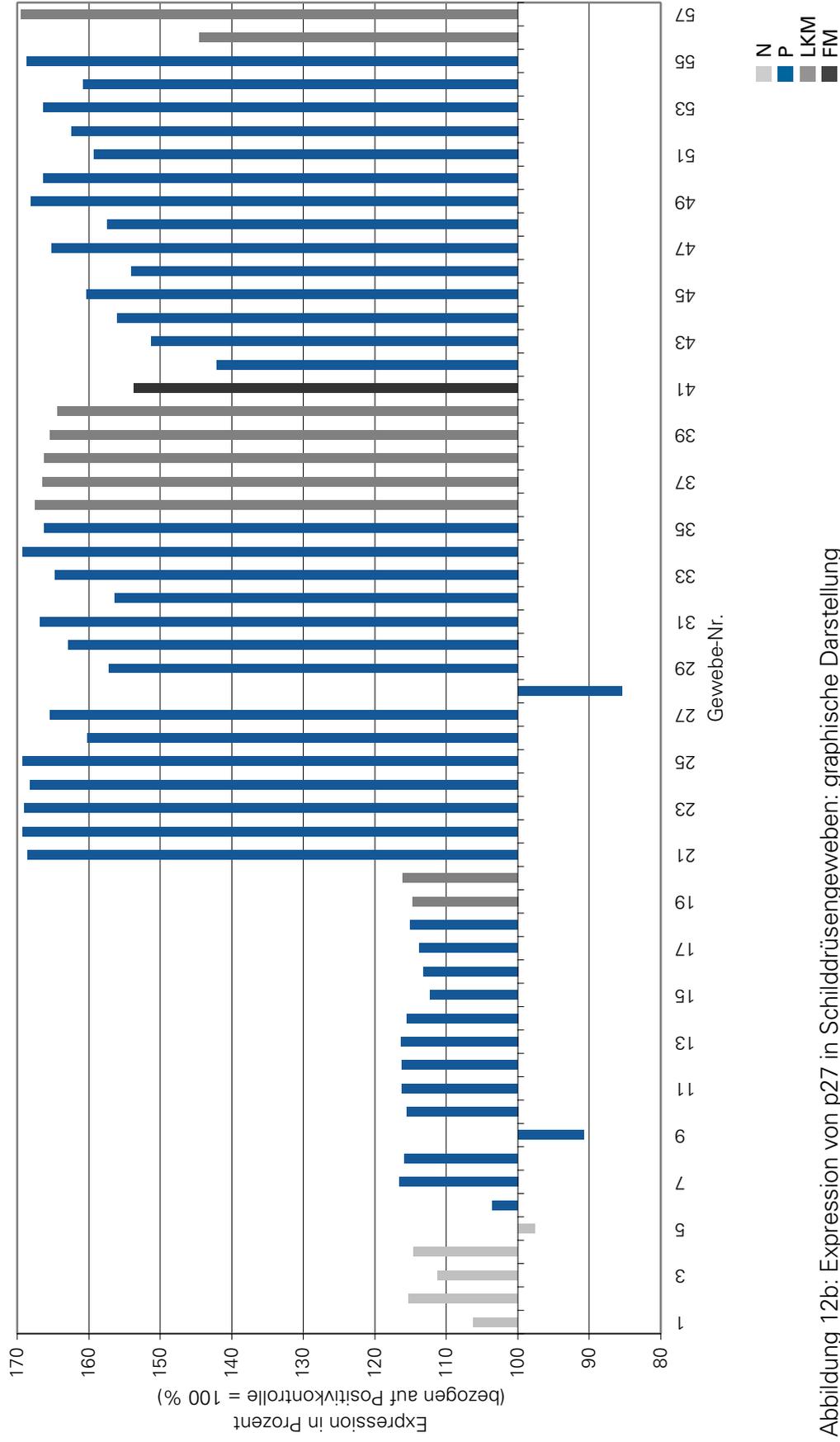
Betrachtet man die Einzelwerte, so betragen die p27-Spiegel in den undifferenzierten Lymphknotenmetastasen 115% (Gewebe-Nr. 19) und 116% (Gewebe-Nr. 20) der Positivkontrolle. Sie exprimierten p27 damit entsprechend der Mehrzahl der undifferenzierten Primärtumoren. In den papillären Lymphknotenmetastasen (Gewebe-Nr. 36 bis 40) fand sich eine durchschnittliche p27-Expression von 166% der Positivkontrolle. Dagegen wurde in der papillären Lungenmetastase (Gewebe-Nr. 41) ein geringeres p27-Level von 152% der Positivkontrolle registriert. Es ergab sich also in den papillären Primärtumoren, mit Ausnahme der Gewebe-Nr. 28, sowie in den papillären Metastasengeweben eine p27-Überexpression. Bei den follikulären Lymphknotenmetastasen fiel die p27-Überexpression im Gewebe Nr. 56 um 15% geringer als im Gewebe Nr. 57 aus. Insgesamt unterschieden sich Primärtumore somit nicht von Lymphknoten- oder Fernmetastasen hinsichtlich ihrer p27-Spiegel in den einzelnen Schilddrüsenkarzinomgruppen ($p = 0,554$).

Die p27-Expression korrelierte nicht mit dem pTNM-Stadium (Abbildung 13).



34 Abbildung 12a: Expression von p27 in Schilddrüsengeweben: Westernblot

Expression von p27



35 Abbildung 12b: Expression von p27 in Schilddrüsengeweben: graphische Darstellung

Tumgröße:

Lymphknotenstatus:

UTC:

p27 \ Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	4	0
T 4	6	0

nicht bestimmt: 3

p27 \ LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	1	0
N 1	4	0

nicht bestimmt: 8

PTC:

p27 \ Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	1	8
T 4	0	5

nicht bestimmt: 1 $p = 0,439$

p27 \ LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	1	4
N 1	0	8

nicht bestimmt: 2 $p = 0,188$

FTC:

p27 \ Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	0	8
T 4	0	5

nicht bestimmt: 1

p27 \ LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	0	7
N 1	0	2

nicht bestimmt: 5

Abbildung 13: Korrelation zwischen p27-Expression und pTNM-Stadium

3.2.2 Cyclin E

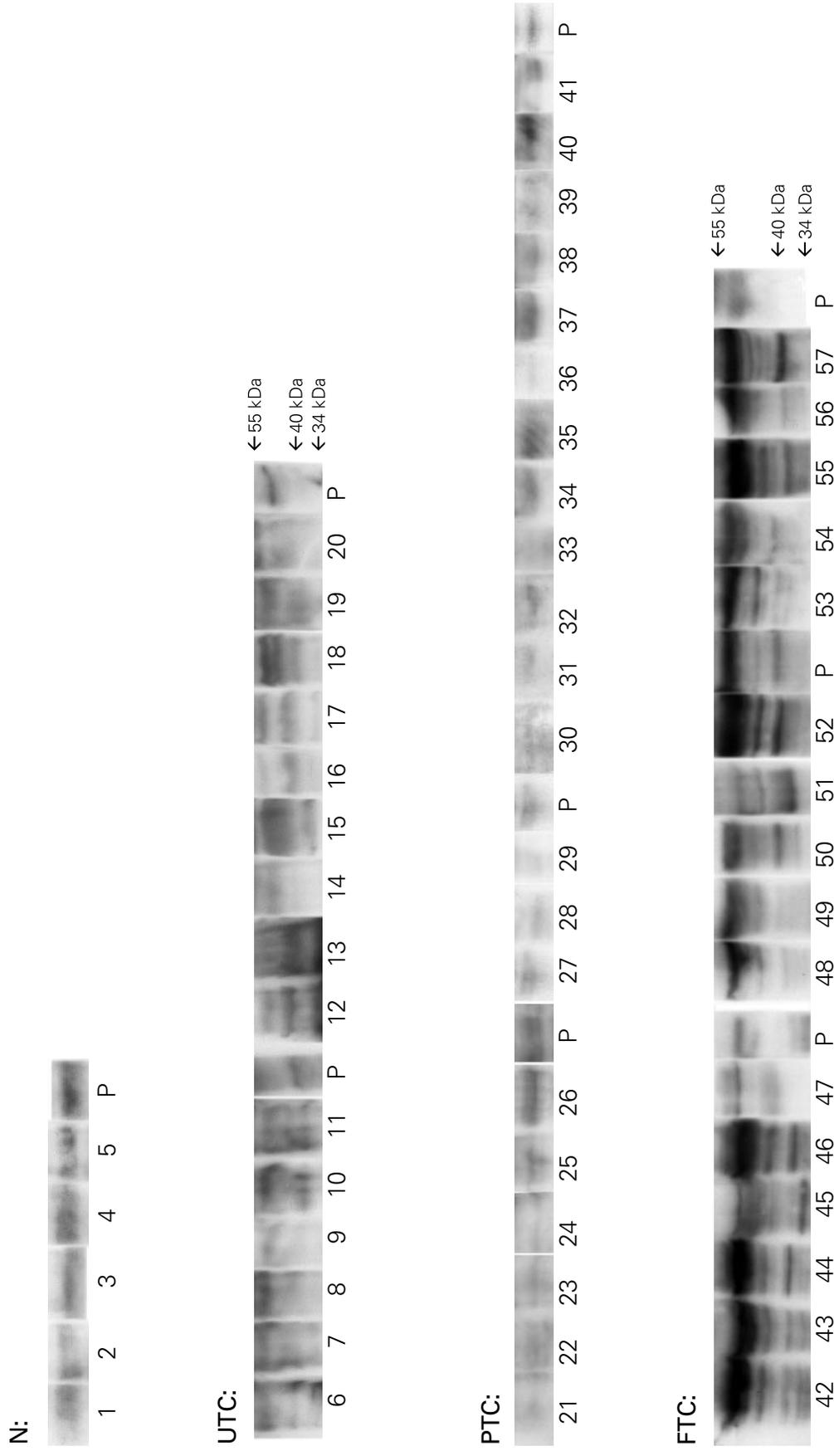
Andere Blotmembranen mit der gleichen Reihenfolge der Gewebeprotein-auftragung wurden mit Cyclin E-Antikörpern behandelt.

Betrachtet man die Bandenstärke der untersuchten Gewebe auf dem Film (Abbildung 14a), fällt die starke Reaktion der follikulären Schilddrüsenkarzinome auf, während in den Normalgeweben, papillären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen nur schwache Banden registriert wurden. Das vergleichsweise geringe Vorkommen von Cyclin E in den nicht-transformierten thyroidalen Geweben, papillären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen spiegelte sich auch in den gemessenen Expressionswerten wider (Abbildung 14b). In den Normalgeweben wurden Cyclin E-Level von durchschnittlich 61%, bezogen auf die Positivkontrolle, bestimmt. Die anaplastischen Schilddrüsenkarzinome zeigten eine Cyclin E-Expression von 46% bis 89% der Positivkontrolle. Ebenso lagen die Expressionsdaten für Cyclin E in den papillären Schilddrüsenkarzinomen, bis auf das Gewebe Nr. 40 mit 101%, unterhalb des Mittelwertes der Positivkontrollen. Dagegen wurden in den follikulären Schilddrüsentumoren sehr hohe Cyclin E-Spiegel von bis zu 330% der Positivkontrolle beobachtet. Zusammenfassend ließ sich eine Unterexpression von Cyclin E in den Normalgeweben, papillären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen festhalten, die in starkem Kontrast zur ausgeprägten Cyclin E-Überexpression in den follikulären Schilddrüsenkarzinomen steht ($p = 0,000$).

Die Lymphknotenmetastasen der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome (Gewebe-Nr. 19 und 20) exprimierten Cyclin E in Höhe von 81% und 82% der Positivkontrolle. Fast identische Werte wurden auch in einigen undifferenzierten Primärtumoren (Gewebe-Nr. 8, 10 bis 13) ermittelt. In allen papillären Lymphknotenmetastasen (Gewebe-Nr. 36 bis 40) fand sich wie in den Primärtumoren eine Unterexpression von Cyclin E. Dabei wurde das niedrigste Cyclin E-Level mit 43% im Gewebe-Nr. 36 und der höchste Cyclin E-Spiegel mit 101% im Gewebe-Nr. 40 detektiert. Die untersuchten papillären Lymphknotenmetastasen unterschieden sich nicht in ihrer Cyclin E-Expression von der papillären Lungenmetastase (Gewebe-Nr. 41). In den beiden follikulären Lymphknotenmetastasen betragen die Cyclin E-Level 288% (Gewebe-Nr. 56) und 312% (Gewebe-Nr. 57) der Positivkontrolle. Ähnliche Cyclin E-Expressionswerte wurden auch von follikulären Primärtumoren erreicht. Es ergab sich somit keine Differenz zwischen den Cyclin E-Spiegeln von Primärtumoren und Metastasengeweben.

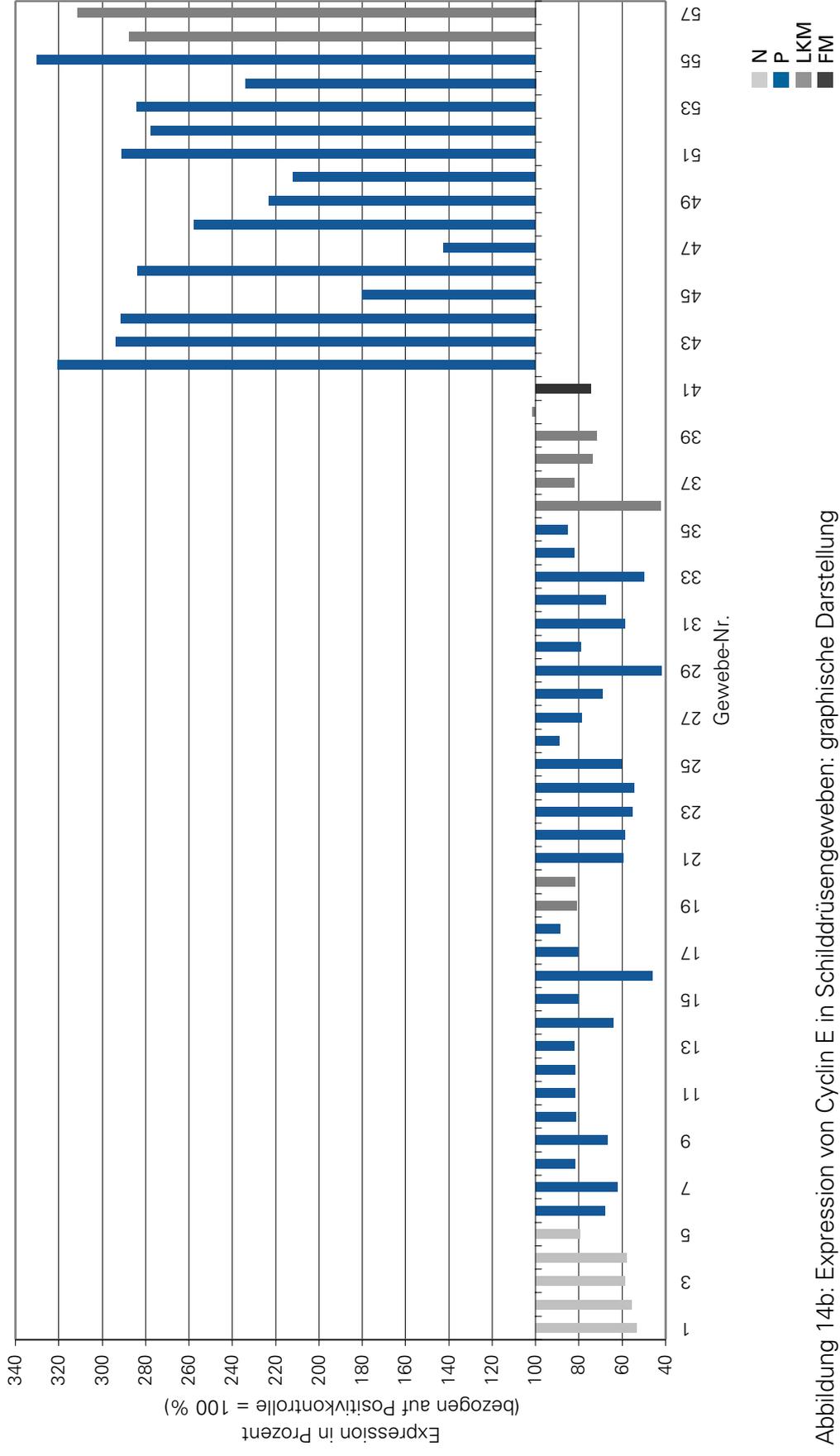
Die Cyclin E-Expression hatte keinen signifikanten Einfluß auf das pTNM-Stadium (Abbildung 15). Eine Ausbreitung jenseits der Schilddrüsenkapsel (Tumorstadium 4) oder eine lymphogene Aussaat von Tumorzellen änderte nichts an der Unterexpression von Cyclin E in den undifferenzierten und papillären Schilddrüsentumoren bzw. an der Überexpression von Cyclin E in den follikulären Schilddrüsenkarzinomen.

Tumorspezifische Isoformen von Cyclin E zeigen bei der Westernblot-Analyse Banden bei 49kDa und 34kDa (Keyomarsi et al., 1994) sowie 40kDa (Ohtsubo et Roberts, 1993), während für das wildtyp-Molekül ein Gewicht von 50 bis 55kDa kennzeichnend ist. Wie in Abbildung 14a dargestellt, ließ sich in den Normalgeweben und papillären Schilddrüsenkarzinomen nur jeweils eine Bande pro untersuchtem Gewebe erkennen, die mit 50 bis 55kDa dem wildtyp-Cyclin E entsprach. Niedermolekulare Varianten des Zellzyklusproteins wurden mit 49kDa im undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom Nr. 18 identifiziert, während 14 von 16 (87,5%) der untersuchten follikulären Schilddrüsentumoren (Gewebe-Nr. 42 bis 49, 51 bis 53 sowie 55 bis 57) positiv für die 49kDa-Isoform waren. Cyclin E-Moleküle von 40kDa fanden sich in 9 von 15 (60%) der undifferenzierten thyroidalen Karzinome und in 11 von 16 (69%) der follikulären Tumoren. Dagegen traten 34kDa-Banden nur selten in den undifferenzierten Karzinomen Nr. 6, 12, 13, 15 und 17 sowie in den follikulären Schilddrüsentumoren Nr. 42, 45, 50 und 51 auf. Insgesamt konnten niedermolekulare Varianten von Cyclin E also ausschließlich in follikulären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomgeweben detektiert werden.



33 Abbildung 14a: Expression von Cyclin E in Schilddrüsengeweben: Westernblot

Expression von Cyclin E



40 Abbildung 14b: Expression von Cyclin E in Schilddrüsengeweben: graphische Darstellung

Tumgröße:

Lymphknotenstatus:

UTC:

Cyclin E \ Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	4	0
T 4	6	0

nicht bestimmt: 3

Cyclin E \ LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	1	0
N 1	4	0

nicht bestimmt: 8

PTC:

Cyclin E \ Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	9	0
T 4	5	0

nicht bestimmt: 1

Cyclin E \ LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	5	0
N 1	8	0

nicht bestimmt: 2

FTC:

Cyclin E \ Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	0	8
T 4	0	5

nicht bestimmt: 1

Cyclin E \ LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	0	7
N 1	0	2

nicht bestimmt: 5

Abbildung 15: Korrelation zwischen Cyclin E-Expression und pTNM-Stadium

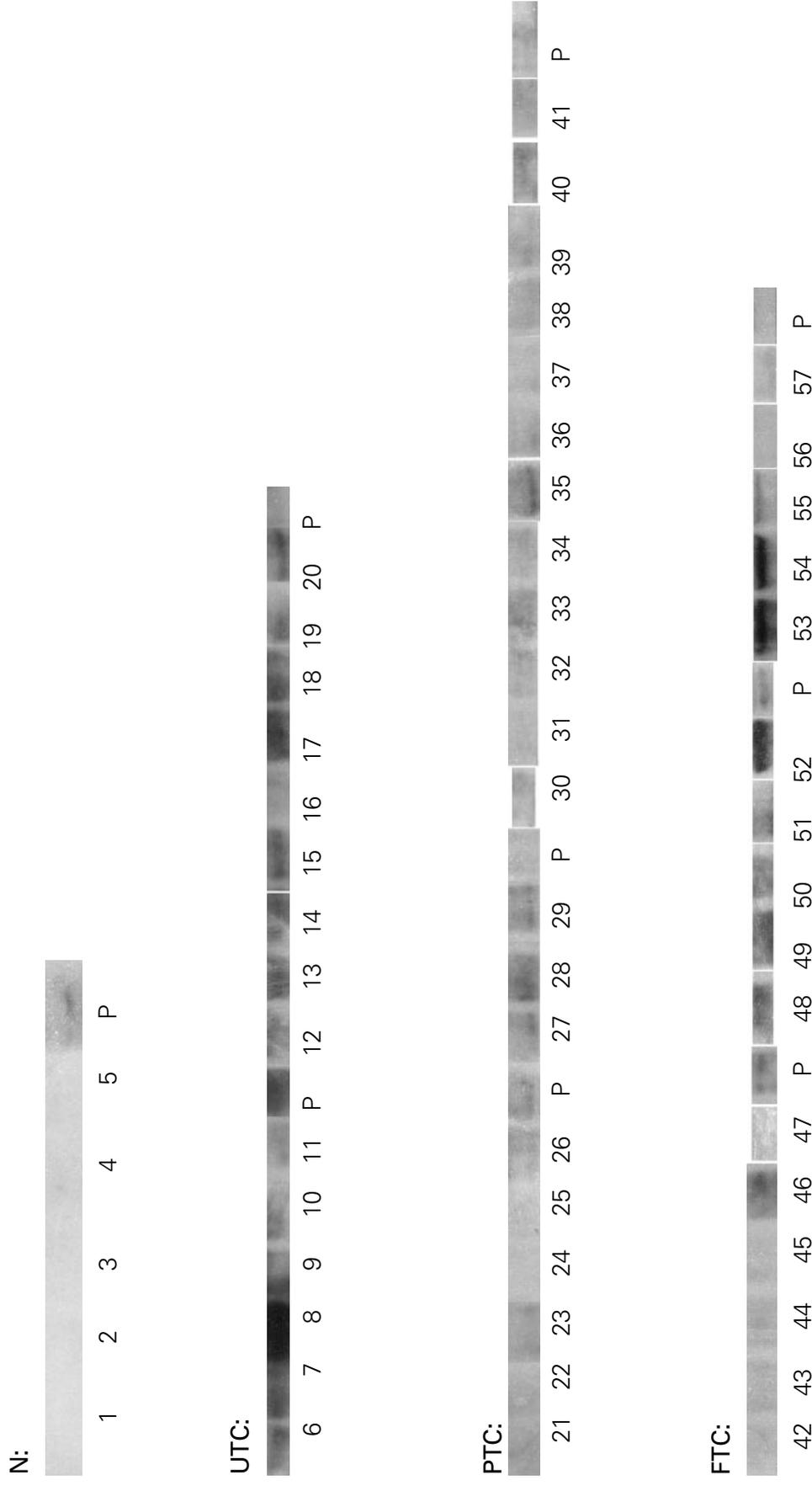
3.2.3 Cyclin D3

Die Abbildung 16 stellt die Reaktion der untersuchten Gewebe auf Cyclin D3-Antikörper dar.

Im Gegensatz zu p27 und Cyclin E exprimierten alle thyroidalen Normalgewebe kein Cyclin D3-Protein. Nach der Behandlung mit Cyclin D3-Antikörpern wurde nur die Bande der Positivkontrolle auf dem Film detektiert (Abbildung 16a). Bei der Untersuchung der Tumorproben fiel ein variables Expressionsmuster auf (Abbildung 16b). Zwei Drittel der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome (Gewebe-Nr. 7 bis 9, 12 bis 15, 17, 18, 20) zeigten eine Überexpression von Cyclin D3, wobei die höchsten Spiegel des Zellzyklusproteins bei 123% (UTC-Gewebe-Nr. 6) und 223% der Positivkontrolle (FTC-Gewebe-Nr. 20) lagen. Mit Ausnahme einer papillären Lymphknotenmetastase (Gewebe-Nr. 40) fand sich in allen papillären Schilddrüsenkarzinomen eine Unterexpression von Cyclin D3. In der Hälfte der papillären Schilddrüsenmalignome wurden sogar Cyclin D3-Spiegel unterhalb des Mittelwertes der Positivkontrollen bestimmt. Entsprechend der starken Bandenintensität wiesen die follikulären Schilddrüsenkarzinome Nr. 46, 49, 52 bis 54 (Abbildung 16a) sehr hohe Cyclin D3-Spiegel auf. In der follikulären Neoplasie Nr. 54 erreichte das Cyclin D3-Level das Vierfache der Positivkontrolle. Es ließ sich also ein deutlicher Unterschied in der Cyclin D3-Expression zwischen papillären Schilddrüsentumoren und den übrigen Karzinomgeweben erkennen ($p = 0,000$). In den follikulären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen wurde eine ähnliche Verteilung der Expressionswerte ($p = 0,809$) beobachtet.

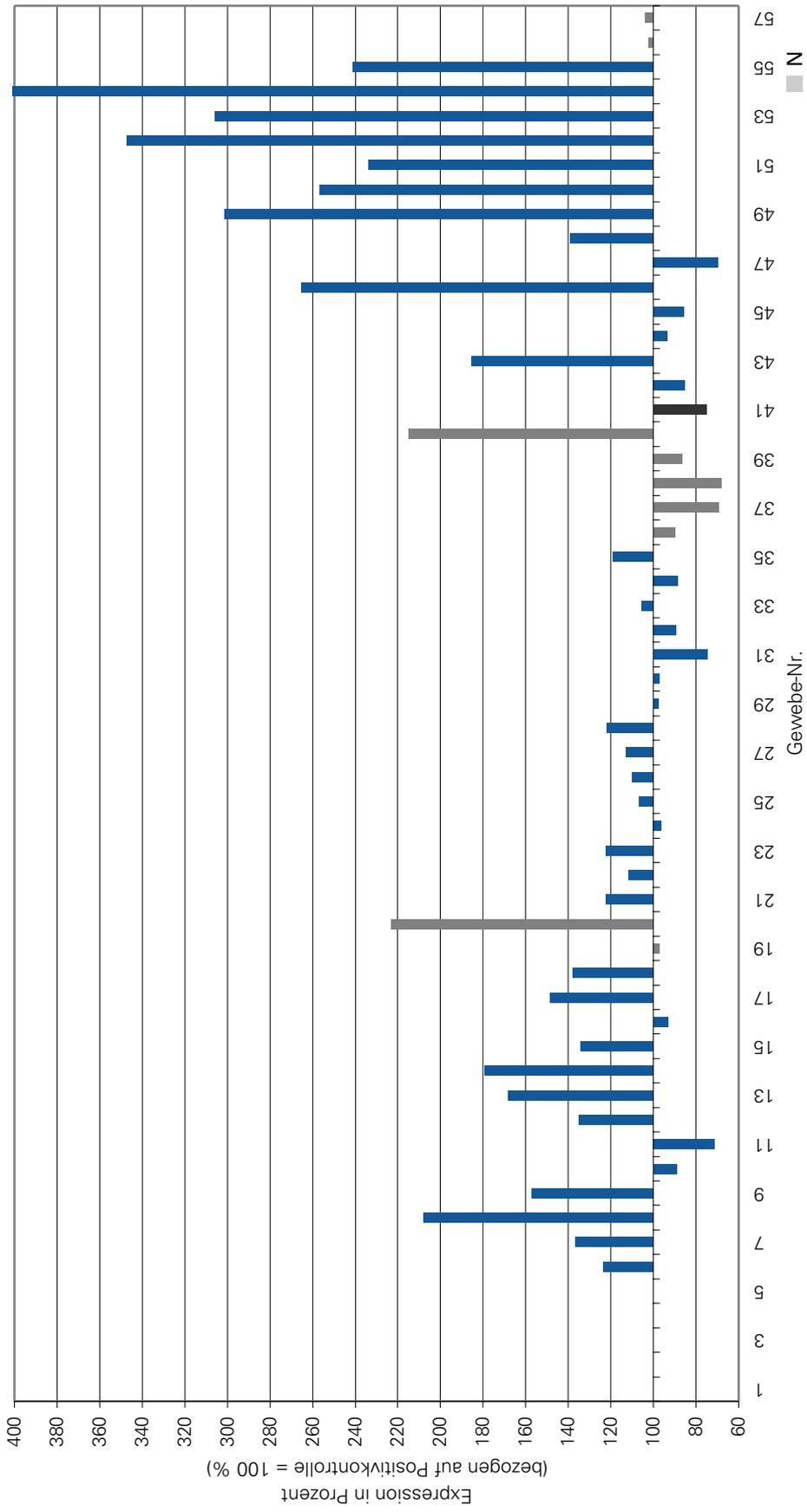
Wie die Abbildung 17 verdeutlicht, fand sich in 9 von 13 untersuchten undifferenzierten Primärtumoren sowie in einer der beiden untersuchten anaplastischen Lymphknotenmetastasen (Gewebe-Nr. 20) eine Cyclin D3-Überexpression. Dagegen wurde nur in einer papillären Lymphknotenmetastase ein hoher Spiegel des Zellzyklusproteins gemessen. Die Mehrzahl der follikulären Primärtumore (60%) zeigte eine Cyclin D3-Überexpression, während in beiden follikulären Lymphknotenmetastasen eine Cyclin D3-Unterexpression ermittelt wurde. Der Vergleich zwischen der Cyclin D3-Akkumulation in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen ergab nur in den follikulären Schilddrüsenkarzinomen eine grenzwertige Signifikanz.

Tumorgroße und Metastasierungsgrad waren nicht mit der Cyclin D3-Expression assoziiert. Ähnliche Cyclin D3-Spiegel wurden sowohl in minimal-invasiven als auch in fortgeschrittenen, metastasierten Tumoren gefunden (Abbildung 18).



43 Abbildung 16a: Expression von Cyclin D3 in Schilddrüsengeweben: Westernblot

Expression von Cyclin D3



44 Abbildung 16b: Expression von Cyclin D3 in Schilddrüsengeweben: graphische Darstellung

Primärtumoren (P) versus Lymphknotenmetastasen (LKM):

UTC:

Cyclin D3 Gewebe	Unter- expression	Über- expression
P	4	9
LKM	1	1

p = 0,591

PTC:

Cyclin D3 Gewebe	Unter- expression	Über- expression
P	5	0
LKM	4	1

p = 0,076

FTC:

Cyclin D3 Gewebe	Unter- expression	Über- expression
P	4	10
LKM	2	0

p = 0,051

Abbildung 17: Cyclin D3-Expression in Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen

Tumgröße:

Lymphknotenstatus:

UTC:

Cyclin D3 Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	2	2
T 4	2	4

nicht bestimmt: 3 $p = 0,598$

Cyclin D3 LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	1	0
N 1	2	2

nicht bestimmt: 8 $p = 0,361$

PTC:

Cyclin D3 Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	9	0
T 4	5	0

nicht bestimmt: 1

Cyclin D3 LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	5	0
N 1	8	0

nicht bestimmt: 2

FTC:

Cyclin D3 Stadium	Unter-expression	Über-expression
T 1-3	3	5
T 4	1	4

nicht bestimmt: 1 $p = 0,506$

Cyclin D3 LKM	Unter-expression	Über-expression
N 0	2	5
N 1	0	2

nicht bestimmt: 5 $p = 0,391$

Abbildung 18: Korrelation zwischen Cyclin D3-Expression und pTNM-Stadium

4 Diskussion

4.1 Schilddrüsenzelllinien

4.1.1 Einfluß von p27 auf die Wachstumskinetik in vitro

In dieser Studie wirkte sich die Höhe des p27-Spiegels entgegen der Ausgangshypothese nicht auf das Proliferationsverhalten der Schilddrüsenzelllinien aus. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen von Yamamoto et al. (1999) bestätigt. Sie beobachteten in p27-überexprimierenden Darmkrebszellen nur teilweise eine Wachstumshemmung. In Tumorgeweben liegen unterschiedliche Ergebnisse vor. Während in einigen Karzinomen ein geringer p27-Spiegel mit einer erhöhten Proliferationsaktivität assoziiert war (Esposito et al., 1997; Lloyd et al., 1997; Kim et al., 2000; Kamaï et al., 2001), ergaben andere Studien keine Korrelation zwischen der p27-Expression und der Zellteilungsrate (Fredersdorf et al., 1997; Catzavelos et al., 1997; Singh et al., 1998; Resnick et al., 1998; Ohashi et al., 1999; Palmqvist et al., 1999; Hommura et al., 2000; Hedberg et al., 2002a; Migita et al., 2002). Hierbei gilt zu bedenken, dass in den oben genannten Arbeiten das Zellzyklusprotein hauptsächlich immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Eine klonale Expansion von malignen Zellen könnte also auch unabhängig von einer p27-Downregulation erfolgen. Dies wirft die Frage auf, ob p27 zusätzlich durch einen proliferationsunabhängigen Mechanismus die thyroideale Tumorprogression beeinflusst. Tatsächlich sind Störungen der Zellzyklusregulation in Krebszellen neben einer abnormen Zellteilung, auch mit einem Kontrollverlust der Apoptosefunktion (Katayose et al., 1997; Wang et al., 1997) und mit einer Dedifferenzierung (Steeg et Abrams, 1997; Jacks et Weinberg, 1998) verbunden. Potentiell könnte die hohe p27-Expression in FTC 133, UTC C643 und UTC 8505C auch Ausdruck einer verminderten Apoptose oder Dedifferenzierung sein. Weiterhin spielt vermutlich die komplexe Steuerung des G1/S-Übergangs eine Rolle. Neben p27 könnten Alterationen anderer Parameter die Proliferation der untersuchten Schilddrüsenkarzinomzellen modulieren. So wurden beispielsweise Mutationen des Retinoblastomaproteins in 55% der Schilddrüsenkarzinome identifiziert (Farid et al., 1994).

4.1.2 Einfluß von Cyclin E und Cyclin D3 auf die Wachstumskinetik in vitro

Im Gegensatz zu p27 fand sich, wie erwartet, eine signifikante Korrelation zwischen der Expression von Cyclin E/ Cyclin D3 und der Proliferationsrate in den untersuchten Schilddrüsenzelllinien. Die Überexpression von Cyclin E und Cyclin D3 in Schilddrüsenkarzinomzellen führt wahrscheinlich zu einer beschleunigten Passage des G1/S-Kontrollpunktes. Zu ähnlichen Ergebnissen in normalen und transformierten Zellen kamen auch Ohtsubo et Roberts (1993), Li et al. (1997) sowie Herzinger et Reed (1998). Auch in TSH-stimulierten tierischen Thyreozyten ist Cyclin D3 in die Induktion der DNS-Synthese involviert

(Depoortere et al., 1998; Motti et al., 2003). Hohe Cyclin D3-Spiegel führen dabei zu einer vorzeitigen Phosphorylierung von pRb und seinen verwandten Eiweißen (Herzinger et Reed, 1998). Ebenso könnte eine beschleunigte pRb-Phosphorylierung Ursache für die erhöhte Zellteilung in FTC 133 und FTC 238 sein. Für die Assoziation zwischen der Cyclin E-Expression und der Wachstumsrate in den Schilddrüsenzelllinien gibt es unterschiedliche Erklärungsansätze. Cyclin E ist in der Lage, den G1/S-Übergang unabhängig von pRb und dem Transkriptionsfaktor E2F zu steuern (Lukas et al., 1997). Alternative pRb-Substrate für Cyclin E/CDK2-Komplexe können das NPAT (*nuclear protein mapping to the ATM locus* nach Zhao et al., 1998) oder das B-MYB-Protein (Sala et al., 1997) sein, deren Phosphorylierung den Eintritt in die S-Phase verkürzt.

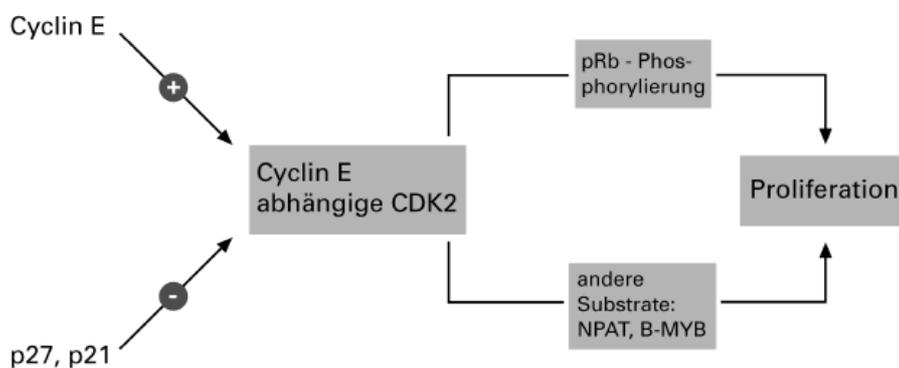


Abbildung 19: Steuerung des G1/S-Übergangs durch Cyclin E

Zusätzlich fördern Cyclin E/CDK2-Moleküle die Zellproliferation, indem sie die Stabilität von Cyclin B/CDK1-Komplexen beeinflussen. Die Inaktivierung der Cyclin E/CDK2-Heterodimere steigert den Abbau von Cyclin B und damit den Mitoseaustritt (D'Angiolella et al., 2001). In Tumorgewebe wird allerdings die Beziehung zwischen Cyclin E-Expression und Zellteilung kontrovers diskutiert. Nur in Leber- (Ohashi et al., 2001) und kolorektalen Karzinomen (Li et al., 2001) war ein erhöhter Cyclin E-Spiegel ausnahmslos mit einer vermehrten Zellproliferation verbunden. In anderen Studien zeigten nicht alle Malignome diese positive Korrelation (Porter et al., 1997; Scott et Walker, 1997; Erlanson et al., 1998; Hedberg et al., 2002a) oder der Mitoseindex verhielt sich nicht proportional zum Cyclin E-Level (Keyomarsi et al., 1995; Gray-Bablin et al., 1996; Fukuse et al., 2000; Mueller-Tidow et al., 2001). Es gibt also eine echte Dysregulation der Cyclin E-Expression in einigen Karzinomen, die unabhängig von der Wachstumsrate ist.

4.2 p27 in Schilddrüsengeweben

4.2.1 Expression von p27 in nicht-transformierten Schilddrüsengeweben

Nach dem Zellzyklusverständnis müßten normale Thyreozyten mit geringer proliferativer Aktivität (Saiz et al., 2002) hohe p27-Level zeigen (Lloyd et al., 1997), die bei Mitoseeintritt abnehmen (Pagano et al., 1995). In der vorliegenden Studie exprimierten die nicht-transformierten Schilddrüsengewebe p27 aber nur in geringem Maße. Dieses Resultat steht im Widerspruch zur Arbeit von Lloyd et al. (1997), die in thyroidalen Normalgeweben hohe p27-Spiegel nachweisen konnten. Bei den hier untersuchten Schilddrüsennormalgeweben muß aber die vergleichsweise geringe Fallzahl berücksichtigt werden.

Für die Diskrepanz könnte aber auch eine p27-unabhängige Kontaktinhibition des Zellwachstums verantwortlich sein. Diese Hypothese wird zum einen durch Nakayama et al. (1996) gestützt. Sie wiesen in vitro nach, dass p27-negative embryonale Mausfibroblasten in der G1-Phase blockiert bleiben. Die Zahl der Zellteilungen in den p27-*Knockout*-Mäusen unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Zum anderen fanden Depoortere et al. (1996) umgekehrt hohe p27-Spiegel im Zellkern von proliferierenden Schilddrüsenepithelzellen.

Da alle Schilddrüsennormalgewebe von Patienten stammten, die gleichzeitig an einem Schilddrüsenkarzinom erkrankt waren, könnte eine andere Erklärung für die p27-Unterexpression eine Funktionseinschränkung des benachbarten nicht-neoplastischen Parenchyms von karzinomhaltigen Schilddrüsen sein. So unterschieden sich beispielsweise hormonproduzierende Hypophysenadenome in ihrer p27-Expression von syntheseinaktiven Tumoren gleicher Histologie (Zhao et al., 1999).

4.2.2 Expression von p27 in FTC, PTC

Entsprechend der Ausgangshypothese zeigten die differenzierten Schilddrüsenkarzinome mit einer Ausnahme nahezu identisch hohe p27-Spiegel, während in den undifferenzierten Tumoren eine p27-Unterexpression detektiert wurde. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Tallini et al. (1999) und Lloyd et al. (1997). Dieser signifikante Unterschied zwischen differenzierten und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen läßt vermuten, dass p27 beim Dedifferenzierungsprozess von thyroidalen Tumoren eine wichtige Rolle spielt. Auch umgekehrt wurde der Beweis erbracht, dass p27 essentiell am Differenzierungsvorgang beteiligt ist. Oligodendrozyten von p27-*Knockout*-Mäusen fehlt die Fähigkeit zur Differenzierung (Pestell et al., 1999). Unklar bleibt dabei, in welcher Form p27 in den thyroidalen Dedifferenzierungsprozess eingreift. Zwei in vitro-Modelle bieten hier einen Erklärungsansatz. Eine Überexpression von p27 induzierte über einen CDK2-unabhängigen Mechanismus die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen (Yamamoto et al., 1999). Weiterhin wiesen Kranenburg et al. (1995) nach, dass p27 die Differenzierung von Mausneuroblastomzellen

durch Inaktivierung von CDK4 triggert. Einige Autoren vermuten, dass anaplastische Schilddrüsenkarzinome aus präexistenten gut-differenzierten Schilddrüsentumoren hervorgehen (Ordóñez et al., 1991; Venkatesh et al., 1990; Goerges, 2001). Möglicherweise beeinflusst p27 über seine Interaktion mit CDK4 in Schilddrüsenkarzinomen diesen thyroidalen Dedifferenzierungsvorgang.

Mit einer Ausnahme hielten also die differenzierten Schilddrüsenkarzinome die Expression des Tumorsuppressorproteins p27 aufrecht. Dieses Resultat führt zur Frage nach einem speziellen Mechanismus, welcher den Krebszellen die Toleranz von p27 ermöglicht. Baldassarre et al. (1999) gehen davon aus, dass Cyclin D3 in Schilddrüsenkarzinomen mit p27 einen zytoplasmatischen Komplex bildet, der die p27-Bindung an Cyclin-CDK2-Moleküle im Zellkern verhindert und somit p27 inaktiviert. Folglich müßte ein hoher p27-Spiegel mit einer Cyclin D3-Überexpression verbunden sein. In der vorliegenden Arbeit fanden sich keine eindeutigen Hinweise, die die Hypothese von Baldassarre et al. (1999) stützen. Es ist aber denkbar, dass einige follikuläre Schilddrüsenkarzinome mit hohem Cyclin D3-Level auf diese Weise der p27-vermittelten Wachstumshemmung entgehen können.

Ursache für die niedrige Expression des papillären Karzinomgewebes Nr. 28 könnte zum Beispiel ein gestörter TGF- β -Mechanismus sein. TGF- β induziert über Inhibitoren der kip/cip-Familie, wie p27, einen G1-Block (Reynisdottir et al., 1995). Die Signaltransduktion erfolgt dabei über einen Komplex aus TGF- β -Rezeptor I und II, der Zielsubstrate in der Zelle phosphoryliert. Muro-Cacho et al. (1999) fanden in papillären Schilddrüsenkarzinomen neben einer p27-Unterexpression nur geringe Mengen des TGF- β -Rezeptors II. Weiterhin identifizierten sie Punktmutationen von Rezeptor II-Promotoren in einer kleinen Gruppe von PTC, die mit einer fehlenden m-RNS-Transkription assoziiert waren. Die Downregulation von p27 im papillären Karzinomgewebe Nr. 28 könnte durch eine selektive Aberration des TGF- β -Rezeptors II erklärt werden.

4.2.3 Expression von p27 in UTC

Ausgehend von klinischen Beobachtungen erscheint es logisch, dass p27 als Tumorsuppressorprotein in den aggressiveren undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC) erniedrigt ist. Dieses Ergebnis wird dadurch unterstrichen, dass in verschiedenen Tumoren niedrige p27-Spiegel mit einem hohen Malignitätsgrad korrelieren (Mammakarzinom: Wong et al., 2001; Kolonkarzinom: Fredersdorf et al., 1997; Magenkarzinom: Kim et al., 2000; Ösophaguskarzinom: Shibata et al., 2001; Nierenkarzinom: Migita et al., 2002; Harnblasenkarzinom: Kamai et al., 2001; Prostatakarzinom: Tsihlias et al., 1998).

Wenn die p27-Unterexpression ein Merkmal der untersuchten undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome darstellt, muß es einen pathophysiologischen Mechanismus geben, der zum Verlust des Zellzyklusproteins führt. In zahlreichen

Tumoren fanden sich konstant hohe m-RNS-Level während die p27-Protein-Expression vermindert war (Fredersdorf et al., 1997; Catzavelos et al., 1997; Takata et al., 1999; Singh et al., 1998). Interessanterweise hängt die Down-regulation von p27 in nicht-transformierten und malignen Zellen nicht von Genveränderungen ab (Kawamata et al., 1995), sondern wird hauptsächlich durch Ubiquitin-vermittelte Proteolyse (Pagano et al., 1995) und zu einem kleineren Teil translational (Hengst et al., 1996) kontrolliert. Ubiquitin ist ein in allen eukaryotischen Zellen vorkommendes Polypeptid. Es bindet an Lysinreste von Eiweißen und gibt dadurch das Signal zu deren Spaltung (Pschyrembel, 2002). Bevor p27 abgebaut werden kann, wird es durch Cyclin E/CDK2-Komplexe an seinem Threonin 187-Rest phosphoryliert (Sheaff et al., 1997). Diese phosphorylierte Form von p27 interagiert dann mit einem SCF-Komplex, der die Ubiquitin-Übertragung erleichtert (Elledge et Harper, 1998). Die Unterexpression von p27 in den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen könnte also aus seiner verminderten Halbwertszeit resultieren. Tatsächlich ließ sich in epithelialen, p27-unterexprimierenden Malignomen eine erhöhte proteolytische Aktivität beobachten (Slingerland et Pagano, 2000). Vermutlich wird in anaplastischen Schilddrüsentumoren synthetisiertes p27 abgebaut, bevor es seine inhibitorische Funktion im Zellzyklus wahrnehmen kann.

Nun stellt sich die Frage, welchen Effekt eine vorzeitige Proteolyse in den untersuchten undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen hat. Es ist bekannt, dass Zellproliferation und Apoptose das Gleichgewicht von normalem Schilddrüsengewebe als auch die Tumorprogression beeinflussen. Nicht-proliferierende Zellen zeigen eine hohe p27-Spiegel. Wenn die Zellen in den Zellzyklus eintreten, nimmt die Expression von p27 und damit seine inhibitorische Aktivität ab (Slingerland et Pagano, 2000). Wachstumsfördernde (z.B. Zytokine wie Interleukin 2: Nourse et al., 1994; spezielle Mitogene im Serum: Coats et al., 1996) und wachstumsinhibitorische Signale (z.B. TGF- β : Reynisdottir et al., 1995; Zell-Zell-Kontakt: Croix et al., 1996; c-AMP: Feliciello et al., 2000) regulieren dabei die Akkumulation von p27. Viele Zellzyklusregulatoren sind auch an der Steuerung des programmierten Zelltodes beteiligt. Da sich in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen der p27-Expression und der Wachstumsrate der Schilddrüsenzelllinien fand, erscheint eine gestörte Apoptosefunktion in den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomgeweben plausibler. Katayose et al. (1997) und Wang et al. (1997) erbrachten den Beweis, dass eine Überexpression von p27 neben einem G1-Block auch zur Apoptose führen kann. Dabei spielt die Inhibition der CDK2-Aktivität eher eine untergeordnete Rolle, da ein hoher p21-Spiegel in keiner der von Katayose et al. (1997) untersuchten humanen Zelllinien einen ähnlichen Effekt hatte. In Mammakarzinomen war ein hoher p27-Spiegel mit einem erhöhten Apoptoseindex verbunden (Wu et al., 1999). Potentiell würde eine geringe Apoptosezahl aufgrund der p27-Unterexpression in den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen die rasche Ausbreitung und Aggressivität dieser

Tumoren (Reiners et al., 1999) erklären. Während in den gut-differenzierten Schilddrüsenmalignomen, die sich durch eine günstigere Prognose auszeichnen, die Apoptosefunktion durch das Vorhandensein von p27 intakt ist. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob mit zunehmender Dedifferenzierung in Schilddrüsentumoren der Verlust von p27 mit einem Wegfall der Apoptosefähigkeit einhergeht.

Ebenso könnte eine gestörte Balance zwischen verschiedenen Zellzyklus-inhibitorproteinen die Frage nach den Folgen des niedrigen p27-Spiegels in den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen beantworten. Im Falle einer DNS-Schädigung wird p21 durch p53 induziert, das die Weitergabe der veränderten Erbsubstanz verhindert (El-Deiry et al., 1993). Da p27 zur selben CKI-Familie gehört, wäre auch eine Beziehung zwischen p27 und p53 denkbar. Wu et al. (1999) zeigten eine inverse Assoziation zwischen beiden Zellzyklusproteinen, verbunden mit einer schlechten Prognose bei p27 (-)/ p53 (+)-Patientinnen. Einige Autoren gehen davon aus, dass eine Überexpression von p53 mit einer p53-Mutation assoziiert ist (Haas et al., 1999; Gretarsdottir et al., 1996). Alterationen des p53-Gens wurden in zahlreichen humanen Malignomen gefunden (Hollstein et al., 1991). Durch den Funktionsverlust des mutierten p53-Proteins (El-Deiry et al., 1993) kommt es zur DNS-Replikation ohne Reparatur der geschädigten Basensequenzen. Der p27-Verlust infolge der Überexpression eines funktionslosen p53 hätte den Wegfall des G1/S-Kontrollpunktes zur Folge und könnte auf diese Weise zur Dedifferenzierung von Schilddrüsentumoren beitragen. Tatsächlich sind p53-Mutationen ein typisches Merkmal von schlecht differenzierten und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen (Farid, 2001; Ho et al., 1996; Donghi et al., 1993).

4.2.4 p27-Expression und pTNM-Stadium

Verglichen mit den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen fand sich in der vorliegenden Arbeit eine p27-Unterexpression in den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen, von denen ein rascher Einbruch in das umliegende Gewebe und eine frühe Metastasierung bekannt ist. Somit liegt nahe, dass p27 einen Einfluß auf das pTNM-Stadium hat. Aufgrund der geringen Fallzahl ließ sich hier jedoch keine inverse Korrelation zwischen der p27-Expression und dem Grad der Invasivität feststellen.

In der Literatur existieren unterschiedliche Ergebnisse. Immunhistochemische Untersuchungen von Khoo et al. (2002a, 2002b) ergaben eine Assoziation zwischen einem niedrigen p27-Spiegel und einem fortgeschrittenem Lymphknotenstatus in papillären Mikrokarzinomen und PTC. Im Gegensatz dazu wiesen Resnick et al. (1998) und Tallini et al. (1999) keine Beziehung zwischen der p27-Expression und prognostischen Faktoren wie Invasivität, extraglanduläre Ausdehnung und Metastasierung in Schilddrüsenkarzinomen nach.

4.3 Cyclin E in Schilddrüsengeweben

4.3.1 Expression von Cyclin E in nicht-transformierten Schilddrüsengeweben

Wie vermutet, fand sich in den untersuchten thyroidalen Normalgeweben eine Unterexpression von Cyclin E. Dabei kann das geringe Vorkommen des Zellzyklusproteins am ehesten als Ausdruck der geringen Proliferationsrate von nicht-transformierten Schilddrüsenepithelzellen (Saiz et al., 2002) interpretiert werden, da auch in vitro eine positive Korrelation zwischen Cyclin E und der Wachstumsrate bestand. In anderen benachbarten Normalgeweben von karzinomhaltigen Organen wurden ebenfalls niedrige Cyclin E-Spiegel beobachtet (Keyomarsi et al., 1994; Mueller-Tidow et al., 2001).

4.3.2 Expression von Cyclin E in FTC

Bei der Untersuchung der Cyclin E-Expression in den thyroidalen Tumorgeweben zeigte sich ein unerwartetes Ergebnis. Ausschließlich in den follikulären Schilddrüsenkarzinomen (30,8% der Fälle) wurde eine Überexpression von Cyclin E gemessen. Dabei fiel die große Differenz zwischen den Cyclin E-Spiegeln der follikulären Schilddrüsentumoren im Vergleich zu den papillären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen auf. Auch Nielsen et al. (1996) konnten mit Hilfe von immunhistochemischen Verfahren und Westernblot-Analyse hohe Cyclin E-Level nur in 27% der untersuchten Mammatumoren nachweisen. In der Studie von Mueller-Tidow et al. (2001) unterschieden sich kleinzellige Bronchialkarzinome zum Teil um einen Faktor von 1000 hinsichtlich ihrer Cyclin E-Spiegel.

Ursache für die Überexpression von Cyclin E in den follikulären Schilddrüsenkarzinomen könnte eine fehlerhafte Ubiquitin-vermittelte Proteolyse sein. Dieser enzymatische Prozess wird sowohl durch die CDK2-Bindung als auch durch ihre katalytische Aktivität reguliert. Die Bindung von Cyclin E an CDK2 verhindert die Ubiquitination und somit die Proteolyse (Clurman et al., 1996). Zum anderen sind Cyclin E/CDK2-Komplexe fähig zur Autophosphorylierung. Cyclin E-Moleküle besitzen als instabile Proteine eine charakteristische C-terminale Region, die reich an Prolin (P), Glutamin (E), Serin (S) und Threonin (T) ist. Das Zellzyklusprotein wird innerhalb dieser PEST-Domäne am Threonin 380-Rest durch seine Partnerkinase CDK2 phosphoryliert (Elledge et Harper, 1998). Dadurch kommt es zur Dissoziation des Cyclin E/CDK2-Komplexes mit nachfolgendem Abbau des freien Cyclin E (Won et Reed, 1996). Möglicherweise findet sich in den follikulären Schilddrüsenkarzinomen eine festere Bindung zwischen Cyclin E und seiner Partnerkinase, während in den papillären und undifferenzierten Schilddrüsenmalignomen eine vermehrte Autophosphorylierung erfolgt, die zur Proteolyse des Zellzyklusproteins führt.

In vitro war ein erhöhter Cyclin E-Spiegel in den folliculären Schilddrüsenzelllinien mit einer gesteigerten Proliferationsrate verbunden. Bezugnehmend auf dieses Ergebnis müßte man auch bei den Cyclin E-überexprimierenden folliculären Schilddrüsenkarzinomen eine vermehrte Zellteilung vermuten. Da Cyclin E in der Lage ist, den G1/S-Übergang unabhängig von pRb und dem Transkriptionsfaktor E2F zu steuern (Lukas et al., 1997), könnten die Cyclin E-überexprimierenden folliculären Tumorzellen die Cyclin D/ CDK4,6/ p16/ pRb-vermittelte Kontrolle am R-Punkt umgehen (Gray-Bablin et al., 1996). Sie hätten somit einen Wachstumsvorteil. Daraus ließe sich schlußfolgern, dass es sich bei den untersuchten folliculären Schilddrüsenkarzinomen um hoch-invasive folliculäre Tumoren handeln muß, die eine schlechtere Prognose im Vergleich zu den minimal-invasiven FTC aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden aber größtenteils folliculäre Schilddrüsenkarzinome mit T-Stadien kleiner 4 verwendet, so dass diese Hypothese eher unwahrscheinlich erscheint.

Eine andere Theorie für die Cyclin E-Überexpression in den folliculären Schilddrüsenkarzinomen könnte eine aberrante Lokalisation des Cyclin E-Moleküls sein. In der Mehrzahl der Malignome findet sich Cyclin E im Zellkern (Donnellan et Chetty, 1999). Bei der Westernblot-Analyse werden sowohl nukläre als auch extranukläre Proteine erfaßt. Zytoplasmatisches Cyclin E hätte keinen Einfluß auf die Steuerung der DNS-Regulation im Zellkern und wäre damit nicht an der Kontrolle des Zellwachstums beteiligt. Um dieser Frage nachzugehen, müßten immunhistochemische Färbungen der hier untersuchten folliculären Schilddrüsenkarzinome vorgenommen und zusätzlich der Ki-67-Index als Proliferationsmarker bestimmt werden.

Eine Veränderung der Zellzyklusregulation im Sinne einer positiven Rückkopplung zwischen p27 und Cyclin E wäre ebenfalls denkbar und wird in Kapitel 4.5 ausführlich behandelt.

4.3.3 Expression von Cyclin E in UTC, PTC

Überraschenderweise wurden in den aggressiveren undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC) ähnliche Expressionswerte für Cyclin E wie in den papillären Schilddrüsentumoren (PTC) ermittelt. Scheinbar sind hohe Cyclin E-Spiegel nicht in allen Malignomen zwangsläufig mit einem geringen Differenzierungsgrad und einer ungünstigen Prognose assoziiert. Während in einigen Studien hohe Cyclin E-Level mit einer geringen Überlebensrate einhergingen (Mammakarzinome: Porter et al., 1997; maligne Lymphome: Erlanson et al., 1998; nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome: Mueller-Tidow et al., 2001), waren in Harnblasen- und kolorektalen Tumoren gerade niedrige Cyclin E-Spiegel mit den oben genannten klinisch-pathologischen Merkmalen verknüpft (Del Pizzo et al., 1999; Kamai et al., 2001; Li et al., 2001). Dagegen unterschieden sich nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome mit verschiedenem

Differenzierungsgrad nicht in ihrer Cyclin E-Expression (Fukuse et al., 2000). Lazzereschi et al. (1998) fanden eine schwache nukleäre Cyclin E-Färbung in follikulären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen, die mit der Proliferationsrate korreliert war. Allerdings kann man diesem Ergebnis nur eine geringe Aussagekraft beimessen, da jeweils nur eine Gewebeprobe untersucht wurde.

Orientiert man sich an dem entdeckten Zusammenhang zwischen der Cyclin E-Expression und dem Wachstumsverhalten in den untersuchten Schilddrüsenzelllinien, stellt sich die Frage, warum gerade die rasch infiltrierenden anaplastischen Schilddrüsenkarzinomgewebe so niedrige Cyclin E-Spiegel zeigten. Dieses Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass aufgrund der Größe der meisten undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome nur zentrale Tumorregionen untersucht werden konnten und nicht die invasiven Randgebiete, in denen eine vermehrte Zellteilung erfolgt.

Hinweise auf eine Tumorprogression trotz niedrigem Cyclin E-Level geben auch einige Forschungsarbeiten. Zum einen besitzt Cyclin E in Mammakarzinomzellen eine 10 mal höhere Aktivität im Vergleich zum Normalgewebe (Harwell et al., 2000). Potentiell wären also in den hochmalignen undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen auch niedrige Cyclin E-Spiegel in der Lage, die Zellzykluspassage zu beschleunigen. Andererseits initiieren Cyclin E/CDK2-Komplexe am G1/S-Übergang die Zentrosom-Duplikation durch die Phosphorylierung von Nucleophosmin/B23 (Lacey et al., 1999). Ein Funktionsverlust des Nucleophosmins oder der CDK2 durch Cyclin E-Unterexpression in anaplastischen Schilddrüsenkrebszellen hätte somit eine unkontrollierte Zellproliferation zur Folge. Die Bildung von aktiven Komplexen aus CDK2 und niedermolekularen Varianten des Cyclin E fördert zusätzlich die Proliferation von Tumorzellen (Keyomarsi et al., 1995). Cyclin E-Isoformen mit geringerem Molekulargewicht entstehen durch alternativen Translationsstart, vorzeitige Beendigung der Translation oder Proteolyse (Harwell et al., 2000). Tumorzellen vermögen, das wildtyp-Molekül durch eine tumorspezifische Protease zu spalten. Diese enzymatische Reaktion resultiert nicht aus der Cyclin E-Überexpression, da normale Zellen mit hohen Cyclin E-Spiegeln keine Isoformen aufweisen (Harwell et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden niedermolekulare Spaltprodukte von Cyclin E nur in follikulären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen beobachtet. Diese Interaktion zwischen Cyclin E-Isoformen und CDK2 könnte ebenfalls das aggressive Wachstumsverhalten der anaplastischen Schilddrüsentumoren erklären.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu beantworten, ob die Cyclin E-Expression nur die Proliferation in transformierten Zellen widerspiegelt oder ob erhöhte Cyclin E-Level einen bestimmten malignen Phänotyp von Schilddrüsenkarzinomen kennzeichnen.

4.3.4 Cyclin E-Expression und pTNM-Stadium

Obwohl die Cyclin E-Expression in vitro mit der Wachstumsrate korrelierte, fand sich keine Assoziation zwischen dem Cyclin E-Spiegel und der TumorgroÙe oder dem Metastasierungsgrad in den Schilddrüsenkarzinomgeweben.

Diese Diskrepanz wird durch die Arbeit von Ohtsubo et Roberts (1993) bestätigt. Sie wiesen nach, dass eine Cyclin E-Überexpression zu einer verkürzten G1-Phase führt und das Zellvolumen dabei um 30% abnimmt. Ebenso exprimierten große, fortgeschrittene Kolontumoren Cyclin E nur in geringem Maße, obgleich gerade hohe Cyclin E-Level mit einem gesteigerten Proliferationsindex einhergingen (Li et al., 2001).

Dagegen zeigten Brzezinski et al. (2004) eine positive Korrelation zwischen der Cyclin E-Expression und dem T-Stadium in papillären Schilddrüsenkarzinomen. Daher gilt auch hier, die geringe Zahl der untersuchten Schilddrüsenkarzinomgewebe in den einzelnen Stadiengruppen zu bedenken.

4.4 Cyclin D3 in Schilddrüsen Geweben

4.4.1 Expression von Cyclin D3 in nicht-transformierten Schilddrüsen Geweben

In der vorliegenden Studie waren die Schilddrüsennormalgewebe, die durch eine geringe Mitosezahl charakterisiert sind (Saiz et al., 2002), negativ für Cyclin D3. Dieses Ergebnis stimmt mit Untersuchungen von normalem Parenchym anderer Organe überein (Doglioni et al., 1998; Wong et al., 2001; Hedberg et al., 2002b). Die fehlende Cyclin D3-Expression in Zellen, von denen die Mehrheit der Schilddrüsenkarzinome abstammen, läÙt auf eine bedeutende Rolle des Zellzyklusproteins bei der malignen Transformation schließen.

4.4.2 Rolle von Cyclin D3 in Schilddrüsenkarzinomen

Im Gegensatz zu den untersuchten Normalgeweben zeigten die untersuchten Schilddrüsenmalignome ein heterogenes Expressionsverhalten für Cyclin D3. Dabei fand sich in der Mehrzahl der follikulären (62,5%) und undifferenzierten (66,7%) Schilddrüsenkarzinome eine Überexpression des Zellzyklusproteins, während nur in einer papillären Lymphknotenmetastase ein hoher Cyclin D3-Spiegel gemessen wurde. Die Gültigkeit dieser Ergebnisse wird durch immunhistochemische Studien von Doglioni et al. (1998) und Ebert et al. (2001) verstärkt, die eine inhomogene Expression von Cyclin D3 in über 400 epithelialen Neoplasien beobachteten.

Bisher ist nur sehr wenig über die thyroideale Funktion von Cyclin D3 und seine Deregulation in Schilddrüsenkrebszellen bekannt. In vitro hing das Wachstumsverhalten der Schilddrüsenzelllinien vom Cyclin D3-Spiegel ab. Dies läÙt vermuten, dass Cyclin D3 auch in den untersuchten thyroidalen

Tumorgewebe an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist. In einigen Tumoren korrelierte die Cyclin D3-Expression mit der Teilungsrate (superfizielle maligne Melanome: Flørenes et al., 2000; Nierenzellkarzinome: Hedberg et al., 2002b), während sich in anderen Geweben der mitotische Index nicht proportional zum Cyclin D3-Spiegel verhielt (Lungenkarzinome: Usuda et al., 1996; Mammakarzinome: Wong et al., 2001). Aufgrund dieser Differenz nimmt man an, dass Cyclin D3 neben der G1/S-Regulation noch andere Aufgaben erfüllt. So wurde Cyclin D3 im Zytoplasma von meiotisch aktiven männlichen Keimzellen gefunden (Kang et al., 1997) und führte in anderen Zellen zu einer Hemmung der Differenzierung (Kato et Sherr, 1993). Li et al. (1997) gehen dagegen von einer Steuerung des G0/G1-Übergangs durch Cyclin D3 aus, die dem Zellzyklusprotein sowohl die Initiation von Wachstum als auch Differenzierung ermöglicht. Diese Doppelfunktion von Cyclin D3 erschwert die Interpretation der oben genannten Resultate. Sowohl die Rolle von Cyclin D3 bei der Regulation der Zellteilung als auch seine Bedeutung im Dedifferenzierungsprozess könnte das fehlende Vorkommen von Cyclin D3 in den Normalgeweben, die niedrigen Cyclin D3-Spiegel in den papillären Schilddrüsenkarzinomen und die Überexpression des Zellzyklusproteins in den meisten undifferenzierten Schilddrüsentumoren erklären. Unklar bleibt dabei, warum die follikulären Schilddrüsenmalignome Cyclin D3 größtenteils überexprimierten und sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied zwischen follikulären Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen hinsichtlich der Cyclin D3-Level ergab.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob in den Schilddrüsentumoren Cyclin D3 wirklich selbst eine gesteigerte Proliferation induziert oder als Mediator für andere wachstumslimitierende Parameter fungiert. So wurde beispielsweise in Pankreaskarzinomzellen ein 20facher Anstieg der Cyclin D3-Expression nach Behandlung mit dem Wachstumsfaktor Amphiregulin beobachtet (Ebert et al., 2001). Zusätzlich wird die Wirksamkeit von Cyclin D3 durch das Vorhandensein und die Interaktion mit verschiedenen CDK-Partnern beeinflusst (Kato et Sherr, 1993). In TSH-stimulierten tierischen Thyreozyten scheint Cyclin D3 hauptsächlich in die Induktion der DNS-Synthese involviert zu sein (Depoortere et al., 1998; Motti et al., 2003). Voraussetzung für die Bildung von aktiven Cyclin D3/CDK4-Komplexen ist allerdings die Phosphorylierung des Holoenzym im Zellkern. Die Transduktion des Phosphatmoleküls hängt dabei von der c-AMP-Konzentration innerhalb der Schilddrüsenepithelzelle ab (Paternot et al., 2003). Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, um genauere Erkenntnisse über die Bedeutung von Cyclin D3 bei der thyroidalen Karzinogenese zu gewinnen.

4.4.3 Cyclin D3-Expression und pTNM-Stadium

Cyclin D3 hatte einen wachstumsfördernden Effekt auf die untersuchten Schilddrüsenzelllinien. Dennoch wirkte sich die Cyclin D3-Expression nicht auf das pTNM-Stadium der thyroidalen Karzinomgewebe aus.

Ein erhöhter Cyclin D3-Spiegel wurde in fortgeschrittenen Nieren- (Hedberg et al., 2002b) und Mammakarzinomen (Wong et al., 2001) gefunden, während sich minimal-invasive Lungenkarzinome nicht von fortgeschrittenen pulmonalen Malignomen unterschieden (Usuda et al., 1996).

Wahrscheinlich sind mehrere D-type Cycline an der Tumorprogression von Schilddrüsenkarzinomen beteiligt. Die Mikroinjektion eines Kinaseinhibitors wie p16, der alle Cyclin D-Komplexe hemmt, führte zu einem potenteren G1-Block als die einzelne Neutralisierung von Cyclin D1 oder Cyclin D3 (Bartkova et al., 1998). Weiterhin konnten Flørenes et al. (2000) in 67% der untersuchten malignen Melanome eine koordinierte Expression von Cyclin D1 und D3 nachweisen.

Andererseits könnte hieraus geschlußfolgert werden, dass die Passage des R-Punktes in Schilddrüsenkrebszellen tatsächlich durch die bereits beschriebene c-AMP-abhängige Phosphorylierung von Cyclin D3/CDK4-Komplexen (Paternot et al., 2003) bestimmt wird.

Wie bei den Ergebnissen von p27 und Cyclin E ist hier ebenfalls die geringe Fallzahl der untersuchten Gewebe zu beachten.

4.5 Assoziation zwischen p27, Cyclin E und Cyclin D3

Nicht nur die absolute Menge, sondern auch die Balance zwischen den Zellzyklusregulatoren beeinflusst die Tumorprogression. Rückkopplungsmechanismen halten die homöostatische Kontrolle zwischen positiven und inhibitorischen Schlüsselproteinen am G1/S-Übergang aufrecht (Del Pizzo et al., 1999). In Harnblasenkarzinomen (Kamai et al., 2001) und malignen Lymphomen (Erlanson et al., 1998) wurde eine inverse Korrelation zwischen p27 und Cyclin E bestimmt. Andere Tumorzellen zeichneten sich durch hohe Level von p27 und Cyclin D1 aus (Fredersdorf et al., 1997; Yamamoto et al., 1999). Der Zusammenhang zwischen einzelnen Zellzyklusproteinen wurde in Schilddrüsenneoplasien bisher nicht erfaßt.

P27 und Cyclin E/ Cyclin D3 steuern die Zellzykluspassage in umgekehrter Weise. Zusätzlich triggern Cyclin E/CDK2-Moleküle die p27-Proteolyse (Sheaff et al., 1997). Dies verleitet zur Annahme, dass ein niedriger p27-Spiegel mit einer Überexpression von Cyclin E oder Cyclin D3 in den untersuchten Schilddrüsenkarzinomen einhergeht. Eine solche negative Assoziation fand sich in der vorliegenden Arbeit nur in den papillären Schilddrüsenkarzinomen ($p = 0,000$). Im Gegensatz dazu war in den follikulären Schilddrüsentumoren ein hoher

p27-Spiegel mit einem vermehrten Vorkommen von Cyclin E verbunden ($p = 0,000$). Da p27 Cyclin E/CDK-Komplexe inhibiert, ist es möglich, dass die folliculären Tumorzellen die p27-vermittelte Wachstumsblockade durch Überexpression von Cyclin E überwinden. Hohe Cyclin E-Spiegel können also im Sinne einer positiven Rückkopplung durch p27 inaktiviert werden (Chetty, 2002). Unklar bleibt dabei, ob die p27-Akkumulation eine Überexpression von Cyclin E induziert oder Folge dieser ist. Obwohl in einigen FTC hohe p27- und Cyclin D3-Spiegel beobachtet wurden, ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Zellzyklusproteinen ($p = 0,546$). Baldassarre et al. (1999) erklärten diesen Zusammenhang durch die zytoplasmatische Zurückhaltung von p27 nach seiner Bindung an Cyclin D3/CDK-Moleküle. Ähnlich den papillären Schilddrüsenkarzinomen zeigten die undifferenzierten Schilddrüsenmalignome eine inverse Beziehung zwischen p27 und Cyclin D3 ($p = 0,024$), während ausnahmslos niedrige p27-Level mit einer Cyclin E-Unterexpression korrelierten ($p = 0,000$). Die Downregulation von Cyclin E in undifferenzierten Schilddrüsentumoren könnte dabei als sekundäres Phänomen interpretiert werden. Del Pizzo et al. (1999) begründeten die niedrigen Cyclin E-Spiegel in schlecht differenzierten Harnblasenkarzinomen als einen Versuch, die geringe p27-Expression während des Tumorstadiums auszugleichen. Vermutlich resultiert die schlechte Prognose der anaplastischen Schilddrüsenkarzinome aus einer Insuffizienz der beschriebenen Rückkopplungshemmung. Diese These wird durch die fehlende Korrelation zwischen der Cyclin E-Expression und CDK2-Aktivität in Mammakarzinomzellen untermauert (Lodén et al., 1999). Demnach wäre denkbar, dass Cyclin E nur einen groben Regulator der Kinase 2 darstellt, wogegen p27 die Feinsteuerung für die Proliferation der Schilddrüsenkrebszellen übernimmt. In vitro ließ sich jedoch nur ein Zusammenhang zwischen der Cyclin E/ Cyclin D3-Expression und der Wachstumsrate nachweisen. Passend dazu fand sich eine positive Korrelation zwischen der Cyclin E- und Cyclin D3-Expression in den langsamer wachsenden papillären Schilddrüsentumoren ($p = 0,000$) als auch eine Tendenz dazu in den folliculären Schilddrüsenkarzinomen ($p = 0,114$). Dagegen wurde in den anaplastischen Tumoren ein gegenläufiges Expressionsmuster der beiden Zellzyklusproteine ermittelt ($p = 0,000$). Im Hinblick auf die Vermutung, dass sich undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome aus präexistenten gut-differenzierten Schilddrüsentumoren entwickeln (Ordonez et al., 1991; Venkatesh et al., 1990; Goerges, 2001), geht scheinbar mit zunehmender Dedifferenzierung die Effizienz der Rückkopplungsmechanismen verloren. Somit könnte man schlußfolgern, dass die Kombination dieses Effektes mit einer eingeschränkten Apoptosefunktion, bedingt durch die p27-Unterexpression, zum aggressiven Tumorverhalten der undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome führt.

4.6 Klinische Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse

Ziel intensiver Forschungen über den Zellzyklus in Schilddrüsenmalignomen ist es, neue Behandlungswege in der Onkologie zu eröffnen, um die etablierte operative Tumorthherapie (Schumacher et al., 2000) zu ergänzen. Gelänge es theoretisch, den vorzeitigen Abbau des Tumorsuppressorproteins p27 in den undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen zu verhindern, könnte das aggressive Tumorverhalten gebremst und damit die Überlebensrate der Patienten verbessert werden. Tatsächlich hemmen Vitamin D3-Analoga die Proteolyse von p27 in Schilddrüsenkarzinomzellen und führen dadurch zur Akkumulation des Zellzyklusproteins (Liu et al., 2002). Weiterhin fördert die Behandlung mit anti-IgM die p21-vermittelte Wachstumsblockade (Marches et al., 1998). Neben der Induktion von Tumorsuppressorproteinen wurden synthetische Kinaseinhibitoren, wie Flavopiridol, entwickelt. Sie haben einen antiproliferativen Effekt (Carlson et al., 1996) und steigern die Apoptose in verschiedenen Zelllinien (Parker et al., 1998). Jedoch erbrachte eine klinische Studie mit Nierenkarzinom-Patienten keinen signifikanten therapeutischen Erfolg (Stadler et al., 2000). Eine andere Strategie beinhaltet die Beeinflussung der Radiosensitivität von Tumoren durch Zellzyklusproteine. In Lungenkrebszellen mit hohen Cyclin E-Spiegeln und geringer p27-Expression ließ sich eine effektivere Bestrahlung erzielen (Sirzén et al., 1997).

Weitere sorgfältige Forschungen sind notwendig, um die Krebstherapie schrittweise zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Kontrollpunkte im Zellzyklus haben die Aufgabe, im Falle einer DNS-Schädigung die Weitergabe der Erbsubstanz zu verhindern. Dabei stellt der G1/S-Übergang einen der wichtigsten Schritte im Zellzyklus dar. P27, Cyclin E und Cyclin D3 gehören zu den Schlüsselproteinen, die durch die Interaktion mit ihren Partnerenzymen, den Eintritt in die S-Phase steuern. Eine Funktionsstörung des G1/S-Kontrollpunktes durch einen Mangel an Inhibitoreiweißen wie p27 oder durch eine Cyclin-Überexpression führt zu einer autonomen Zellteilung. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression dieser Zellzyklusfaktoren in Schilddrüsenzelllinien und -geweben untersucht, um Aufschlüsse über die Regulation der Zellproliferation und thyroidalen Karzinogenese zu gewinnen.

1. Wie erwartet, korrelierte die Cyclin E- und Cyclin D3-Expression mit der Proliferationsrate in den Schilddrüsenzelllinien. Dagegen hatte die Höhe des p27-Spiegels keinen Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Schilddrüsenkrebszellen.
2. Überraschenderweise zeigten die normalen Schilddrüsenorgane nur ein geringes Vorkommen von p27. Entsprechend der Ausgangshypothese fand sich eine signifikante p27-Überexpression in den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu den niedrigen Leveln des Zellzyklusproteins in UTC.
3. Normalgewebe, PTC und UTC wiesen eine Unterexpression von Cyclin E auf. In den FTC wurden hohe Cyclin E-Spiegel gemessen. Somit konnte nur im Falle der Normalgewebe und PTC die vorangegangene Hypothese bestätigt werden.
4. Die nicht-transformierten Schilddrüsenorgane waren negativ für Cyclin D3. Beim Vergleich der Tumorgewebe ließ sich in der Mehrzahl der FTC und UTC eine Überexpression des Zellzyklusproteins ermitteln, während die PTC, bis auf eine Ausnahme, niedrige Spiegel des Zellzyklusproteins zeigten.
5. Im Hinblick auf die Tumorgroße und den Metastasierungsgrad konnte keine Korrelation mit dem Expressionsgrad von p27, Cyclin E oder Cyclin D3 festgestellt werden.
6. Lediglich in den FTC fand sich ein grenzwertig signifikanter Unterschied zwischen Primärtumoren und Lymphknotenmetastasen hinsichtlich der Cyclin D3-Expression.

7. Bezugnehmend auf die Koexpression einzelner Zellzyklusfaktoren lassen sich folgende Ergebnisse zusammenfassen:

- PTC: - inverse Korrelation zwischen p27 und Cyclin E
- inverse Korrelation zwischen p27 und Cyclin D3
- positive Korrelation zwischen Cyclin E und Cyclin D3
- FTC: - positive Korrelation zwischen p27 und Cyclin E
- keine signifikante Korrelation zwischen p27 und Cyclin D3
- keine signifikante Korrelation zwischen Cyclin E und Cyclin D3
- UTC: - negative Korrelation zwischen p27 und Cyclin E
- inverse Korrelation zwischen p27 und Cyclin D3
- inverse Korrelation zwischen Cyclin E und Cyclin D3

Im Hinblick auf die Theorie, dass sich undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome aus präexistenten gut-differenzierten Schilddrüsentumoren entwickeln (Ordóñez et al., 1991; Venkatesh et al., 1990; Goerges, 2001), läßt der signifikante Unterschied in der p27-Expression zwischen den untersuchten papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu den anaplastischen Schilddrüsentumoren vermuten, dass p27 eine wichtige Rolle im Dedifferenzierungsprozess von thyroidalen Malignomen spielt. Wahrscheinlich wird p27 in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen abgebaut, bevor es seine inhibitorische Funktion im Zellzyklus wahrnehmen kann. Möglicherweise beeinflußt die verminderte Interaktion von p27 mit CDK4 in Schilddrüsenkarzinomen diesen Dedifferenzierungsprozess. Ein niedriger p27-Spiegel könnte also einen Marker für eine beginnende Dedifferenzierung darstellen und somit eine Aussage über die Prognose von entdeckten Schilddrüsenkarzinomen geben. Zusätzlich geht scheinbar im Zuge der Dedifferenzierung die Balance zwischen den Zellzyklusfaktoren verloren. Die Kombination dieses Effektes mit einer Downregulation von p27 könnte die Ursache für die rasche Expansion und frühe Metastasierung der anaplastischen Schilddrüsenkarzinome sein.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die inhibitorische Bedeutung von p27 im Dedifferenzierungsprozess in Schilddrüsenmalignomen und den damit verbundenen Einfluß auf den Krankheitsverlauf zu klären.

6 Literaturverzeichnis

1. Baldassarre G, Belletti B, Bruni P, Boccia A, Trapasso F, Pentimalli F, Barone MV, Chiappetta G, Vento MT, Spiezia St, Fusco A, Viglietto G: Overexpressed cyclin D3 contributes to retaining the growth inhibitor p27 in the cytoplasm of thyroid tumor cells. *J Clin Invest* 104 (1999) 865-874
2. Bartkova J, Lukas J, Strauss M, Bartek J: Cyclin D3: requirement for G1/S transition and high abundance in quiescent tissues suggest a dual role in proliferation and differentiation. *Oncogene* 17 (1998) 1027-1037
3. Bartkova J, Zemanova M, Bartek J: Abundance and subcellular localization of cyclin D3 in human tumours. *J Int Oncol* 65 (1996) 323-327
4. Bortner DM, Rosenberg MP: Induction of mammary gland hyperplasia and carcinomas in transgenic mice expressing human cyclin E. *Mol Cell Biol* 17 (1997) 453-459
5. Botz J, Zerfass-Thome K, Spitkovsky D, Delius H, Vogt B, Eilers M, Hatzigeorgiou A, Jansen-Durr P: Cell cycle regulation of the murine cyclin E gene depends on an E2F binding site in the promotor. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 3401-3409
6. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72 (1976) 248-254
7. Brzezinski J, Migodzinski A, Gosek A, Tazbir J, Dedecjus M: Cyclin E expression in papillary thyroid carcinoma: relation to staging. *Int J Cancer* 109 (2004) 102-105
8. Carlisle MR, McDougall IR: Familial differentiated carcinoma of the thyroid. In: Biersack HJ, Grünwald F (Hrsg): *Thyroid cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 2001, S. 55-67
9. Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ: Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase (CDK)2 and CDK4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 56 (1996) 2973-2978
10. Catzavelos GC, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM: Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nat Med* 3 (1997) 227-230
11. Chetty R: Cyclin E and p27/Kip1: two proteins on a see-saw or another false dawn?. *Histopathology* 40 (2002) 393-394
12. Cheville JC, Lloyd RV, Sebo TJ, Cheng L, Erickson L, Bostwick DG, Lohse CM, Wollan P: Expression of p27Kip1 in prostatic adenocarcinoma. *Mod Pathol* 11 (1998) 324-328

13. Chow SM, Law St CK, Mendenhall WM, Au SK, Yau St, Yuen KT, Law CC, Lau WH: Follicular thyroid carcinoma: prognostic factors and the role of radioiodine. *Cancer* 95 (2002) 488-498
14. Clurman BE, Sheaff RJ, Thress K, Groudine M, Roberts JM: Turnover of cyclin E by the ubiquitin-proteasome pathway is regulated by CDK2 binding and cyclin phosphorylation. *Genes Dev* 10 (1996) 1979-1990
15. Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM: Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 272 (1996) 877-880
16. Coburn MC, Wanebo HJ: Age correlates with increased frequency of high risk factors in elderly patients with thyroid cancer. *Am J Surg* 170 (1995) 471-475
17. Croix BS, Flørenes VA, Rak JW, Flanagan M, Bhattacharya N, Slingerland JM, Kerbel RS: Impact of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 on resistance of tumor cells to anticancer agents. *Nat Med* 2 (1996) 1204-1210
18. D'Angiolella V, Costanzo V, Gottesman ME, Avvedimento EV, Gautier J, Grieco D: Role for cyclin-dependent kinase 2 in mitosis exit. *Curr Biol* 11 (2001) 1221-1226
19. Del Pizzo JJ, Borkowski A, Jacobs SC, Kyprianou N: Loss of cell cycle regulators p27(Kip1) and cyclin E in transitional cell carcinoma of the bladder correlates with tumor grade and patient survival. *Am J Pathol* 155 (1999) 1129-1136
20. De Mario A: Protein blotting and immunoblotting using nitrocellulose membranes. In: Dunbar BS (Hrsg): *Protein blotting: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto (usw.), 1994, S. 11-32
21. Depoortere F, Dumont JE, Roger PP: Paradoxical accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1 during the cAMP-dependent mitogenic stimulation of thyroid epithelial cells. *J Cell Sci* 109 (1996) 1759-1764
22. Depoortere F, Van Keymeulen A, Lukas J, Costagliola S, Bartkova J, Dumont JE, Bartek J, Roger PP, Dremier S: A requirement for cyclin D3-cyclin-dependent kinase (cdk)-4 assembly in the cyclic adenosine monophosphate-dependent proliferation of thyrocytes. *J Cell Biol* 140 (1998) 1427-1439
23. Doglioni C, Chiarelli C, Macrí E, Dei Tos AP, Meggiolaro E, Palma PD, Barbareschi M: Cyclin D3 expression in normal, reactive and neoplastic tissues. *J Pathol* 185 (1998) 159-166
24. Donghi R, Longoni A, Pilotti S, Michieli P, Porta GD, Pierotti MA: Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland. *J Clin Invest* 91 (1993) 1753-1760
25. Donnellan R, Chetty R: Cyclin E in human cancers. *FASEB J* 13 (1999) 773-780

26. Durrant I, Fowler S: Chemiluminescent detection systems for protein blotting. In: Dunbar BS (Hrsg): Protein blotting: a practical approach. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto (usw.), 1994, S.141-152
27. Ebert MP, Hernberg S, Fei G, Sokolowski A, Schulz HU, Lippert H, Malfertheiner P: Induction and expression of cyclin D3 in human pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 127 (2001) 449-454
28. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B: WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75 (1993) 817-825
29. Elledge SJ, Harper JW: The role of protein stability in the cell cycle and cancer. *Biochim Biophys Acta* 1377 (1998) M61-70
30. Erickson LA, Jin L, Wollan PC, Thompson GB, van Heerden J, Lloyd RV: Expression of p27kip1 and Ki-67 in benign and malignant thyroid tumors. *Mod Pathol* 11 (1998) 169-174
31. Erickson LA, Yousef OM, Jin L, Lohse BS, Pankratz VS, Lloyd RV: p27kip1 expression distinguishes papillary hyperplasia in Graves' disease from papillary thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 13 (2000) 1014-1019
32. Erlanson M, Portin C, Linderholm B, Lindh J, Roos G, Landberg G: Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas- prognostic implications. *Blood* 92 (1998) 770-777
33. Esposito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A: Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 57 (1997) 3381-3385
34. Evan GI, Vousden KH: Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411 (2001) 342-348
35. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T: Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33 (1983) 389-396
36. Farid NR: p53 mutations in thyroid carcinoma: tidings from an old foe. *J Endocrinol Invest* 24 (2001) 536-545
37. Farid NR, Shi Y, Zou M: Molecular basis of thyroid cancer. *Endocr Rev* 15 (1994) 202-232
38. Feliciello A, Gallo A, Mele E, Porcellini A, Troncone G, Garbi C, Gottesman ME, Avvedimento EV: The localization and activity of cAMP-dependent protein kinase affect cell cycle progression in thyroid cells. *J Biol Chem* 275 (2000) 303-311
39. Fey MF: Molekulare Therapie bei malignen Tumoren. *Schweiz Med Wochenschr* 129 (1999) 1758-1763
40. Fey MF: Zellzyklus und Krebs- von der Tumorzell-Linie zum Patienten. *Praxis* 89 (2000) 435-437

41. Fink A, Tomlinson G, Freeman JL, Rosen IB, Asa SL: Occult micropapillary carcinoma associated with benign follicular thyroid disease and unrelated thyroid neoplasms. *Mod Pathol* 9 (1996) 816-820
42. Flørenes VA, Faye RS, Mælandsmo GM, Nesland JM, Holm R: Levels of cyclin D1 and D3 in malignant melanoma: deregulated cyclin D3 expression is associated with poor clinical outcome in superficial melanoma. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 3614-3620
43. Fredersdorf S, Burns J, Milne AM, Packham G, Fallis L, Gillett CE, Royds JA, Peston D, Hall PA, Hanby AM, Barnes DM, Shousha S, O'Hare MJ, Lu X: High level expression of p27(kip1) and cyclin D1 in some human breast cancer cells: inverse correlation between the expression of p27kip1 and degree of malignancy in human breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 6380-6385
44. Freitag T, Baier A, Dewitz D: Alters- und Geschlechtsverteilung beim primären Schilddrüsenmalignom in Abhängigkeit vom Tumortyp. *Zentralbl Chir* 124 (1999) 331-335
45. Fukuse T, Hirata T, Naiki H, Hitomi S, Wada H: Prognostic significance of cyclin E overexpression in resected non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 60 (2000) 242-244
46. Funk JO, Kind P: Zellzykluskontrolle, genetische Instabilität und Krebs. *Hautarzt* 48 (1997) 157-165
47. Geisen C, Möröy T: The oncogenic activity of cyclin E is not confined to CDK2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. *J Biol Chem* 277 (2002) 39909-39918
48. Geng Y, Eaton EN, Picon M, Roberts JM, Lundberg AS, Gifford A, Sardet C, Weinberg RA: Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene* 12 (1996) 1173-1180
49. Goerges R: The changing epidemiology of thyroid cancer. In: Biersack HJ, Grünwald F (Hrsg): *Thyroid cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 2001, S. 3-25
50. Goretzki PE, Frilling A, Simon D, Roeher HD: Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man. *Recent Results Cancer Res* 118 (1990) 48-63
51. Graña X, Reddy EP: Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors (CKIs). *Oncogene* 11 (1995) 211-219
52. Gray-Bablin J, Zalvide J, Fox MP, Knickerbocker CJ, DeCaprio JA, Keyomarsi K: Cyclin E, a redundant cyclin in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 15215-15220
53. Gretarsdottir S, Tryggvadottir L, Jonasson JG, Sigurdsson H, Olafsdottir K, Agnarsson BA, Ogmundsdottir H, Eyfjord JE: TP53 mutation analyses on breast carcinomas: a study of paraffin-embedded archival material. *Br J Cancer* 74 (1996) 555-561

54. Haas S, Bosch FX, Klein-Kühne W, Nollert J, Rudat V, Conradt C, Dietz A: Expression von Zellzykluskomponenten in fortgeschrittenen Kopf-Hals-Karzinomen. *HNO* 47 (1999) 777-786
55. Harwell RM, Porter DC, Danes C, Keyomarsi K: Processing of cyclin E differs between normal and tumor breast cells. *Cancer Res* 60 (2000) 481-489
56. Hedberg Y, Davoodi E, Ljungberg B, Roos G, Landberg G: Cyclin E and p27 protein content in human renal cell carcinoma: clinical outcome and associations with cyclin D. *Int J Cancer* 102 (2002a) 601-607
57. Hedberg Y, Ross G, Ljungberg B, Landberg G: Cyclin D3 protein content in human renal cell carcinoma in relation to cyclin D1 and clinicopathological parameters. *Acta Oncol* 41 (2002b) 175-181
58. Heldin HE, Gustavsson B, Claesson-Welsh L, Hammacher A, Mark J, Heldin CH, Westermark B: Aberrant expression of receptors for platelet-derived growth factor in an anaplastic thyroid carcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 85 (1988) 9302-9306
59. Hengst L, Reed SI: Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* 271 (1996) 1861-1864
60. Herzinger T, Reed SI: Cyclin D3 is rate-limiting for the G1/S phase transition in fibroblasts. *J Biol Chem* 273 (1998) 14958-14961
61. Ho YS, Tseng SC, Chin TY, Hsieh LL, Lin JD: p53 gene mutation in thyroid carcinoma. *Cancer Lett* 103 (1996) 57-63
62. Hoffmann S, Nies C, Rothmund M: Chirurgie des Schilddrüsenkarzinoms. *Ther Umsch* 56 (1999) 390-395
63. Hofstaedter F: Histopathology, immunohistochemistry, and molecular biology. In: Biersack HJ, Grünwald F (Hrsg): *Thyroid cancer*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.), 2001, S. 27-53
64. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science* 253 (1991) 49-53
65. Hommura F, Dosaka-Akita H, Mishina T, Nishi M, Kojima T, Hiroumi H, Ogura S, Shimizu M, Katoh H, Kawakami Y: Prognostic significance of p27KIP1 protein and Ki-67 growth fraction in non-small cell lung cancers. *Clin Cancer Res* 6 (2000) 4073-4081
66. Ito T, Seyama T, Hayashi Y, Hayashi T, Dohi K, Mizuno T, Iwamoto KS, Tsuyama N, Nakamura N, Akiyama M: Establishment of two human thyroid carcinoma cell lines (8305C, 8505C) bearing p53 gene mutations. *Int J Oncol* 4 (1994) 583-586
67. Jacks T, Weinberg RA: The expanding role of cell cycle regulators. *Science* 280 (1998) 1035-1036
68. Jacobson G: Protein blotting using semi-dry electrophoretic transfer equipment. In: Dunbar BS (Hrsg): *Protein blotting: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto (usw.), 1994, S. 53-70

69. Kamai T, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H, Yoshida KI: Decreasing of p27(Kip1) and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br J Cancer* 84 (2001) 1242-1251
70. Kang MJ, Kim MK, Terhune A, Park JK, Kim YH, Koh GY: Cytoplasmic localization of cyclin D3 in seminiferous tubules during testicular development. *Exp Cell Res* 234 (1997) 27-36
71. Kapranos N, Stathopoulos GP, Manolopoulos L, Kokka E, Papadimitriou C, Bibas A, Yiotakis J, Adamopoulos G: p53, p21 and p27 protein expression in head and neck cancer and their prognostic value. *Anticancer Res* 21 (2001) 521-528
72. Kassen A, Hofmockel G: Molekulargenetische und zellbiologische Grundlagen der Entstehung von malignen Tumoren. *Urologe [A]* 39 (2000) 214-221
73. Katayose Y, Kim M, Rakkar ANS, Li Z, Cowan KH, Seth P: Promoting apoptosis: a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Cancer Res* 57 (1997) 5441-5445
74. Kato JY, Sherr CJ: Inhibition of granulocyte differentiation by G1 cyclins D2 and D3 but not D1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 11513-11517
75. Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczynski S, Lee YY, Bartram CR, Koeffler HP: Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/Kip1 in human malignancies. *Cancer Res* 55 (1995) 2266-2269
76. Keyomarsi K, Conte D, Toyofuku W, Fox MP: Deregulation of cyclin E in breast cancer. *Oncogene* 11 (1995) 941-950
77. Keyomarsi K, O'Leary N, Molnar G, Lees E, Fingert HJ, Pardee AB: Cyclin E, a potential prognostic marker for breast cancer. *Cancer Res* 54 (1994) 380-385
78. Khoo MLC, Beasley NJP, Ezzat S, Freeman JL, Asa SL: Overexpression of cyclin D1 and underexpression of p27 predict lymph node metastasis in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 87 (2002a) 1814-1818
79. Khoo MLC, Freeman JL, Witterick IJ, Irish JC, Rotstein LE, Gullane PJ, Asa SL: Underexpression of p27/ Kip in thyroid papillary micro carcinomas with gross metastatic disease. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128 (2002b) 253-257
80. Kiess M, Gill RM, Hamel PA: Expression of the positive regulator of cell cycle progression, cyclin D3, is induced during differentiation of myoblasts into quiescent myotubes. *Oncogene* 10 (1995) 159-166
81. Kim DH, Lee HI, Nam ES, Shin HS, Sohn JH, Park CH, Yoon DS, Song SY, Park YE: Reduced expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 36 (2000) 245-251

82. Knudson AG: Hereditary cancer: two hits revisited. *J Cancer Res Clin Oncol* 122 (1996) 135-140
83. Kranenburg O, Scharnhorst V, Van der Eb AJ, Zantema A: Inhibition of cyclin-dependent kinase activity triggers neuronal differentiation of mouse neuroblastoma cells. *J Cell Biol* 131 (1995) 227-234
84. Lacey KR, Jackson PK, Stearns T: Cyclin-dependent kinase control of centrosome duplication. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (1999) 2817-2822
85. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-685
86. Lazzereschi D, Sambuco L, Scalzo CC, Ranieri A, Mincione G, Nardi F, Colletta G: Cyclin D1 and cyclin E expression in malignant thyroid cells and in human thyroid carcinomas. *Int J Cancer* 76 (1998) 806-811
87. Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y: Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 32 (2001) 945-953
88. Li JQ, Miki H, Wu F, Saoo K, Nishioka M, Ohmori M, Imaida K: Cyclin A correlates with carcinogenesis and metastasis, and p27(kip1) correlates with lymphatic invasion, in colorectal neoplasms. *Hum Pathol* 33 (2002) 1006-1015
89. Li Z, Hromchak R, Bloch A: Differential expression of proteins regulating cell cycle progression in growth vs. differentiation. *Biochim Biophys Acta* 1356 (1997) 149-159
90. Lindl T, Bauer J: *Zell- und Gewebekultur*. 2. Aufl., Gustav-Fischer, Lübeck, Stuttgart, Jena (usw.), 1989, S. 55-74
91. Liu W, Asa SL, Fantus IG, Walfish PG, Ezzat S: Vitamin D arrests thyroid carcinoma cell growth and induces p27 dephosphorylation and accumulation through PTEN/akt-dependent and -independent pathways. *Am J Pathol* 160 (2002) 511-519
92. Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E: Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol* 150 (1997) 401-407
93. Lodén M, Nielsen NH, Roos G, Emdin SO, Landberg G: Cyclin E dependent kinase activity in human breast cancer in relation to cyclin E, p27 and p21 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene* 18 (1999) 2557-2566
94. Lukas J, Herzinger T, Hansen K, Moroni MC, Resnitzky D, Helin K, Reed SI, Bartek J: Cyclin E-induced S phase without activation of the pRb/E2F pathway. *Genes Dev* 11 (1997) 1479-1492
95. Lundberg AS, Weinberg RA: Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer* 35 (1999) 531-539
96. Lundberg AS, Weinberg RA: Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 753-761

97. Malumbres M, Barbacid M: To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature Rev Cancer* 1 (2001) 222-231
98. Marches R, Scheuermann RH, Uhr JW: Cancer dormancy: role of cyclin-dependent kinase inhibitors in induction of cell cycle arrest mediated via membrane IgM. *Cancer Res* 58 (1998) 691-697
99. McDonald ER, El-Deiry WS: Cell cycle control as a basis for cancer drug development (review). *Int J Oncol* 16 (2000) 871-886
100. Migita T, Oda Y, Naito S, Tsuneyoshi M: Low expression of p27Kip1 is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Cancer* 94 (2002) 973-979
101. Molinari M: Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif* 33 (2000) 261-274
102. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65 (1983) 55-63
103. Motti ML, Boccia A, Belletti B, Bruni P, Troncone G, Cito L, Monaco M, Chiappetta G, Baldassarre G, Palombini L, Fusco A, Viglietto G: Critical role of cyclin D3 in TSH-dependent growth of thyrocytes and in hyperproliferative diseases of the thyroid gland. *Oncogene* 22 (2003) 7576-7586
104. Müller-Tidow C, Metzger R, Kügler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, Dockhorn-Dworniczak B, Schneider PM, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H: Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 61 (2001) 647-653
105. Muro-Cacho CA, Muñoz-Antonia T, Livingston S, Klotch D: Transforming growth factor beta receptors and p27kip in thyroid carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 125 (1999) 76-81
106. Musunuru K, Hinds PW: Cyclins and cyclin-dependent kinases. In: Musunuru K, Hinds PW (Hrsg): *Cell cycle regulators in cancer*. Karger Landes Systems, Basel, Freiburg, Paris (usw.), 1997a, S. 29-40
107. Musunuru K, Hinds PW: Cyclin-CDK regulation. In: Musunuru K, Hinds PW (Hrsg): *Cell cycle regulators in cancer*. Karger Landes Systems, Basel, Freiburg, Paris (usw.), 1997b, S. 70-87
108. Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K: Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* 85 (1996) 707-720
109. Nielsen NH, Arnerlöv C, Emdin SO, Landberg G: Cyclin E overexpression, a negative prognostic factor in breast cancer with strong correlation to oestrogen receptor status. *Br J Cancer* 74 (1996) 874-880

110. Nourse J, Firpo E, Flanagan WM, Coats S, Polyak K, Lee MH, Massague J, Crabtree GR, Roberts JM: Interleukin-2-mediated elimination of the p27Kip1 cyclin-dependent kinase inhibitor prevented by rapamycin. *Nature* 372 (1994) 570-573
111. Ohashi R, Gao C, Miyazaki M, Hamazaki K, Tsuji T, Inoue Y, Uemura T, Hirai R, Shimizu N, Namba M: Enhanced expression of cyclin E and A in human hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* 21 (2001) 657-662
112. Ohashi Y, Sasano H, Yamaki H, Shizawa S, Shineha R, Akaishi T, Satomi S, Nagura H: Cell cycle inhibitory protein p27 in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 19 (1999) 1843-1848
113. Ohtsubo M, Roberts JM: Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* 259 (1993) 1908-1912
114. Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K: Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* 103 (2000) 127-140
115. Ordonez NG, El-Naggar AK, Hickey RC, Samaan NA: Anaplastic thyroid carcinoma: immunocytochemical study of 32 cases. *Am J Pathol* 96 (1991) 15-24
116. Orr-Weaver TL, Weinberg RA: A checkpoint on the road to cancer. *Nature* 392 (1998) 223-224
117. Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, Beer-Romero P, Del Sal G, Chau V, Yew PR, Draetta GF, Rolfe M: Role of the ubiquitin-proteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *Science* 269 (1995) 682-685
118. Palmqvist R, Stenling R, Öberg A, Landberg G: Prognostic significance of p27(Kip1) expression in colorectal cancer: a clinico-pathological characterization. *J Pathol* 188 (1999) 18-23
119. Pardee AB: A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 71 (1974) 1286-1290
120. Parker BW, Kaur G, Nieves-Neira W, Taimi M, Kohlhagen G, Shimizu T, Losiewicz MD, Pommier Y, Sausville EA, Senderowicz AM: Early induction of apoptosis in hematopoietic cell lines after exposure to flavopiridol. *Blood* 91 (1998) 458-465
121. Paternot S, Coulonval K, Dumont JE, Roger PP: Cyclic AMP-dependent phosphorylation of cyclin D3-bound CDK4 determines the passage through the cell cycle restriction point in thyroid epithelial cells. *J Biol Chem* 278 (2003) 26533-26540
122. Pestell RG, Albanese C, Reutens AT, Segall JE, Lee RJ, Arnold A: The cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in hormonal regulation of proliferation and differentiation. *Endocr Rev* 20 (1999) 501-534

123. Pfannenstiel P, Saller B: Schilddrüsenkrankheiten: Diagnose und Therapie. 2. Aufl., Berliner Medizinische Verlagsanstalt, Berlin, 1992, S. 180-189
124. Pines J: Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat Cell Biol* 1 (1999) E73-79
125. Ponce-Castañeda MV, Lee MH, Latres E, Polyak K, Lacombe L, Montgomery K, Mathew S, Krauter K, Sheinfeld J, Massague J, Cordon-Cardo C: p27Kip1: chromosomal mapping to 12p12-12p13.1 and absence of mutations in human tumors. *Cancer Res* 55 (1995) 1211-1214
126. Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM: Expression of cell cycle regulators p27Kip1 and cyclin E, alone and in combination correlate with survival in young breast cancer patients. *Nat Med* 3 (1997) 222-225
127. Pschyrembel: Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin, 2002, S. 1711
128. Reiners C, Farahati J: Schilddrüsenmalignome. In: Meng W (Hrsg): Die Krankheiten der Schilddrüse. Urban & Fischer, Jena, 1999, S. 89-100
129. Resnick MB, Schacter P, Finkelstein Y, Kellner Y, Cohen O: Immunohistochemical analysis of p27/kip1 expression in thyroid carcinoma. *Mod Pathol* 11 (1998) 735-739
130. Reynisdottir I, Polyak K, Iavarone A, Massague J: Kip/cip and Ink4 CDK inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. *Genes Dev* 9 (1995) 1831-1845
131. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA: Follicular carcinoma. In: Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA (Hrsg): Tumors of the thyroid gland. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1992a, S. 49-63
132. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA: Papillary carcinoma. In: Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA (Hrsg): Tumors of the thyroid gland. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1992b, S. 65-96
133. Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA: Undifferentiated (anaplastic) carcinoma. In: Rosai J, Carcangiu ML, DeLellis RA (Hrsg): Tumors of the thyroid gland. Armed Forces Institute of Pathology, Washington D.C., 1992c, S. 135-159
134. Saiz AD, Olvera M, Rezk S, Florentine BA, McCourty A, Brynes R: Immunohistochemical expression of cyclin D1, E2F-1, and Ki-67 in benign and malignant thyroid lesions. *J Pathol* 198 (2002) 157-162
135. Sala A, Kundu M, Casella I, Engelhard A, Calabretta B, Grasso L, Paggi MG, Giordano A, Watson RJ, Khalili K, Peschle C: Activation of human B-MYB by cyclins. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 532-536
136. Salinovich O, Montelaro, RC: Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodiumdodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 156 (1986) 341-347

137. Schmid KW: Schilddrüsenkarzinom. *Praxis* 87 (1998) 367-374
138. Schumacher K, Arnold B, Reich G, Sill R, Stoll G: Therapie maligner Tumoren: Integration konventioneller und komplementärer Therapie. Schattauer, Stuttgart, 2000, S. 34-37
139. Scott KA, Walker RA: Lack of cyclin E immunoreactivity in non-malignant breast and association with proliferation in breast cancer. *Br J Cancer* 76 (1997) 1288-1292
140. Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE: Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 11 (1997) 1464-1478
141. Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 274 (1996) 1672-1677
142. Shibata H, Matsubara O, Wakiyama H, Tanaka S: The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Pathol Res Pract* 197 (2001) 157-164
143. Singh SP, Lipman J, Goldman H, Ellis FH, Aizenman L, Cangi MG, Signoretti S, Chiur DS, Pagano M, Loda M: Loss or altered subcellular localization of p27 in Barrett's associated adenocarcinoma. *Cancer Res* 58 (1998) 1730-1735
144. Sirzén F, Heiden T, Nilsson A, Bergh J, Skog S, Lewensohn R: Characterisation of the G1/S cell cycle checkpoint defect in lung carcinoma cells with different intrinsic radiosensitivities. *Anticancer Res* 17 (1997): 3381-3386
145. Slingerland J, Pagano M: Regulation of the CDK inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J Cell Physiol* 183 (2000) 10-17
146. Spruck CH, Won KA, Reed SI: Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 401 (1999) 297-300
147. Stadler WM, Vogelzang NJ, Amato R, Sosman J, Taber D, Liebowitz D, Vokes EE: Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in metastatic renal cancer: a University of Chicago phase II consortium study. *J Clin Oncol* 18 (2000) 371-375
148. Steeg PS, Abrams JS: Cancer prognostics: past, present and p27. *Nat Med* 3 (1997) 152-154
149. Takata T, Kudo Y, Zhao M, Ogawa I, Miyauchi M, Sato S, Cheng J, Nikai H: Reduced expression of p27(Kip1) protein in relation to salivary adenoid cystic carcinoma metastasis. *Cancer* 86 (1999) 928-935
150. Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, Zeltermann D, Viale G, Bosari S, Carcangiu ML: Downregulation of p27Kip1 and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol* 23 (1999) 678-685
151. Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K: Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-Cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem* 276 (2001) 21529-21537

152. Toyoshima H, Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 78 (1994) 67-74
153. Troncone G, Fulciniti F, Zeppa P, Vetrani A, Caleo A, Palombini L: Cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) expression in thyroid cells obtained by fine-needle aspiration biopsy: a preliminary report. *Diagn Cytopathol* 23 (2000) 77-81
154. Tsihlias J, Kapusta LR, De Boer G, Morava-Protzner I, Zbieranowski I, Bhattacharya N, Catzavelos GC, Klotz LH, Slingerland JM: Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. *Cancer Res* 58 (1998) 542-548
155. Usuda H, Saito T, Emura I: Immunohistochemistry of cyclin D3 in pulmonary carcinomas. *Virchows Arch* 428 (1996) 159-163
156. Van Dam A: Transfer and blocking conditions in immunoblotting. In: Dunbar BS (Hrsg): *Protein blotting: a practical approach*. Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto (usw.), 1994, S. 73-85
157. Venkatesh YS, Ordonez NG, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Samaan NA: Anaplastic carcinoma of the thyroid: a clinicopathologic study of 121 cases. *Cancer* 66 (1990) 321-330
158. Wang S, Wu J, Savas L, Patwardhan N, Khan A: The role of cell cycle regulatory proteins, cyclin D1, cyclin E, and p27 in thyroid carcinogenesis. *Hum Pathol* 29 (1998) 1304-1309
159. Wang X, Gorospe M, Huang Y, Holbrook NJ: p27Kip1 overexpression causes apoptotic death of mammalian cells. *Oncogene* 15 (1997) 2991-2997
160. Watson DS, Brotherick I, Shenton BK, Wilson RG, Angus B, Varma JS, Campbell FC: Cyclin D3 expression, cell proliferation and pathological stage of human primary colorectal cancer. *Oncology* 56 (1999) 66-72
161. Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81 (1995) 323-330
162. Weinberg RA: Wie Krebs entsteht. *Spektrum der Wissenschaft, Spezial* 5 (1999) 7-17
163. Williams ED: Thyroid tumorigenesis. *Horm Res* 42 (1994) 31-34
164. Wittekind C, Meyer HJ, Bootz F: *TNM-Klassifikation maligner Tumoren*, 6. Aufl., Springer, Berlin, New York (usw.), 2002, S. 49-52
165. Won KA, Reed SI: Activation of cyclin E/CDK2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J* 15 (1996) 4182-4193
166. Wong SC, Chan JKC, Lee KC, Hsiao WLW: Differential expression of p16/p21/p27 and cyclin D1/D3, and their relationships to cell proliferation, apoptosis, and tumour progression in invasive ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 194 (2001) 35-42

167. Wu J, Shen ZZ, Lu JS, Jiang M, Han QX, Fontana JA, Barsky SH, Shao ZM: Prognostic role p27Kip1 and apoptosis in human breast cancer. *Br J Cancer* 79 (1999) 1572-1578
168. Xiong Y, Menninger J, Beach D, Ward DC: Molecular cloning and chromosomal mapping of CCND genes encoding human D-type cyclins. *Genomics* 13 (1992) 575-584
169. Yamamoto H, Soh JW, Shirin H, Xing WQ, Lim JT, Yao Y, Slosberg E, Tomita N, Schieren I, Weinstein IB: Comparative effects of overexpression of p27Kip1 and p21Cip1/Waf1 on growth and differentiation in human colon carcinoma cells. *Oncogene* 18 (1999) 103-115
170. Zhao D, Tomono Y, Nose T: Expression of p27kip1 and Ki-67 in pituitary adenomas: an investigation of marker of adenoma invasiveness. *Acta Neurochir* 141 (1999) 187-192
171. Zhao J, Dynlacht B, Imai T, Hori T, Harlow E: Expression of NPAT, a novel substrate of cyclin E-CDK2, promotes S-phase entry. *Genes Dev* 12 (1998) 456-461

Medizinische Fachwörter

Adenom	gutartige Geschwulst mit Ursprung im Epithel
ätiologisch	ursächlich
Alteration	Veränderung
Amplifikation	Verstärkung, Vervielfältigung einer Basensequenz
Aneuploidie	Abweichung von der normalen Chromosomenzahl
Apoptose	programmierter Zelltod, der durch die genetische Information der betroffenen Zelle selbst reguliert wird
benigne	gutartig
Deletion	Verlust eines Chromosomenstückes
Disposition	Empfänglichkeit für gewisse Einflüsse oder Krankheiten
endogen	innerhalb des Körpers
endokrin	die sekretorischen Drüsen betreffend
Epithel	geschlossener Zellverband der innere oder äußere Körperoberflächen bedeckt
Epitop	Ort auf einem Antigen, an dem ein bestimmter Antikörper binden kann
Eukaryont	Lebewesen mit echtem Zellkern
exogen	außerhalb des Körpers
Fibroblast	Vorläuferzelle für die Bildung von Bindegewebe
Genese	Entstehung
Granulozyt	weißes Blutkörperchen mit segmentiertem Zellkern
hämatogen	mit dem Blut zusammenhängend
Histologie	Lehre von den Körpergeweben
Hypophyse	Hirnanhangsdrüse
Inzidenz	Anzahl der Neuerkrankungen innerhalb einer Bevölkerung innerhalb eines bestimmten Zeitraumes
Karzinom	bösartige Geschwulst mit Ursprung im Epithel
<i>Knockout</i>	gezielte Auslöschung eines Gens
Kolon	Grimmdarm, Hauptteil des Dickdarms
Lymphadenitis	Lymphknotenentzündung
lymphogen	mit dem lymphatischen Gewebe zusammenhängend
maligne	bösartig
Meiose	Teilung von Keimzellen, Reifeteilung
Melanom	Hautgeschwulst
Metastase	Tochtergeschwulst
Mitogene	Wachstumsfaktoren
Mitose	Teilung von Körperzellen
Mortalität	Sterblichkeitsrate
Myeloblast	Stammzelle im Knochenmark
Myoblast	Vorläuferzelle für die Bildung von Muskelgewebe

Nekrose	Gewebetod
Neoplasie	Neubildung
Neuroblastom	bösartiger Tumor, der vom sympathischen Nervengewebe ausgeht
Oligodendrozyten	große Zellen mit vielen Fortsätzen, die die Nervenfortsätze umhüllen
onkogen	tumorerzeugend oder tumorbedingt
Onkologie	Lehre von den Krebserkrankungen
organoide	organähnlich
Parenchym	Gewebe eines Organs
Pathogenese	Entstehung und Entwicklung einer Krankheit
Pathologie	Lehre von den abnormen und krankhaften Veränderungen im menschlichen Organismus
polymorph	vielgestaltig
Polypeptid	Eiweiß
post	nach
Progression	Fortschreiten
Proliferation	Zellteilung
Promotor	Bezeichnung für eine DNS-Sequenz, die als Erkennungs- bzw. Bindungsregion bei der Transkription dient
Replikation	Verdopplung
somatisch	körperlich
Struma	Vergrößerung der Schilddrüse
superfiziell	oberflächlich
supraklavikulär	oberhalb des Schlüsselbeins
Thyreoglobulin	Trägereiweiß für Schilddrüsenhormone
Thyreozyt	schilddrüsenhormonproduzierende Zelle
thyroidal	die Schilddrüse betreffend
trabekulär	bälkchenartig
Transduktion	Übertragung
Transformation	Umwandlung
Transkription	Übertragung der genetischen Information in Form einer m-RNS
Translation	Polypeptidkettenaufbau aus Aminosäuren gemäß der Reihenfolge der Basen der DNS bzw. RNS
Tumor	Geschwulst
Zentrosom	Zentriol oder Zentralkörperchen, das in einer Zelle doppelt vorkommt und eine wichtige Rolle bei der Zellteilung spielt
zervikal	den Hals betreffend
Zytoplasma	Grundplasma der Zelle

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und
Gefäßchirurgie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Direktor: Professor Dr. med. Henning Dralle

Arbeitsgruppe Experimentelle und Chirurgische Onkologie
Leiter: Privatdozent Dr. rer. nat. Cuong Hoang-Vu

Thesen der Dissertation
Untersuchungen zur Expression von
Zellzyklusregulatorproteinen in Zelllinien
und Geweben der Schilddrüse

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Jana Baumann
geboren am 18.05.1977 in Jena

1. Die Expression von Cyclin E und Cyclin D3 korrelierte signifikant mit der Proliferationsrate in den Schilddrüsenzelllinien. Hohe Cyclin E- oder Cyclin D3-Spiegel führen vermutlich zu einer beschleunigten Passage des G1/S-Kontrollpunktes in Schilddrüsenkarzinomzellen.
2. Dagegen war die p27-Expression nicht mit der Wachstumskinetik der Schilddrüsenzelllinien assoziiert. Wahrscheinlich beeinflusst p27 durch einen proliferationsunabhängigen Mechanismus die Progression von Schilddrüsenkrebszellen.
3. Die untersuchten thyroidalen Normalgewebe zeigten überraschenderweise eine Unterexpression von p27 als auch Cyclin E und waren negativ für Cyclin D3. Bezugnehmend auf die in vitro-Ergebnisse sind die niedrigen Cyclin E und Cyclin D3-Level als Ausdruck der geringen Proliferationsrate in den nicht-transformierten Schilddrüsen Geweben zu interpretieren.
4. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in der p27-Expression zwischen differenzierten und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen. Vermutlich wird p27 in undifferenzierten Schilddrüsentumoren abgebaut, bevor es seine inhibitorische Funktion im Zellzyklus wahrnehmen kann. Daraus läßt sich schlußfolgern, dass p27 eine wichtige Rolle im Dedifferenzierungsprozess von thyroidalen Tumoren spielt.
5. In den undifferenzierten und papillären Schilddrüsenkarzinomen fand sich eine Unterexpression von Cyclin E, die in starkem Kontrast zu den hohen Cyclin E-Spiegeln in den follikulären Schilddrüsentumoren stand. Somit könnten Cyclin E-überexprimierende follikuläre Tumorzellen die Kontrolle am G1/S-Übergang umgehen und hätten dadurch einen Wachstumsvorteil. Andererseits könnte eine vermehrte Aktivität des Zellzyklusproteins die Cyclin E-Unterexpression in den aggressiv wachsenden anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen erklären.
6. Niedermolekulare Isoformen von Cyclin E wurden ausschließlich in follikulären und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen beobachtet. Potentiell könnten diese Spaltprodukte durch ihre Interaktion mit CDK2 die Proliferation von Schilddrüsentumorzellen unabhängig von der Expression des wild-type-Moleküls fördern.

7. Die Schilddrüsenkarzinomgewebe wiesen ein heterogenes Expressionsverhalten für Cyclin D3 auf. Dabei zeigte die Mehrzahl der follikulären und undifferenzierten Schilddrüsenmalignome eine Überexpression des Zellzyklusproteins, während nur in einer papillären Lymphknotenmetastase ein hoher Cyclin D3-Spiegel gemessen wurde.
8. Primärtumoren und Metastasengewebe unterschieden sich nicht in ihrem Vorkommen von p27 und Cyclin E. Im Hinblick auf die Cyclin D3-Expression ergab der Vergleich zwischen Primärtumoren und Metastasen nur in den follikulären Schilddrüsenkarzinomen eine grenzwertige Signifikanz.
9. Die Expression von p27, Cyclin E und Cyclin D3 hatte keinen signifikanten Einfluß auf das pTNM-Stadium der Schilddrüsenkarzinome.
10. Eine negative Korrelation zwischen dem p27-Level und der Expression von Cyclin E/ Cyclin D3 fand sich nur in den papillären Schilddrüsenkarzinomen. Zusätzlich gingen in diesen Geweben niedrige Cyclin E-Spiegel mit einer Cyclin D3-Unterepression einher.
11. In den follikulären Schilddrüsenkarzinomen war ein hoher p27-Spiegel mit einem vermehrten Vorkommen von Cyclin E verbunden. Obwohl in einigen FTC hohe p27- und Cyclin D3-Level bestimmt wurden, ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen den beiden Zellzyklusregulatoren.
12. Die undifferenzierten Schilddrüsenkarzinome exprimierten p27 und Cyclin E nur in geringem Maße. Weiterhin ließ sich eine inverse Beziehung zwischen p27 und Cyclin D3 sowie zwischen Cyclin E und Cyclin D3 in den UTC nachweisen. Im Zuge der Dedifferenzierung geht scheinbar die Effizienz der Rückkopplungsmechanismen verloren. Dies führt zu aggressiverem Tumorverhalten.

Ende der Nummerierung

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Klinik für Allgemeinchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe „Experimentelle und Chirurgische Onkologie“.

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsumfeldes danke ich Herrn Prof. Dr. med. H. Dralle, Direktor der Klinik für Allgemeinchirurgie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Besonderen Dank schulde ich meinem Lehrer und Mentor, Herrn PD Dr. rer. nat. C. Hoang-Vu, Leiter der Arbeitsgruppe „Experimentelle und Chirurgische Onkologie“ der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, für die wissenschaftliche, methodische und moralische Unterstützung.

Für die Hilfsbereitschaft als auch sachkundige und freundliche Einführung in die Laborarbeit möchte ich Frau K. Hammje sowie Frau C. Sauer danken.

Weiterhin danke ich der Pinguin-Stiftung, Düsseldorf für das gewährte Stipendium.

Selbstständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Frühere Promotionsversuche der Autorin bestehen nicht. Die vorliegende Arbeit wurde weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgestellt.

Jana Baumann

Publikationen

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bei folgenden Veranstaltungen vorgestellt:

Baumann J, Dansranjavin T, Hoang-Vu C, Dralle H:
Expression von Zellzyklusregulatoren in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien,
16. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung, München, 08. – 09.
Dezember 2000

Baumann J, Dansranjavin T, Sutter T, Gimm O, Dralle H, Hoang-Vu C:
Nachweis von Zellzyklusregulatoren in Schilddrüsen Geweben,
5. Chirurgische Forschungstage, Halle, 08. – 10. November 2001

Baumann J, Gimm O, Dansranjavin T, Sutter T, Dralle H, Hoang-Vu C:
Expression von Zellzyklus-Regulatoren in Schilddrüsenkarzinomen,
46. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Göttingen,
27. Februar – 02. März 2002

Die Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit erfolgte unter:

Baumann J, Gimm O, Dansranjavin T, Sutter T, Dralle H, Hoang-Vu C:
Expression of cell cycle regulators in thyroid carcinomas, Langenbeck's
Archives of Surgery, November 2001

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Jana Baumann
geboren: 18.05.1977, in Jena
Familienstand: ledig

Schulbildung

1983 – 1990 Georg-Singer-Schule, Magdeburg
1990 – 1995 Bettina-von-Arnim-Gymnasium, Magdeburg
06/1995 Abitur

Universitäre Ausbildung

1995 – 2003 Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/1997 Physikum
09/1999 1. Staatsexamen
04/2002 2. Staatsexamen
05/2003 3. Staatsexamen
05/2003 Erteilung der vorläufigen Approbation
10/2004 Erteilung der Approbation

Klinischer Werdegang

1995 – 2003 Studium der Humanmedizin an der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
04/2002 – 03/2003 praktisches Jahr
- Innere Medizin, St. Elisabeth Krankenhaus Halle
- Chirurgie, Paul Gerhardt Stift-Krankenhaus Wittenberg
- HNO, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02/2004 – 08/2004 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Pneumologie,
Zentralklinik Bad Berka
Seit 08/2004 Ärztin im Praktikum in der Klinik für Innere Medizin,
Hairmyres Hospital, East Kilbride, Glasgow, UK

wissenschaftliche Arbeit

11/2000 – 06/2001 Forschungsassistentin in der AG „Experimentelle und
Chirurgische Onkologie“ der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
05/2001 – 05/2002 Stipendium der Pinguin-Stiftung, Düsseldorf

Arbeit als Tutor

- 11/1998 – 03/1999 Institut für Anatomie und Zellbiologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 12/1999 – 02/2000 Institut für Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg