

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemeinchirurgie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

Direktor: Prof. Dr. Henning Dralle



**Zellbiologische und tierexperimentelle
Untersuchungen zur Pathogenese, Proliferation und
Differenzierung von Schilddrüsenkarzinomen**

Habilitation

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach
Experimentell-Chirurgische Onkologie und
zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. habil.

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät und
der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Cuong Hoang-Vu

Gutachter:

1. Prof. Dr. Henning Dralle, Medizinische Fakultät, Klinik für Allgemeinchirurgie
2. Prof. Dr. Roland Gärtner, Universität München, Medizinische Klinik
3. Prof. Dr. Rainer Rudolph, FB Biochemie/Biotechnologie, Institut für Biotechnologie

verteidigt am: 31.05.2001

Referat und bibliographische Beschreibung

Die gestörte Funktion der Zelladhäsionsproteine, extrazellulären Matrixproteine, zellulärer Proteinase, Apoptosegene und anderer Peptidsignale ist wesentlicher Bestandteil der Tumorentwicklung und -metastasierung. Schilddrüsenkarzinome stellen ein besonders geeignetes Modell zur Überprüfung dieser Hypothese dar, da aus einem einzigen Zelltyp, dem epithelialen Thyreozyten, unterschiedliche Tumorarten mit sehr unterschiedlichen klinischen Eigenschaften entstehen können: papillär differenzierte Karzinome zeigen eine vorwiegend lymphogene Metastasierung, follikulär differenzierte Karzinome eine hämatogene Metastasierung, undifferenzierte ein schnelles lokal infiltratives Wachstum verbunden mit systemischer Tumorausbreitung. Die pathophysiologische Basis für die bisher ausgeübte medikamentöse Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome ist die Vorstellung, das veränderte Signaltransduktionssystem modulieren zu können, indem die Proliferationsstimulation durch TSH ausgeschaltet wird. Dieses Vorgehen wird zwar durch klinische Beobachtungen gestützt, ist aber bislang nicht sicher experimentell belegt.

Ziele dieser Arbeit sind Untersuchungen der Rolle von oben genannten Faktoren auf die Tumorentstehung und -ausbreitung. Die Analyse dieser Faktoren läßt darüber hinaus neue Erkenntnisse zur Tumorsensitivität gegenüber Therapiestrategien und die Entwicklung kausal begründbarer präventiver Therapien bei Maladaptationsvorgängen im Verlauf der Tumorgenese der Schilddrüse erhoffen.

TSH-R und E-Cad gehen mit zunehmendem Dedifferenzierungsgrad verloren und sind in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen nicht nachweisbar. CD97 ist nicht in normalen Geweben, variabel in differenzierten und sehr stark in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen und Lymphknotenmetastasen nachweisbar. Die Expression der Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren wurde in allen Typen von Schilddrüsentumoren nachgewiesen. Mit zunehmender Malignität der Schilddrüsenkarzinome wurde das Fas-Protein down-reguliert, während das FasL-Protein verstärkt exprimiert wurde.

In-vitro haben TSH, Forskolin, PMA und Insulin keinen Einfluß auf die CD97-, MMPs- sowie TIMPs-, DR4, DR5, TRAIL, TNF-R1, Fas- und FasL-Expression. EGF bewirkt eine Steigerung der CD97- und MMP-9-, FasL- und DcR-1-Expression bei gleichzeitigem Verlust der Expression von E-Cad. *All-trans* Retinsäure führte zur verminderten CD97-, MMP-9- und TIMP-3- und DcR1- bei gleichzeitig erhöhter E-Cad-Expression.

In-vivo kann eine Veränderung der TSH-Plasmakonzentration im physiologischen Bereich ultrastrukturelle Veränderungen der Thyreozyten verursachen. Sensitivierung oder Desensitivierung innerhalb des untersuchten Rattensystems hängt vom jeweiligen Applikationsmodus (kontinuierlich vs pulsatil), von der verwendeten Dosis (niedrigdosiert vs hochdosiert) und von der eingesetzten Präparation (rTSH vs rec hTSH) ab.

Ein Jodüberschuß führte zur deutlichen Erhöhung der TSH-Plasmaspiegel ohne Veränderung der Plasmaspiegel von T3 und T4. Jodmangel induzierte eine deutliche Verminderung der T3- und der T4-Plasmakonzentrationen, daraus resultierend einen Anstieg der TSH-Plasmaspiegel. Eine Bestrahlung aggraviert den Abfall der Schilddrüsenhormonspiegel und es findet sich ein etwas stärkerer Anstieg der TSH-Plasmaspiegel. Zwei Jahre nach der Bestrahlung bildeten die Jodmangelschilddrüsen in 25% der Fälle, unter jodreicher Ernährung in 50% der Fälle Karzinome aus. Niedrige Strahlendosen induzierten follikuläre, hohe Strahlendosen papilläre Karzinome.

Euthyreose bietet den besten Schutz vor den Umwelttoxinen und deren Folgeschäden.

Hoang-Vu, Cuong: Zellbiologische und tierexperimentelle Untersuchungen zur Pathogenese, Proliferation und Differenzierung von Schilddrüsenkarzinomen. Halle, Univ., Med. Fak., Habil., 148 Seiten, 2000

INHALTSVERZEICHNIS

1	ALLGEMEINE EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
1.1	Signalübertragung im Thyreozyten	2
1.2	Regulation der Zellproliferation und Zelldifferenzierung	4
1.3	Störung der Transduktionskaskaden als mögliche Ursache der Tumorentstehung	5
1.4	Die Schilddrüsenzelle: Ein Modell zur Untersuchung der Tumorgenese	6
1.4.1	Thyreotropin und Wachstumsfaktoren	7
1.4.2	E-Cadherin	9
1.4.3	CD97	10
1.4.4	Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren	11
1.4.5	Apoptose-induzierende Gene	12
2	ZIELE DER UNTERSUCHUNGEN	14
3	MATERIAL UND METHODEN	15
3.1	Zellbiologische Untersuchungen	15
3.1.1	Gewebe und Zelllinien	15
3.1.1.1	Gewebe und Primärkulturen	15
3.1.1.2	Zelllinien	16
3.1.2	Stimulationsversuche	16
3.1.3	RNA-Gewinnung	17
3.1.4	Northern-Blot zum Nachweis von E-Cadherin- und TSH-Rezeptor-mRNA ..	18
3.1.5	RT-PCR	19
3.1.6	Immunhistochemie	21
3.2	Tierexperimentelle Untersuchungen	22
3.2.1	Versuchstiere	22
3.2.2	Technik zur Platzierung eines Dauerkatheters	22
3.2.3	Experimentelles Design	25
3.2.3.1	TRH-Stimulationsmodell	25
3.2.3.1.1	Funktionsstudien	25
3.2.3.1.2	Proliferationsstudien mit BrDU	26
3.2.3.1.3	Histomorphologie	27
3.2.3.1.4	Tg- und T4-Immunogold-Markierung	27
3.2.3.2	TSH-Stimulationsmodell	28
3.2.3.3	Tumorinduktionsmodell	30
3.2.3.3.1	Alimentärer Jodgehalt	31
3.2.3.3.2	Bestrahlung der Schilddrüse	31
3.2.3.3.3	Gewinnung der Blut- und Gewebeprobe	31
3.2.3.3.4	Immunhistochemie	32
3.2.4	Hormonanalytik	33

4	ERGEBNISSE	34
4.1	Zellbiologische Untersuchungen	34
4.1.1	E-Cadherin und TSH-Rezeptor	34
4.1.1.1	Humane Gewebe und Primärkulturen	34
4.1.1.1.1	Humane Gewebe	34
4.1.1.1.2	Primärkulturen	35
4.1.1.2	Zelllinie FTC-133	35
4.1.2	CD97	37
4.1.2.1	Humane Gewebe	37
4.1.2.2	Zelllinie FTC-133	38
4.1.3	Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren in der Schilddrüse	39
4.1.3.1	Humane Gewebe	39
4.1.3.2	Korrelation der MMP- und TIMP-Expressionen zum pTNM-Stadium	43
4.1.3.3	Zelllinie FTC-133	45
4.1.4	Expression und Regulation von Apoptose-induzierten Genen in der Schilddrüse	48
4.1.4.1	Humane Gewebe	48
4.1.4.2	Zelllinie 8505C	51
4.1.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	54
4.2	Tierexperimentelle Untersuchungen	56
4.2.1	TRH-Stimulationsmodell	56
4.2.1.1	Schilddrüsenhormone	56
4.2.1.2	Ratten-Thyreotropin (rTSH)	58
4.2.1.2.1	rTSH-Freisetzung am Ende der Infusion	59
4.2.1.2.2	TRH-Konzentrationen am Ende der Infusion	60
4.2.1.2.3	rTSH-Antwort auf einen TRH-Bolus	61
4.2.1.3	T4-Suppression	62
4.2.1.4	PTU-Behandlung	63
4.2.1.5	Proliferation	64
4.2.1.6	Histomorphologische Veränderungen	66
4.2.1.7	Immunogoldmarkierung	70
4.2.2	TSH-Stimulationsmodell	72
4.2.2.1	rTSH und T4-Verlauf unter Suppression	72
4.2.2.2	T4-Antwort nach TSH-Gabe in Tieren mit und ohne T3-Suppression	72
4.2.2.3	Konzentrationen des humanen TSH (hTSH) am Ende der Infusion	73
4.2.2.4	rTSH-C vs. rTSH-P	74
4.2.2.4.1	Niedrigdosierung	74
4.2.2.4.2	Hochdosierung	74
4.2.2.5	rec-hTSH-C vs. rec-hTSH-P	75
4.2.2.5.1	Niedrigdosierung	75
4.2.2.5.2	Hochdosierung	75
4.2.3	Tiermodell zur Tumorinduktion	76
4.2.3.1	Jodvarianz	76
4.2.3.1.1	Hormonkonzentrationen	76
4.2.3.1.2	Gewichtsentwicklung der Tiere	79
4.2.3.1.3	Histomorphometrie	81
4.2.3.1.4	Tumoridentifikation	87
4.2.3.2	Jodvarianz und Radiatio	87

4.2.3.2.1	Hormonkonzentrationen.....	87
4.2.3.2.2	Gewichtsentwicklung der Tiere	93
4.2.3.2.3	Histomorphometrie.....	95
4.2.3.2.4	Tumoridentifikation.....	100
4.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	103
5	DISKUSSION.....	104
5.1	Zellbiologische Untersuchungen	105
5.2	Tierexperimentelle Untersuchungen	111
5.2.1	Tiermodell zur Untersuchung der hypothalamo-hypophysär-thyreoidalen Achse.....	112
5.2.2	Tiermodell zur Untersuchung der Tumorinduktion	118
6	ZUSAMMENFASSUNG	128
6.1	TSH-Rezeptor und E-Cadherin in der Schilddrüse	128
6.2	CD97 in der Schilddrüse	128
6.3	Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren in der Schilddrüse	129
6.4	Apoptose-Gene in der Schilddrüse	130
6.5	Einfluß von TSH auf Funktion und Morphologie der Schilddrüse <i>in-vivo</i> ...	131
6.6	Einfluß von Jodzufuhr und Radiatio auf die Schilddrüse.....	133
7	LITERATUR.....	134
8	THESEN	146
9	DANKSAGUNG	148

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung	Fas	F7 associated surface protein
ABC	Avidin-Biotin Complex	FasL	F7 associated surface protein Ligand
AD	Adenom	FCS	fötales Kälberserum
AP	Activator protein	FGF	Fibroblast Growth Factor
APO	apoptosis-inducing protein	FI	Fibrosierung
APUD	Amine Precursor Uptake Decarboxylation	FK	fibröse Kapsel
AS	Aminosäuresequenz	FS	fibrotische Septen
as	Antisense	FTC	follikuläres Schilddrüsenkarzinom
bp	Basenpaar	GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase
BrDU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin	GS	Gefäßsprossung
BSA	bovine serum albumin	GTC	Guanidiniumthiocyanat
bSD	benigne Schilddrüse	HA	autonomes Adenom
bzw.	beziehungsweise	Han-SPRD	Hannover-Sprague Dawley-Ratte
C	Kolloid	HBSS	Hanks Buffer Salt Solution
Ca	Karzinom	HD	Hochdosisbestrahlung (4 Gray und 6 Gray)
Ca ²⁺	Calciumionen	hTSH	humanes TSH
ca.	Circa	I	Lysosom
cAMP	cyclic Adenosine Monophosphate	i.v.	intravenös
CD	Cluster of differentiation	IGF-1	Insulin-like Growth Factor
CEA	karzinogenes embryonales Antigen	InsCa	insuläres Karzinom
COS	CV-1 simian cells transformed with Origin-defective mutant of SV40	IP ₃	Inositoltriphosphat
DAG	Diacylglycerol	IT	insulärer Typ
DcR	decoy receptor	Jm	Jodmangel
ddRs	„Death-Domain“-Rezeptoren	Jn	Jodnormal
DMEM	Dulbecco modifiziertes Eagles Medium	Ju	Jodüberschuß
DNA	Desoxyribonukleinsäure	K/Ko	Kontrolle
DR4	„Death-Domain“-Rezeptor Typ 4	KG	Körpergewicht
DR5	„Death-Domain“-Rezeptor Typ 5	KS	Kapillarsprossung
DZ	Dermoidzyste	L-CAM	Leberzell-Adhäsionsmoleküle
E-Cad	E-Cadherin	LH	luteinisierendes Hormon
EGF	Epidermal Growth Factor	LSAB	Labelled Strept Avidin-Biotin Staining
EGR	early growth response protein	MMP	Matrix-Metalloproteinase
E-pal	palindrome Sequenz	m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum	MTC	medulläres Schilddrüsenkarzinom
EtBr	Ethidiumbromid	MT-MMP	membrane type Matrix-Metalloproteinase
FA	follikulärer Anteil	MTU	Methylthioharnstoff

N	Nukleus	r-TSH-C	kontinuierliche Ratten-TSH-Infusion
n.s.	nicht signifikant		
NaCl-C	kontinuierliche NaCl-Infusion	r-TSH-P	pulsatile Ratten-TSH-Infusion
NaCl-P	pulsatile NaCl-Infusion	s	Sense
ND	Niedrigdosisbestrahlung (1Gray und 2 Gray)	S	Struma
NF κ B	nuclear transcription factor-kappa B	SP	Specificity protein
NIH	National Institute of Health	ssDNA	salmon sperm DNA
NIS	Natrium-Jodid-Symporter	SZ	solide Zellnester
NK-Zellen	natural-killer- Zellen	T3	L-3,5,3'-Trijodthyronin
NMU	Nitrosomethylharnstoff	T4	L-3,5,3',5'-Tetraiodthyronin = Thyroxin
NSD	Nebenschilddrüse	Tab.	Tabelle
nt	Normalgewebe	TBE	Tris- Borsäure- EDTA
o.g.	oben genannt	Tg	Thyreoglobulin
PBS	Phosphatpuffer	TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
PEA	polyoma enhancer activator	TM7	sieben-transmembranöse Region
Pi	Phosphoinositol-Kalzium-Stoffwechsel	TNF/NGF	Tumor Necrosis Factor / Nerve Growth Factor
PIP ₂	Phosphatidylinositol-diphosphat	TPO	thyreoidale Peroxidase
PKA	Proteinkinase A	TRAIL	TNF-related-apoptosis inducing-ligand
PLC	Phospholipase C	TRH	Thyrotropin releasing hormone
pM	Metastasennachweis	TRH-C	kontinuierliche TRH- Infusion
PMA	Phorbol 12-myristate-13-acetat	TRH-P	pulsatile TRH- Infusion
pN	Lymphknotenmetastasen	TSH	Thyreoidea stimulating hormone = Thyreotropin
pT	Tumorgröße	TSH-R	Thyreoidea stimulating hormone receptor
PTC	papilläres Schilddrüsenkarzinom	TSI	schilddrüsenstimulierende Immunglobuline
PTU	Propylthiouracil	UTC/ATC	undifferenziertes anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
PVC	Polyvinylchlorid		
RA	<i>all-trans</i> -Retinsäure	V	Mikrovilli
rec-hTSH	rekombinantes humanes Thyreotropin	vs.	versus (im Vergleich zu)
Rez.	Rezidiv	z.B.	zum Beispiel
RGD	Arg-Gly-Asp-Motif		
RNA	Ribonukleinsäure		
RT-PCR	Reverse transcriptase Polymerase chain reaction		
rTSH	Ratten-Thyreotropin		

1 Allgemeine Einleitung und Problemstellung

Nach epidemiologischen Untersuchungen ist Jodmangel als Ursache einer Strumaentwicklung unumstritten. Ein direkter Wachstumseffekt kann jedoch dem Jodmangel allein nicht zugesprochen werden. In einem aktiven Stoffwechselprozess induzieren die durch Jodmangel erniedrigten peripheren Schilddrüsenhormonkonzentrationen die nachfolgende hypophysäre Thyreotropin (TSH)-Stimulation der Schilddrüse. Um die funktionssteigende Wirkung sowie den möglichen Wachstumseffekt des TSH zu supprimieren, wird in der Behandlung diffuser Strumen, zur Rezidivprophylaxe nach Operationen nodöser Kröpfe und bei Patienten mit differenzierten Schilddrüsenkarzinomen eine Levothyroxintherapie durchgeführt (siehe dazu 1.4).

Neben Jodmangel wurde auch beobachtet, daß einige Kohlarten bei Versuchstieren einen Kropf erzeugen, deshalb hat man nach anderen Strumigenen gesucht, die Einfluß auf die Schilddrüsenfunktion ausüben können. Zu den Substanzen gehören Abkömmlinge von Thioharnstoff, insbesondere Thiouracil, Methylthiouracil (MTU) und Propylthiouracil (PTU) (*Astwood 1943; MacKenzie & MacKenzie, 1943; Napalkov, 1969*). Neben diesen klassischen Substanzen sind thyreostatische Wirkungen oder die kompetitive Hemmung des Jodeinbaus in die Schilddrüse unter Ausbildung von Neoplasien auch für 3-Amino-1,2,4-Triazol (ATA, *Napalkov, 1967*), Thiurame (*Griepentrog, 1962*), Kaliumperchlorat (*Kessler & Kruskemper, 1966*) und Methylxanthin (*Wolff & Varrone, 1969*) bekannt. Eine Jodmangeldiät führt, wie erstmalig durch *Wegelin (1928)* beobachtet, zur Ausbildung von Strumen bei Ratten, welche durch Zugabe von Kaliumjodid verhindert werden konnten. *Axelrad & Leblond (1955)* zeigten, daß eine jodarmer Diät und zeitgleiche Verabreichung von Acetylaminofluoren zu einer Verkürzung der Induktionszeit und Erhöhung der Tumorausbeute führte. Ähnliche Effekte zeigten Kombinationsbehandlungen von Röntgenbestrahlung und Jodmangeldiät (*Nadler et al., 1969*). Kanzerogene Kohlenwasserstoffe induzieren vorwiegend Sarkome und Plattenepithelkarzinome, seltener Adenokarzinome (*Bielschowsky, 1955; Esmarch, 1942; Milcu & Petrea, 1959*). Karzinomerzeugende Kombinationen sind Propyl- bzw. Methylthiouracil (PTU/MTU) und Acetylaminofluoren (AAF) sowie Methylthiouracil (MTU) und Nitrosomethylharnstoff (NMU) (*Christov & Raichev, 1972*).

Die Arbeitsgruppen um *Doniach (1957,1958)* und *Lindsay (Lindsay et al., 1961)* untersuchten die Auswirkungen von Radioaktivität auf die Schilddrüse. Es wur-

den radioaktives Jod¹³¹ sowie Röntgenstrahlung auf Tumorinduzierbarkeit, -ausbeute und Latenzzeit getestet. Bei Dosierungen zwischen 10µCi Jod¹³¹ (= 4Gy Röntgenstrahlung) und 400µCi Jod¹³¹ (= 160Gy Röntgenstrahlung) konnte eine Dosisabhängigkeit der Wirkung festgestellt werden (*Doniach, 1957,1958; Lindsay et al., 1961*). Unter den höchsten Dosierungen kam es bei 35% der Versuchstiere zu ausgeprägten morphologischen Schädigungen der Schilddrüse. Bei niedrigen Strahlendosen von 5µCi Jod¹³¹ (= 2Gy Röntgenstrahlung) konnte nach 12-monatiger Versuchsdauer eine 12%-ige Adenomausbeute registriert werden. Morphologisch-histologisch waren keine Zeichen einer Strahlenschädigung oder eines TSH-Effektes zu eruieren. Gleichzeitige Applikation von Strumigenen (MTU/PTU) und Radioaktivität jeglicher Art verkürzte die Latenzzeit der Tumoren auf 5-6 Monate (*Stoll & Marand, 1963*).

1.1 Signalübertragung im Thyreozyten

Biologische Informationen werden neben einer Übertragung durch neuronale Strukturen auch durch Hormone weitergegeben, wobei die Informationen nach bisher vorherrschender Auffassung in der absoluten zirkulierenden Konzentration des Hormons kodiert sind. Die Sekretion von Hormonen erfolgt aber darüber hinaus auch nach distinkten zeitlichen Mustern. Sowohl kurzzeitige pulsatile als auch langfristige Änderungen der Hormonkonzentrationen sind beobachtet wurden. Es konnte nachgewiesen werden, daß die bekannte zirkadiane Rhythmik des thyreotropen Hormons (TSH) aus kurzzeitigen Pulsen aufgebaut wird, die pulsatile Freisetzung also das grundlegende Prinzip für Langzeitvariationen darstellt (*Brabant et al., 1990*).

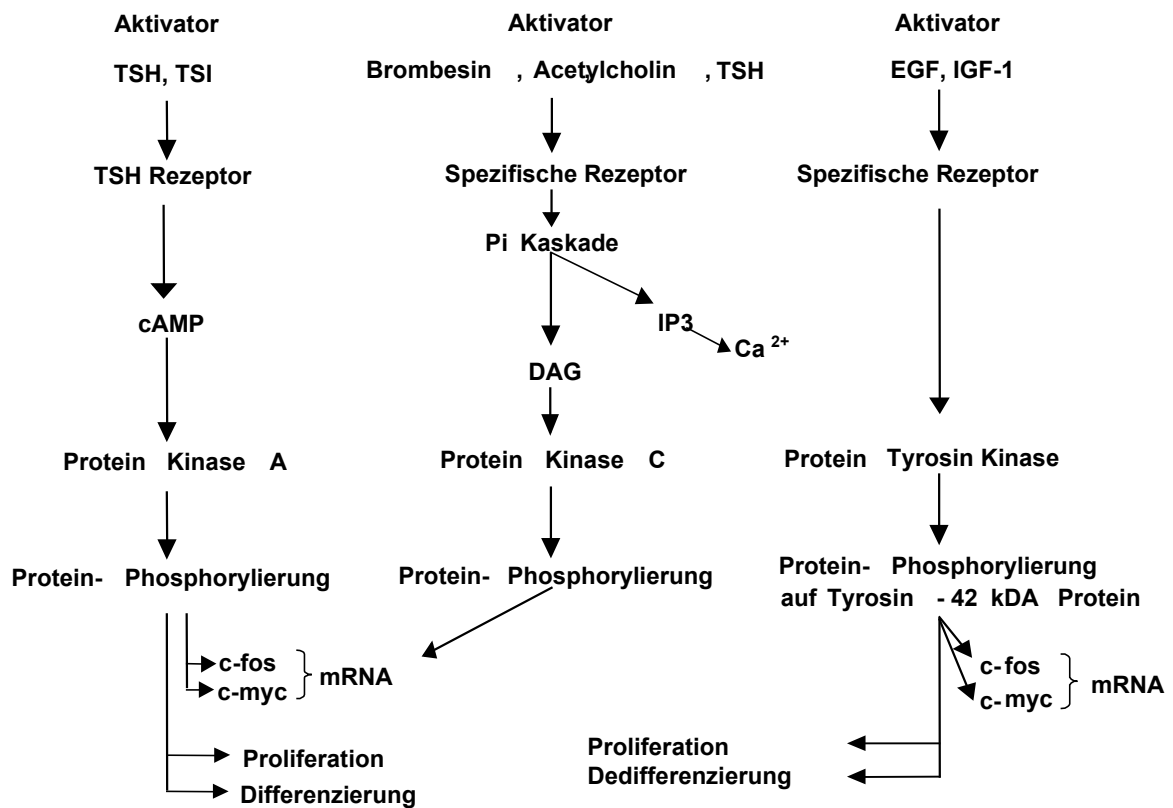
In der Schilddrüse steuern drei unterschiedliche intrazelluläre Signaltransduktionswege die Proliferation von Thyreozyten, von denen zwei durch TSH beeinflusst werden können:

1. Die Stimulation von zyklischen Adenosinmonophosphat (cyclic Adenosine Monophosphate, cAMP) durch TSH oder andere extrazelluläre Faktoren über stimulierende G-Proteine und die Aktivierung der Adenylatcyclase führen zur

- Aktivierung der Proteinkinase A und nachfolgender Kinasesysteme und können sowohl Zelldifferenzierung und Hormonsekretion als auch Zellproliferation induzieren.
2. Die Stimulation phosphorylierender Tyrosin-Proteinkinasen, welche dem cytosolischen Anteil membranständiger Wachstumsfaktoren wie beispielsweise des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors (Insulin-like Growth Factor, IGF-1) oder des epidermalen Wachstumsfaktors (Epidermal Growth Factor, EGF) verwandt ist, führt unabhängig von den unter 1. genannten Schritten zu Proteinphosphorylierung und Zellproliferation. Im Gegensatz zu cAMP-abhängigen Effekten inhibiert die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges die Differenzierung der Zellen und die Wirkung von TSH auf die Zelldifferenzierung (*Lamy et al. 1978, 1986, 1990*).
 3. Ähnliche proliferationsfördernde Wirkungen unter Verlust der Differenzierung sind von einem weiteren Signaltransduktionssystem, dem Phosphatidylinositol-Kalzium-Weg beschrieben (*Maenhaut et al., 1990*). TSH ist in der Lage, über ein spezifisches G-Protein Phospholipase C (PLC) zu aktivieren, um Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) aus Phosphatidylinositol-diphosphat (PIP₂) freizusetzen und über eine Stimulierung von Proteinkinase C Proteinphosphorylierung und letztlich Proliferation auszulösen. Diese Signaltransduktionswege führen zu einem unterschiedlichen Muster der nachgeschalteten Proteinphosphorylierung, d.h. benutzen unterschiedliche allerdings untereinander vernetzte Wege zur Übertragung der Information auf die intrazellulären Kompartimente und den Kern.

Alle unter 1.-3. genannten Wege führen letztlich zur Induktion der mRNA von c-fos und c-myc (*Dumont et al., 1992*). Obwohl die Details der Umsetzung des Signals in proliferative Vorgänge bislang weitgehend unklar sind, scheint die Aktivierung beider Protoonkogene als frühe nukleäre Antwort eng mit der Induktion der Proliferation gekoppelt zu sein (*Rozengurt, 1986*).

Abb. 1: Schematische Darstellung der intrazellulären Transduktionskaskade im Thyreozyten (modifiziert nach *Dumont et al., 1992*)



1.2 Regulation der Zellproliferation und -differenzierung

Die Zellproliferation wird durch ein Netzwerk von zeitlich-räumlich strukturierten, sich gegenseitig beeinflussenden Signalübertragungswegen gesteuert, welche hierarchisch aufgebaut sind. Die bisherigen Befunde sprechen dafür, daß im Ablauf der Signaltransduktionskaskade jeweils eine kritische Konzentration des Botenstoffes erreicht werden und diese auf ein sensibles System treffen muß, um die Information an den Nukleus weiterzugeben. Eine Amplifizierung des Signals ist auf jeder Stufe der Regulation nötig, um die volle Antwort der Zelle auszulösen. Auf allen Ebenen ist Kooperation der Wege möglich (*Alkon & Rasmussen, 1988*). Untersuchungen von *Smith et al. (1990)* verdeutlichen dies am Beispiel der Interaktion von *ras*-Protein mit τ -PLC, welche sowohl über G-Proteine als auch über Tyrosinkinase aktiviert werden kann. Der Einsatz von mikroinjizierten monoklonalen Antikörpern gegenüber *ras*-Protein oder PLC an einer Fibroblastenzelllinie zeigt, daß *ras* in diesem System oberhalb PLC angeordnet ist und

PLC für die Stimulation der DNA-Synthese durch *ras* verantwortlich ist. Da über eine direkte Aktivierung von PLC weiterhin die Proliferation stimuliert werden kann, spricht dieser Befund für eine Kooperation beider Systeme. Mikroinjizierte Antikörper gegen PIP₂, welche beispielsweise die durch Bombesin induzierte DNA-Synthese blockieren, können die Transformation durch *ras*-, *src*- oder *erb-B*-Onkogen an diesen Zellen unterdrücken und zeigen, daß die Transformation von der intakten Hierarchie der Signalkette abhängt (*Matuoka, 1988*). Ähnlich kooperatives Verhalten bei der Steuerung der Proliferation wurde mit anderen Ansätzen auf verschiedenen Ebenen der Signalübertragung gezeigt (*Frick & Scher, 1990; Frick et al., 1988*).

1.3 Störung der Transduktionskaskaden als mögliche Ursache der Tumorentstehung

Maligne Transformation kann als Störung in einem Netzwerk von zellulären Signaltransduktionssystemen zur Steuerung der Proliferation/Apoptose begriffen werden, welche auf Grund einer genetischen Disposition und/oder eines umweltbedingten Einflusses mit dem Verlust des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelluntergang (Apoptose) einhergeht. Das Verhältnis verschiebt sich zu Gunsten einer unregulierten Zellproliferation. Es entsteht dadurch zunächst ein autonomer Zellverband (z.B. Adenom), welcher noch die Fähigkeiten einer differenzierten Zelle besitzt. In dieser Phase ist die Neovaskularisation ein wesentlicher Bestandteil für eine gewährleistete Nährstoffversorgung und für einen gesicherten Metabolitenaustausch im wachsenden Gewebe. Die entstandenen vaskulären endothelialen Zellen produzieren wiederum Zytokine und Wachstumsfaktoren, die das Wachstum des Adenoms unterhalten können. Das Adenom wächst jedoch lokal begrenzt und führt weder zu einer Invasion noch zu einer Metastasierung. Adenome weisen somit klinisch keine Malignitätsmerkmale auf. Die Symptomatik resultiert aus den lokalen Folgeerscheinungen ihrer Größenzunahme, oder bei endokrinen Tumoren aus den systemischen Wirkungen ihrer Hormonsekretionsprodukte. Beim Kolonkarzinom wird diskutiert, daß auf Grund der genetischen Disposition und/oder bedingt durch Umweltfaktoren der Übergang vom Adenom zu Karzinom (Progression) erfolgen kann, welche bei Schilddrüsenkarzinome nur bedingt zutrifft (Abb.2). Weder der Zeitpunkt noch die genauen Mechanismen der Transformation von

benignen zu malignen Zellen sind bis zum heutigen Tag bekannt. Gesichert ist, daß das invasive Wachstum und die Metastasierung maligner epithelialer Zellen eine Neovaskularisation voraussetzen. Diese gewährleistet die Nährstoffversorgung und einen gesicherten Metabolitenaustausch im expandierenden Gewebe, sie ermöglicht eine Lösung der Zellen aus ihrer ursprünglichen Position im Zellverband. Voraussetzung hierzu ist ferner der Verlust der interzellulären Zellverbindungen und Interaktionen der Tumorzellen mit der Basalmembran. Weitere Schritte umfassen die Emigration der Zellen vom Primärtumor in die Lymph- und/oder Blutbahn, Transport durch Lymph- bzw. Blutfluß und der Wiedereintritt in die Gewebe durch die Lymphgefäß- bzw. Blutgefäß-Basalmembran und Bildung eines zweiten Tumors (Metastase).

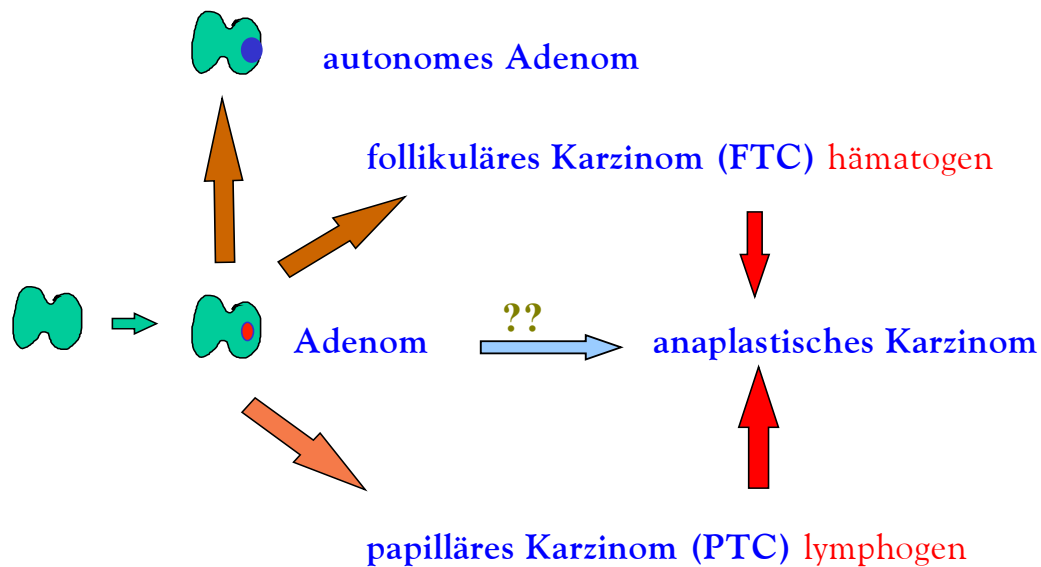
1.4 Die Schilddrüsenzelle: Ein Modell zur Untersuchung der Tumorgenese

Schilddrüsenkarzinome stellen ein besonders geeignetes Modell zur Überprüfung dieser Hypothese dar, da, wie in Abb. 2 dargestellt, aus einem einzigen Zelltyp, dem epithelialen Thyreozyten, unterschiedliche Tumorarten mit sehr unterschiedlichen klinischen Eigenschaften entstehen können: papillär differenzierte Karzinome zeigen eine vorwiegend lymphogene Metastasierung, follikulär differenzierte Karzinome eine hämatogene Metastasierung, undifferenzierte ein schnelles lokal infiltratives Wachstum verbunden mit systemischer Tumorausbreitung. Die pathophysiologische Basis für die bisher ausgeübte medikamentöse Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome ist die Vorstellung, das veränderte Signaltransduktionssystem modulieren zu können, indem die Proliferationsstimulation durch das thyreotrope Hormon (Schilddrüsen-stimulierendes Hormon, Thyreotropin, TSH) ausgeschaltet wird. Dieses Vorgehen wird zwar durch klinische Beobachtungen gestützt, ist aber bislang nicht sicher experimentell belegt.

Thyreozyten sind der größte Bestandteil (ca. 70%) der Schilddrüse. Sie sind stark polarisierte epitheliale Zellen, welche Follikelstrukturen aufbauen, die es den Zellen erlauben als Zellverband zu reagieren. Thyreozyten stehen unter der Kontrolle multipler hormoneller Systeme. Thyreotropin (TSH) steuert nach Anbindung an seinem Rezeptor (TSH-R) über eine Aktivierung der c-AMP-Kaskade die Expression von Differenzierungsgenen und führt zu einer ausgeprägten Veränderung des Zytoskeletts.

Im Einzelnen erhöht TSH die Synthese der Schilddrüsenhormone aus iodiniertem Thyreoglobulin (Tg), sowie die Synthese des Enzyms Schilddrüsenperoxidase (TPO), welches den Einbau von Jod an Tg reguliert. Beide Gene können als Differenzierungsmarker der Schilddrüse angesehen werden (*Dumont et al., 1992*).

Abb. 2: Schematische Darstellung der Tumorgenese bei der Schilddrüse



1.4.1 Thyreotropin und Wachstumsfaktoren

TSH ist ein pulsatil sezerniertes heterodimeres glykosyliertes Protein, das aus einer α -Untereinheit und einer TSH-spezifischen β -Untereinheit aufgebaut ist. Beide Einheiten sind non-kovalent miteinander verbunden. Die Aminosäuresequenz (AS) für die 92 AS umfassende α -Untereinheit, welche auf Chromosom 6 lokalisiert ist und für die 112 AS umfassende β -Untereinheit, lokalisiert auf Chromosom 1, ist aufgeklärt (*Sairam & Li, 1977*). Unabhängig von dem Stimulationsmuster ist in Tierversuchen und *in-vitro* die stimulierende Wirkung von TSH auf die Synthese und Sekretion der Schilddrüsenhormone gut belegt (*Raspe et al., 1991*). Darüber hinaus stellt TSH einen der wichtigsten Regulatoren der thyreoidalen Jodaufnahme über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) dar. Auch das Protein Thyreoglobulin, an welchem Schilddrüsenhormone synthetisiert werden, wird von TSH wesentlich moduliert (*Dralle et al., 1989*).

Untersuchungen haben gezeigt, daß die pulsatile TSH-Sekretion direkt dem hypothalamischen Thyreotropin-Releasing Hormon (TRH) untergeordnet ist (*Wehman & Nisula, 1984; Brabant et al., 1991*). TRH verändert die Glykosylierung und die Sialysierung und ist damit direkt für die Bioaktivität und Abbau verantwortlich (*Taylor & Weintraub, 1989; Weintraub et al., 1990*). Eine temporäre Veränderung der TRH-Sekretion führte zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen α - und β -mRNA-Expression der TSH-Gene (*Haisenleder et al., 1992*) und ebenfalls zur Veränderung der TSH-Sekretion *in-vitro* bei Ratten (*Brabant et al., 1989*). Eine kontinuierliche Applikation von TRH führte zur partiellen Desensibilisierung der thyreotropen Zellen beim Schaf (*Klindt et al., 1979*) und bei Rhesusaffen (*Pavasuthopaisit et al., 1983*). Zeitlich abhängiger Einfluß von TRH auf TSH-Freisetzung und der daraus resultierende Effekt auf Schilddrüsenfunktion, -proliferation oder -differenzierung sind bisher nicht bekannt.

Als Ko-Mitogen induziert Insulin über eine Interaktion mit dem IGF-1-Rezeptor eine erhöhte Tg-Synthese, beeinflußt die Proliferation und Differenzierung der mit TSH oder EGF vorbehandelten Schilddrüsenzellen (*Roger & Dumont, 1983; Roger et al., 1983; Roger et al., 1987a,b*). Durch einen direkten Effekt oder indirekt über eine Erhöhung von IGF-1 stimuliert das Hormon in Primärkulturen zum Aufbau von Pseudofollikeln und ist in dreidimensionalen Kollagen-Gelkulturen für die Bildung von Schilddrüsenfollikeln *in-vitro* bedeutsam (*Toda & Sugihara, 1990; Fayet & Hovsepian, 1991*). Eine EGF- oder Phorbol ester-Behandlung führt zu einer Dedifferenzierung der Thyreozyten, welche sowohl durch eine veränderte, fibroblastenähnliche Morphologie der Zellen als auch durch erniedrigte Expressionslevels von Tg und TPO gekennzeichnet ist (*Roger et al. 1984; Gerard et al., 1989*). Parallel dazu induzierten EGF oder Phorbol ester sowie fötales Kälberserum eine Loslösung einzelner Zellen aus den Follikelaggregaten in Primärkulturen von Hundeschilddrüsen (*Roger et al., 1987b*). Im Gegensatz dazu ändert die Stimulation mit TSH oder Forskolin, einem direkten Aktivator des cAMP-Weges, vollständig den Phänotyp der Zellen. Im weiteren Verlauf dieses Prozesses redifferenzieren sich die Zellen und bilden follikelähnliche Strukturen aus. Schließlich kommt es unter TSH bzw. Forskolin zum Auftreten einer polarisierten Struktur der Zellen (*Roger et al., 1986; Fayet et al., 1982*).

Die Proliferation von Thyreozyten wird auch über eine Besetzung spezifischer Tyrosinkinase-gekoppelter Rezeptoren wie EGF, aber auch Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) und IGF-1, stimuliert und kann andererseits über den Phosphoinositol-Kalzium-Stoffwechsel (Pi) aktiviert werden. Dabei führt die Gabe von EGF, ähnlich wie eine Aktivie-

rung der Pi-Kaskade, neben der Proliferation zu einer Dedifferenzierung der Thyreozyten mit Veränderungen des Zytoskeletts und Umwandlung der Thyreozyten in fibroblastenähnliche Zellen. Dieser Prozeß geht mit einem Verlust der Expression von Differenzierungsmarkern wie des TSH-Rezeptors, Thyreoglobulin oder TPO einher (*Maenhaut et al., 1992*) und wird in analoger Weise im Verlauf der Dedifferenzierung von Schilddrüsenkarzinomen beobachtet (*Brabant et al., 1991*). Sowohl EGF als auch die Aktivierung der Pi-Kaskade erhöhen die Aktivität des intrazellulären Kalziums und stimulieren den Einstrom von Kalzium aus dem Extrazellulärraum. Unklar ist gegenwärtig die Interaktion von extrazellulärer Kalziumkonzentration, Aktivierung der unterschiedlichen intrazellulären Signaltransduktionskaskaden und der Steuerung der Zell-Zell-Interaktion zur Aufrechterhaltung des hochdifferenzierten Follikelverbandes.

1.4.2 E-Cadherin

Cadherine sind Transmembran-Glykoproteine, die Ca^{2+} -abhängig homophilen Zellkontakt vermitteln. In Abhängigkeit von ihrer Lokalisation und Bindungsspezifität (*Takeichi, 1990, 1991*) wurden mehrere Subklassen definiert:

E-Cadherine: (epitheliale Cadherine), **P-Cadherine:** (placentare Cadherine), **N-Cadherine:** (neurale Cadherine); **L-CAM:** (Leberzell-Adhäsionsmoleküle).

Generell werden 1-2 Cadherintypen in einer Zelle exprimierten, ihre Kombination differiert jedoch mit dem Zelltyp. Wahrscheinlich existieren noch weitere Cadherine, so daß eine noch größerer Kombinationsbreite denkbar ist (*Takeichi, 1990*). Da alle epithelialen Zellen des Menschen E-Cadherine exprimieren, die Cadherine aber für ihre hohe Bindungsspezifität bekannt sind, müssen auch entsprechend viele E-Cadherin-Varianten gebildet werden. Die molekularen Unterschiede liegen in der extrazellulären Domäne der Moleküle, der NH_2 -terminalen Region, bestehend aus 113 Aminosäuren. Schon der Austausch von nur zwei Aminosäuren kann zu einer signifikanten Änderung der Bindungsspezifität führen. Es scheinen jedoch nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Unterschiede der Cadherin-Expression für die selektive Zellbindung von Bedeutung zu sein (*Takeichi, 1991*).

Die intrazelluläre Domäne der Cadherine ist in ihrem Aufbau weniger variabel und steht über Cateninmoleküle in Kontakt zum Zytoskelett der Zelle, speziell zu Aktinfasern. Defekte der intrazellulären Domäne können die Bindung an Catenine und somit zum Zytoskelett verhindern, was zu einer Aufhebung der Zellbindungsfunktion der Cad-

herine führt (Nagafuchi & Takeichi, 1988). Die Rolle des Zytoskeletts sowie des Zytoplasmas an der Zellbindung konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Der Nachweis der adhäsiven Funktion von Cadherinen wurde durch Anti-Cadherin-Antikörper und Transfektionsversuche mit Cadherin-DNA bzw. -RNA geführt. Tumorzelllinien vom epitheloiden Zelltyp bildeten E-Cadherin aus und waren nicht invasiv, während Zelllinien vom fibroblastenartigen Phänotyp invasiv waren und die E-Cadherin-Expression verloren hatten. Durch Transfektion mit E-Cadherin-DNA konnte die Invasivität der letzteren Zellen aufgehoben und durch Behandlung mit Anti-E-Cadherin-Antikörpern wieder induziert werden (Frixen *et al.*, 1991). Durch Transfektion von E-Cadherin-spezifischer Antisense-RNA in nicht-invasive *ras*-transformierte Zellen wurden diese partiell in invasive umgewandelt. Dies deutet auf eine potentielle Invasions-Suppressor-Rolle von E-Cadherin hin (Vleminckx *et al.*, 1991).

1.4.3 CD97

CD97 gehört zu einer Familie völlig neuer Hybridmoleküle (EGF-TM7 Familie), die sich durch mehrere EGF-Domänen im extrazellulären N-Terminus und eine sieben-transmembranöse (TM7) Region auszeichnet (Gray *et al.*, 1996; McKnight & Gordon, 1996). CD97 ist ein heterodimeres Glycoprotein, bei dem die glykosylierte α -Kette (75-90 kDa), die dem extrazellulären Anteil entspricht, durch alternatives Splicing in 3 Isoformen existiert und die unglykosylierte β -Kette den transmembranösen Anteil (28 kDa) repräsentiert. Auf der Basis dieser Struktur ist eine duale Ligandeninteraktion für CD97 vorstellbar: Bindung an andere Zelloberflächenmoleküle oder Komponenten der extrazellulären Matrix über die EGF-Domäne und als Hormon-Rezeptorfunktion der TM7 Region.

Die EGF-Domänen besitzen Ca^{2+} -Bindungsstellen, die die Konformation dieser Domänen stabilisieren und damit direkt Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Sie wurden u.a. in Komponenten der extrazellulären Matrix identifiziert und spielen eine Rolle in Adhäsionsprozessen. CD97 enthält im extrazellulären Anteil weiterhin ein Arg-Gly-Asp-(RGD) Motiv, das eine Haupterkennungssequenz für verschiedene Integrine darstellt. Der transmembranäre Anteil wird durch sieben Domänen gebildet, wie sie für G-Protein gekoppelte Rezeptoren charakteristisch sind. In diesem Bereich zeigt CD97 etwa 25 % Homologie zu Vertretern der Sekretinrezeptorfamilie und könnte über seinen TM7 Anteil zusätzlich als Hormonrezeptor wirken. Wahrscheinlich wird CD97 auf der

Oberfläche in Form von zwei nicht-kovalent gebunden Ketten exprimiert, die aber von einem einzigen Gen kodiert werden. Die Assoziation beider Ketten ist notwendig, damit CD97 korrekt auf der Oberfläche erscheint. Durch Bindung von Lymphozyten und Erythrozyten an CD97 transfizierten COS-Zellen konnte demonstriert werden, daß CD97 adhäsive Funktionen besitzt, daß ein möglicher Ligand CD55 identifiziert wurde und daß die CD97-Isoform mit 3 EGF-Domänen (Pos: 1,2,5) größere adhäsive Wirkung als die mit 4 bzw. 5 EGF-Domänen aufweist (*Hamann et al., 1996*).

1.4.4 Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Metastasierung ist eine Aktivierung lokal produzierter proteolytischer Enzyme, welche Invasion und einen Abbau der extrazellulären Matrix bewirken. Zu diesen Enzymen zählen die Metalloproteinasen. Die Matrix-Metalloproteinase-Familie (MMP) gehört zu den Zink-Atom-abhängigen Endopeptidasen. Sie besteht aus 14 Enzymen und wird in 5 Gruppen eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Elastasen und Membrane-type-MMPs (*Liotta & Stetler-Stevenson, 1990; Matrisian, 1990; Liotta et al., 1991; Birkedahl-Hansen et al., 1993; Mignatti & Rifkin, 1993*). Alle Enzyme werden in Form eines Proenzym (Zymogen) innerhalb des Zytoplasmas sezerniert und extrazellulär aktiviert (*Stetler-Stevenson et al., 1989a,b; Ray & Stetler-Stevenson, 1994*).

In-vitro Studien haben gezeigt, daß Detergenzien oder proteolytische Enzyme in der Lage sind, eine Konformationsveränderung innerhalb des Proenzym und dadurch einen autokatalytischen Schritt zu aktivieren (*Rucklidge et al., 1994*). Die Aktivierung und die enzymatische Aktivität von MMPs, insbesondere MMP 9 und MMP 2, werden von der jeweiligen endogenen Tissue Inhibitor Metalloproteinase 1 (TIMP-1) oder 2 (TIMP-2) reguliert (*Stetler-Stevenson et al., 1989b; Liotta & Stetler-Stevenson 1990; Liotta et al., 1991; Mignatti & Rifkin, 1993; Stetler-Stevenson et al., 1993*). Untersuchungen der Expression von MMPs- und TIMPs-Genen legen eine Korrelation mit verstärkter lokaler Tumordinfiltration, erhöhter Metastasierungsrate und Invasivität der Tumoren nahe (*Levy et al., 1991; Muller et al., 1993; Gress et al., 1995*). Erhöhte MMP-Expressionen gehen mit einer Steigerung der Tumorgenität einher, während hohe TIMP-Expressionen die Zellproliferation und Kanzerogenität hemmen sollen. Dabei sollen die Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren während der Tumorinitiation vorwiegend von Fibroblasten und Stromazellen

und erst in späteren Tumorstadien und nach Dedifferenzierung von den eigentlichen Tumorzellen exprimiert werden (*Hofmann et al., 1998; Shi et al., 1999*). Des Weiteren gelten MMPs und TIMPs gemeinsam als Marker für neuroendokrine Zellen, welche ihren Ursprung im APUD- (Amine Precursor Uptake Decarboxylation) Zellsystem haben (*Tomita, 1997*). MMPs sind hauptsächlich für den extrazellulären Abbau verantwortlich, während TIMPs die Wirkung von MMPs regulieren. Die Expression sowohl von MMPs als auch von TIMPs kann exogen beeinflusst werden. Die Behandlung mit Retinol oder *all-trans*-Retinsäure führte zu einer Wachstumshemmung, zugleich wurde die MMP-Synthese gehemmt und die TIMP-Produktion der Blutgefäß-Endothelzelle stimuliert (*Braunhut, 1994*).

Es gibt in der Literatur nur wenige Daten über Matrix-abbauende und -umstrukturierende Prozesse während der Dedifferenzierung in Schilddrüsentumoren. Verschiedene Komponenten der Basalmembran sind bei undifferenzierten Karzinomen immunhistochemisch nicht nachweisbar, während sie in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen unterschiedlich stark exprimiert sind (*Kato, 1993*). Untersuchungen bei Mamma-, Kolon- oder hepatozellulären Karzinomen (*Muller et al., 1993; Barsky et al., 1983; Grigioni et al., 1991*) lassen vermuten, daß der Verlust sowie der unterschiedliche Expressionsgrad von Basalmembran-Komponenten Ausdruck des lokal infiltrativen und Metastasierungspotentials der Tumorzellen ist (*Liotta et al., 1980*).

1.4.5 Apoptose-induzierende Gene

Seit Beginn der 90er Jahre konnte gezeigt werden, daß Chemotherapeutika und Bestrahlung Apoptose oder programmierten Zelltod auslösen können, und daß diese induzierte Apoptose einen wesentlichen Mechanismus der onkologischen Therapie darstellt. Gleichzeitig wurde erkannt, daß Krebszellen eine sehr variable Anfälligkeit für die Induzierbarkeit von Apoptose haben und daß unter Chemotherapie die Apoptose-Anfälligkeit weiter vermindert werden kann (*Fisher & Morgan, 1994*). Die Mechanismen der Therapie-induzierten Apoptose-Auslösung in Tumorzellen und ihrer Modulation bei primärer oder erworbener Apoptose-Resistenz sind erst unvollständig bekannt. Die Initiierung des Apoptosesignals erfolgt z.B. durch den membranständigen Fas-Rezeptor (von F7-associated surface protein) oder APO-1/CD95 (apoptosis-inducing-protein-1/cluster-of-differentiation-antigen-95) (*Itoh et al., 1991; Trauth et al., 1989*). Dabei wird das apoptotische Signal durch Bindung intrazellulärer Adaptermoleküle an die soge-

nannte „Death-Domain“ des Fas/APO-1 übertragen (*Peter et al., 1996*). Die physiologische Aktivierung von Fas erfolgt durch FasL, ein Typ-II-Membranprotein, das überwiegend von aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird (*Suda et al., 1993*). Neben FasL könnten auch andere Liganden von „Death-Domain“-Rezeptoren (ddRs) der TNF/NGF-Rezeptor-Familie als Beteiligte an der Sensitivität von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika vermutet werden (*Krammer, 1997*), besonders der Ligand TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand, *Pan et al., 1997*). Die Apoptoseauslösung durch TRAIL erfolgt über die ddRs DR4 und DR5 (*Pan et al., 1997*), die als funktionelle Homologe zu Fas gesehen werden können und die in Tumorzellen vermehrt vorgefunden werden. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem Fas/FasL- und dem TRAIL-System liegt wahrscheinlich in der Regulation der Ligandverfügbarkeit an den jeweiligen Apoptoserezeptoren durch andere Ligand-bindende Proteine. Zur Expression und Bedeutung der parakrinen Interaktionen von Fas und FasL oder von anderen ddRs mit ihren Liganden für die Ansprechbarkeit auf die Chemotherapie bei Schilddrüsenmalignomen unterschiedlichen Differenzierungsgrades gibt es jedoch bisher keine Kenntnisse.

2 Ziele der Untersuchungen

Die gestörte Funktion der Zelladhäsionsproteine, extrazellulären Matrixproteine, zellulärer Proteinase, Apoptosegene und anderer Peptidsignale ist wesentlicher Bestandteil der Tumorentwicklung und Tumormetastasierung. Die Analyse dieser Faktoren läßt darüber hinaus neue Erkenntnisse zur Tumorsensitivität gegenüber Therapiestrategien und die Entwicklung kausal begründbarer präventiver Therapien bei Maladaptationsvorgängen im Verlauf der Tumorgenese erhoffen.

Die Ziele der vorliegenden Untersuchung sind:

1. An menschlichen Schilddrüsengeweben die Expressionen von TSH-Rezeptor, E-Cadherin, Matrixmetalloproteinasen, CD97 und Apoptose-induzierenden Genen zu überprüfen und normale mit pathologischen Geweben zu vergleichen,
2. An humanen Schilddrüsentumorzelllinien zu untersuchen, ob die Regulierbarkeit der o.g. Marker durch Behandlungen mit Regulatoren der Differenzierung sowie der Dedifferenzierung noch möglich ist.
3. Die Entwicklung eines Tiermodells, welches erlaubt, die Bedeutung der pulsatischen TSH-Sekretion auf Funktion, Proliferation und Morphologie der Schilddrüsenzellen zu überprüfen. Da zum Zeitpunkt der Untersuchungen Ratten-TSH (rTSH) mit definierter Bioaktivität nicht zur Verfügung stand, sollte versucht werden, TRH als hypothalamisches Releasing-Hormon von TSH einzusetzen, um endogenes, biologisch aktives rTSH freizusetzen,
4. Die *in-vivo*-Modulation des Zielorganes Schilddrüse unter Suppression der endogenen hypothalamo-hypophysär-thyreoidalen Achse durch exogene Infusion sowohl von spezieseigenem Ratten-Thyreotropin (rTSH) als auch von rekombinanten speziessfremden humanen TSH (rec-hTSH) zu untersuchen. In beiden Ansätzen konnten die unterschiedlichen Applikationsformen (pulsatile vs. kontinuierliche Infusion) hinsichtlich ihrer biologischen Wirkung auf das Zielorgan Schilddrüse verglichen werden,
5. Die *in-vivo*-Wirkung zusätzlicher Umwelteinflüsse wie Jodmangel und externer Bestrahlung auf die Entwicklung von Schilddrüsentumoren zu studieren.

3 Material und Methoden

3.1 Zellbiologische Untersuchungen

3.1.1 Gewebe und Zelllinien

3.1.1.1 Gewebe und Primärkulturen

Die Untersuchungen wurden durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Hochschule Hannover und der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg genehmigt. Die Patienten gaben ihr Einverständnis zur Verwendung ihres Gewebes für wissenschaftliche Untersuchungen. Die untersuchten humanen Schilddrüsentumorgewebe stammten von Patienten, die aus klinischen Indikationen zur Operation kamen. Die „normalen“ Schilddrüsenorgewebe wurden aus der Nachbarschaft von Schilddrüsenadenomen oder im Rahmen von Schilddrüsenresektionen wegen eines Hyperparathyreoidismus gewonnen.

Alle Gewebe für zell- und molekularbiologische Untersuchungen wurden sofort nach der Entnahme schockgefroren und bis zur Untersuchung in Flüssigstickstoff oder bei -80°C gelagert.

Für die Primärkultur der humanen Schilddrüsenzellen wurde ca. 5 g Gewebe in etwa 5 ml DMEM-F12 (siehe dazu 3.1.2) auf Stecknadelgröße zerkleinert, mit 5 mg Kollagenase (Worthington Biochemicals, Hamburg) bei 37°C für ca. 45 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand auf einem mit Percoll gefüllten Röhrchen gradient zentrifugiert. Die Schilddrüsenzellen wurden dann mit HBSS-Medium mindestens 3mal gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Um die Regulation der E-Cadherin-Expression zu untersuchen wurden zunächst Primärkulturen von insgesamt 6 PTC-Geweben angelegt. Von diesen wurden 2 Primärkulturen infiziert, daher wurden zur Auswertung nur 4 in Betracht gezogen.

Nach der Aussaat und nach einer Ruhephase von 24 Stunden in Kulturmedium + 5% FCS werden die Zellen 72 Stunden lang in 10% FCS-Medium kultiviert. Die Zellen wurden dann für 24 Stunden in Leermedium kultiviert, danach stimuliert (siehe dazu 3.1.2).

3.1.1.2 Zelllinien

Für die Untersuchungen der Regulation von E-Cadherin, CD97 sowie MMPs und ihren Inhibitoren wurden zusätzlich zu den Geweben zwei von humanen Schilddrüsengeweben abgeleitete Zelllinien mit unterschiedlicher Herkunft und Differenzierungsgrad untersucht. Die Zelllinien FTC-133 (*Goretzki et al., 1989*) und die Zelllinie 8505C (*Itoh et al., 1991*) wurden in DMEM-F12 mit 10% Fötalkälberserum (FCS), mit 100 IU/ml Penicillin und 0.1 mg/ml Streptomycin kultiviert. Das Medium wurde nach 2 bis 3 Tagen gewechselt.

FTC-133

Die Zelllinie FTC-133 wurde aus der Lymphknotenmetastase eines 42-jährigen Patienten mit follikulärem Schilddrüsenkarzinom etabliert. Die Zellen produzieren Tg (*Hoang-Vu et al., 1991*) und besitzen EGF- und TSH-Rezeptoren (*Goretzki et al., 1989*, Hoang-Vu, unpubl. Daten).

8505C

Die Zelllinie entstammt aus dem Primärtumor einer 78-jährigen Patientin. Histologisch handelte es sich aufgrund des Anteils undifferenzierter Zellen um ein undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom mit papillären Strukturen (*Itoh et al., 1991*).

3.1.2 Stimulationsversuche

Für die Stimulation wurden die Zellen mit einer Konzentration von 0.5×10^6 in einer Kulturflasche mit 75 cm² Bodenfläche in DMEM-F12 (Basalmedium) + 10% FCS kultiviert. Nach 3 bis 5 Tagen bildeten die Zellen eine konfluente Monolayer Schicht. Das Medium wurde dann durch Basalmedium (ohne FCS) für 24 Stunden ersetzt. Nach 24 Stunden im Basalmedium wurden die Zellen für 24, 48 bzw. 72 Stunden wie folgt stimuliert:

Kontrolle	Basalmedium
Insulin	Basalmedium + 5 µg/ml
Phorbol ester (PMA)	Basalmedium + 10 ng/ml
Forskolin	Basalmedium + 10^{-5} M
Rec hTSH	Basalmedium + 100 µU/ml
EGF	Basalmedium + 5 ng/ml

In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen vor der Stimulation mit $1\mu\text{M}$ *all-trans*-Retinsäure für 72 Stunden vorbehandelt. Nach 24 Stunden im Basalmedium wurden sie dann wie oben beschrieben stimuliert. Danach wurden die Zellen geerntet und Gesamt-RNA gewonnen.

Für die Immunhistochemie wurden die Zellen direkt auf Thermanox-Plättchen (Coverslips, Nunc, USA) kultiviert und, wie oben beschrieben, stimuliert. Nach dem Absaugen von Kulturmedium wurden die Coverslips mit PBS gespült und unter dem Laminarflow getrocknet. Anschließend wurden sie für 10 min im kalten Methanol bei 4°C fixiert, nochmals mit PBS gespült und mit Einfriermedium (42.8 g Saccharose, 0.33 g MgCl_2 , 250 ml Glycerol, 250 ml PBS) überschichtet. Die Coverslips können bei -20°C bis zu einem Jahr gelagert werden.

3.1.3 RNA-Gewinnung

Die RNA-Gewinnung erfolgte entweder durch die konventionelle Methode nach *Chirgwin et al. (1979)* oder mit einem kommerziell erhältlichen Kit.

Das schockgefronene Gewebe wurde in etwa 0.1 g große Stücke zerkleinert und ohne aufzutauen in sterile Röhrchen überführt. Auf das Gewebe wurde pro 0.1 g ca. 1 ml Guanidiniumthiocyanat (4 M GTC, 25 mM Natriumcitrat (pH 7.0), 0.5% Sarcosyl, 0.1 M Mercaptoethanol) zugesetzt und mittels Ultraturrax homogenisiert. Die Zellysate wurden mit 750 μl Cäsiumchlorid (CsCl , 5.76 M) in die speziellen Zentrifugenröhrchen (11x34 mm) überschichtet. Die Proben wurden für 20 Stunden bei 34000 UPM und 25°C zentrifugiert (Ultrazentrifuge TL100, TLS 55 Rotor, Beckmann, München). Nach Abpipettieren von in der Grenzfläche zum CsCl -Kissen befindlichen DNA- und Proteinresten wurde der CsCl -Rest dekandiert. Um eine mögliche Verunreinigung zu vermeiden, wird der Röhrchenboden abgetrennt, die RNA ist als Pellet am Boden erkennbar. Nach verschiedenen Waschvorgängen wurde die RNA in RNase-freies Aqua bidest gelöst bzw. verdünnt, photometrisch gemessen, portioniert und bei -85°C gelagert.

Eine einfachere Technik der RNA Gewinnung ist die Anwendung eines kommerziell erhältlichen Trizol®-Reagents (Gibco, München). Das tiefgefrorene Gewebe wurde mittels Dismembrator (Braun, Melsungen) unter sterilen Bedingungen pulverisiert. Das Pulver wurde im Trizol® Reagent gelöst (ca. 100 mg/ml Trizol). Bei Raumtemperatur wurden die Proben inkubiert, mit 0.2 ml Chloroform geschüttelt, weitere 3

min inkubiert, anschließend 15 min bei 12000g und bei 4°C zentrifugiert. Die oberste Phase wurde in ein neues Cup überführt, 0.5 ml Isopropanol zugesetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, 10 min bei 12000g bei 4°C zentrifugiert. Dabei setzte sich das RNA-Pellet ab. Nach einem mit 75%igem Ethanol Waschvorgang, 5-minütiger Zentrifugation bei 7500g bei 4°C wurde das Pellet in Vakuum getrocknet, je nach Größe des Pellets wurde es in 20-100 µl RNase freiem Wasser gelöst, gemessen, portioniert und bei -85°C gelagert.

3.1.4 Northern-Blot zum Nachweis von E-Cadherin- und TSH-Rezeptor-mRNA

Die elektrophoretische Trennung erfolgte in einem 1% Agarosegel bei 80V. Je nach Denaturierungsart wurde das Gel entweder mit Glyoxal/Dimethylsulfoxid, danach mit Acridinorange oder mit Formaldehyd/Formamid, dann mit Ethidiumbromid gefärbt. Die unabhängige Färbung zeigte, ob alle Proben mit der gleichen Menge an mRNA geladen wurden. Nach mehreren Waschvorgängen wurde die mRNA auf einen Nylonfilter (Pall Biodyne A®, Transfer membrane, 0.2 µm, Pall, Dreieck) transferiert, mittels Autocrosslink-Verfahren fixiert (UV-Licht 120 mJ, Biometra, Göttingen) und dann in Folie eingeschweißt.

Die E-Cadherin-Sonde ist ein BamHI-Bluescript-Fragment mit einer Länge von 300 Basenpaaren, sie wurde freundlicherweise von W. Birchmeier, Berlin zur Verfügung gestellt. Nach Klonierung, Schneiden des Plasmids und Isolierung des Inserts wurde die gereinigte Sonde mittels eines random primed DNA labelling kits (Boehringer Mannheim) mit P³² markiert. Nach einer Inkubation des Nylonfilters mit Prähybridisierungslösung (in 100ml: 50ml Formamid, 20ml 20xSSC, 10ml 10% SDS, 5ml ssDNA (10mg/ml), 10ml 50xDehnhard's, 5ml Aqua bidest) für 4 Stunden bei 42°C wurde die markierte Sonde zugesetzt, über Nacht bei 42°C inkubiert. Nach mehreren Waschschritten (bis noch ca. 20 Counts über Umgebungsstrahlung) wurde der Filter eingeschweißt und bei -80°C auf Hyperfilm MP® (Amersham, Braunschweig) autoradiographiert.

Zusätzlich wurde eine Sonde von humanen TSH-Rezeptor-DNA, 2.4 kB BamHI-XhoI-pSVL-Fragment angewendet, welche freundlicherweise von J. Dumont, Brüssel, zur Verfügung gestellt wurde.

3.1.5 RT-PCR

Insgesamt wurden 16 Primer für die zu untersuchenden Gene und Primer für GAPDH und β -Actin als Kontrolle angewendet (Tab. 1 und 2).

Tab. 1: Größe der Amplifikate, Annealing Temperatur und Anzahl der Zyklen der verwendeten Primer

Primer	Basenpaare	Annealing Temperatur	Zyklenzahl
GAPDH	443 bp	60°	26
β -Actin	615 bp	68°	33
Fas	819 bp	56°	32
Fas- Ligand	344 bp	60°	40
DR 4	528 bp	62°	35
DR 5	539 bp	62°	33
DcR 1	441 bp	62°	40
TRAIL	437 bp	62°	34
TNF R 1	304 bp	62°	30
TNF α (Ligand)	342 bp	60°	35
MT-MMP1	493 bp	62°	34
MMP 1	560 bp	64°	39
MMP 2	523 bp	59°	30
MMP 9	530 bp	64°	35
TIMP 1	405 bp	56°	30
TIMP 2	371bp	59°	30
TIMP 3	428 bp	64°	30
CD97	331 bp	64°	30

Die für die PCR benötigte cDNA wurde mittels Superscript II-Kit® (Gibco, München) hergestellt. Für die PCR wurden 16.3 μ l Aqua bidest, 2.5 μ l 10xPCR-Puffer, 3.0 μ l dNTP-Mix, jeweils 0.25 μ l 10 μ M Primer sense und antisense (siehe Tab. 1 und 2), 0.2 μ l Taq-DNA-Polymerase (Perkin Elmer) und 2.0 μ l cDNA in ein PCR Tube pipetiert. Die PCR wurde mittels eines Thermozyklers (TRIO®, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Größe der Amplifikate, Annealing Temperatur sowie optimale Zyklenzahl sind in

Tab. 1 dargestellt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte auf einem 1%igen Agarosegel bei 70 mA in TBE-Puffer und dauerte etwa 2 Stunden.

Die Auswertung der Transkripte erfolgte semiquantitativ immer im Vergleich zur entsprechenden Positivkontrolle.

Tab. 2: Verwendete Primer und deren Sequenzen. s: Sense, as: Antisense

Primer		Sequenz
GAPDH	s	5' CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG 3'
	a	5' TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG 3'
β- Actin	s	5' GGC ATC GTG ATG GAC TCC G 3'
	as	5' GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3'
Fas	s	5' ATG CTG GGC ATC TGG ACC 3'
	as	5' CTG TTC TGC TGT GTC TTG G 3'
Fas- Ligand	s	5' GGA TTG GGC CTG GGG ATG TTT CA 3'
	as	5' TTG TGG CTC AGG GGC AGG TTG TTG 3'
DR 4	s	5' TTT GTC GTC GTC GGG GTC C 3'
	as	5' TCC ACA ACC TGA GCC GAT GC 3'
DR 5	s	5' CAC CCA ACA AGA CCT AGC TC 3'
	as	5' GTC GTT GTG AGC TTC TGT CC 3'
DcR 1	s	5' AGT TCG TCG TCG TCA TCG TC 3'
	as	5' TGG CAC CAA ATT CTT CAA CAC 3'
TRAIL	s	5' CAC ATA ACT GGG ACC AGA GG 3'
	as	5' TGG TCC ATG TCT ATC AAG TGC 3'
MT-MMP1	s	5' ACA TTG GAG GAG ACA CCC AC 3'
	as	5' TAG GCA GTG TTG ATG GAC GC 3'
MMP 1	s	5' TGG GAG CAA ACA CAT CTG AC 3'
	as	5' ATC ACT TCT CCC CGA ATC GT 3'
MMP 2	s	5' GCA GAT GCC TGG AAT GCC AT 3'
	as	5' AGG GTT CTG TGA GCC ACA GA 3'
MMP 9	s	5' GCT ATG GTT ACA CTC GGG TG 3'
	as	5' GCC ATC TGC GTT TCC AAA CC 3'
TIMP 1	s	5' ATT CCG ACC TCG TCA TCA G 3'
	as	5' CGT CCA CAA GCA ATG AGT G 3'
TIMP 2	s	5' GAC GTT GGA GGA AAG AAG GA 3'
	as	5' CGT TGG AGG CCT GCT TAT GG 3'
TIMP 3	s	5' ATG TAC CGA GGC TTC ACC AA 3'
	as	5' GGG TCT GTG GCA TTG ATG AT 3'
CD 97	s	5' CAG CAT CAG TGT GAC AGC TC 3'
	as	5' CTA TGA GGT GCC GGA CAG GT 3'

3.1.6 Immunhistochemie

Um die endogene Aktivität von Peroxidase zu verhindern und unspezifische Reaktionen zu minimieren, wurden die Kryoschnitte bzw. Coverslips in Methanol/H₂O₂ (4Teile Methanol, 1 Teil 3%iges H₂O₂) für 20 min inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Schweineserum (1:5 verdünnt) für weitere 20 min inkubiert. Mit dem 1%igen BSA/PBS verdünnten Antikörper (Tab. 3) wurden die Präparate im Kühlschrank bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach mehreren zwischengeschalteten Waschschrritten wurden die Präparate mit dem Brückenantikörper für 30 min bei Raumtemperatur, dann mit Streptavidin-Peroxidase (LSAB, Peroxidase, Chromogen-Substrat, Dako, Hamburg) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Hämalaun (1:1 verdünnt) gegengefärbt, gewaschen und mit Aquatex eingebettet.

Die Spezifität der Immunhistochemie wurde durch Weglassen einzelner Schritte im Protokoll, bzw. durch Ersetzen des primären Antikörpers durch ein nicht immuneres Serum überprüft. Die Auswertung der Präparate erfolgte semiquantitativ immer im Vergleich zur entsprechenden Positivkontrolle.

Tab. 3: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnung

Antikörper		Verdünnung
E-Cadherin	Monoklonal	1:500
CD 97	Monoklonal	unverdünnt
APO-1 / Fas	Monoklonal	1:20
Fas Ligand	Monoklonal	1:100
MMP-2	Monoklonal	1:10
MMP-9	Monoklonal	1:10
TIMP-1	Monoklonal	1:10
TIMP-2	Monoklonal	1:10

3.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

Für die Durchführung der Tierversuche wurde die Genehmigung gemäß §9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes vom 18.08.1986 (BGBl. I S. 1391) von der Bezirksregierung Hannover gemäß Antrag von 27.11.1991 und vom Regierungspräsidium Dessau gemäß Antrag vom 30.11.1995 sowie vom 11.11.1998 erteilt. Die Versuche, die am National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA durchgeführt wurden, wurden gemäß Addendum to Animal Proposal No. 916-13 „Bioactivity and Metabolic Clearance of TSH“ am 18.08.1992 durch den wissenschaftlichen Direktor des National Institute for Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), den Vorsitzenden des Animal Care and Use Committee (AUCC) sowie durch den verantwortlichen Institutsveterinär genehmigt.

3.2.1 Versuchstiere

Adulte männliche Sprague-Dawley-Ratten (Han:SPRD) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 342 ± 26 g ($x \pm SD$) wurden unter pathogenfreien Bedingungen in Einzelkäfigen gehalten. Die Temperatur betrug durchschnittlich $24 \pm 1^\circ\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit zwischen 50-60%. Das Lichtregime war konstant zwischen 06.00-18.00 Uhr. Die Tiere erhielten ein Standardfutter (Altromin®, Lage; Fortified) mit einem konstanten Jodgehalt von 1mg/kg Futter. Wasser stand je nach Experimenten mit oder ohne Zusatz von T3 bzw. T4 ad libitum zur Verfügung.

Am Ende der experimentellen Phase wurden die Tiere unter Äthernarkose, nachdem beide Schilddrüsenlappen entnommen wurden, durch eine Dislokation der Halswirbel getötet.

3.2.2 Technik zur Plazierung eines Dauerkatheters

Nach einer Gewöhnungsphase von 5 Tagen wurde ein Katheter in der Vena jugularis externa plaziert. Hierzu wurde je nach Größe des Tieres, etwa 6 cm vom abgeschragten Ende eines ca. 35 cm langen Silikonschlauches (Silastic®, medical grade tubing, 0.03 inch Innendurchmesser, 0.065 inch Außendurchmesser, Dow Corning Corp., Midland, Michigan, USA) eine Silikonscheibe von 0.5 cm Durchmesser mittels eines Silikonklebers (Silastic®, medical adhesive silicone Type a, Dow Corning Corp.,

Midland, Michigan, USA) befestigt. Diese Silikonscheibe dient der Verankerung des Katheters dorsal unter der Haut.

Die Analgesierung und Narkotisierung der Tiere erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 10 mg Ketaminhydrochlorid/100 g Körpergewicht (KG) und 0.2 mg Dihydroxyldinothiazin /100g KG, wobei eine ausreichende Narkosetiefe nach etwa 30-40 min erreicht wurde.

Nach Abrasur, Reinigung und Desinfektion des Operationsfeldes wurde das Tier in Rückenlage durch um die Pfoten gewickeltes Pflaster auf einer mit Paraffin ausgegossenen flachen Wanne fixiert. Es folgte ein 1-2 cm langer Hautschnitt etwa 1 cm rechts lateral und parallel der Medianlinie des Halses über der rechten Vena jugularis externa. Das Gefäß wurde durch stumpfe Präparation des überliegenden subkutanen Fett- und Bindegewebes freigelegt. Nach Sichtbarwerden der Vene wurde die Manipulation unterbrochen, die rechte vordere Extremität des Tieres mobilisiert und mittels einer halbgebogenen Klemme nach Rochester-Pean ein subkutaner Tunnel vom kranialen Drittel des Hautschnitts nach lateral und dorsal bis zur dorsalen Medianlinie etwa 2-3 cm kaudal einer Verbindungslinie beider Ohren präpariert. Durch diesen wurde dann von ventral ein Trokar von 13G Größe vorgeschoben und mit Hilfe eines kleinen dorsalen Hautschnitts (ca. 2 mm) nach außen geführt. Der Katheter wurde so in das Trokarlumen eingeführt, daß nach Entfernen des Trokars nach dorsal die am Katheter angeklebte Silikonscheibe subkutan zu liegen kam und den Katheter gegen Zug von dorsal fixierte.

Nach erneuter Fixation der rechten vorderen Extremität des Tieres wurde das die Vena jugularis externa unmittelbar bedeckende Bindegewebe bis auf die Tunica adventitia in einer Länge von etwa 1cm abpräpariert. Anschließend wurde zunächst kranial der späteren Inzisionsstelle die Vene mit einer Pinzette stumpf unterfahren, so daß durch zwei Ligaturfäden, die jeweils kaudal und kranial der vorgesehenen Inzisionsstelle durchgezogen wurden, unter leichter Zugspannung der Blutfluß gedrosselt wurde. Dieses Vorgehen diente der Fixation der Vene für die folgende Inzision und minimierte den Blutverlust beim Einführen des Katheters.

Mit Hilfe einer mikrochirurgischen Schere nach Vannas wurde nun die Vene inzidiert. Durch die Inzisionsstelle konnte das Ende des mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Katheters intravasal vorgeschoben werden. Hierbei wurde besonders beachtet, daß die dorsal subkutan gelegene Silikonscheibe ihre Lage nicht änderte. Aufgrund der Katheterabmessungen und der vergleichbaren Körpergröße der Tiere lag

das intravasale Katheterende so in der Vena cava superior. Anschließend wurden Katheter und Vene kranial der Kathetereintrittsstelle mit einer zweiten Polyesternaht umschlungen oder die Eintrittsstelle des Katheters mit Fibrinkleber abgedichtet. Nach gründlichem Spülen mit 0.9%iger Kochsalzlösung, sterilem Abtupfen des Operationsgebietes wurden die subkutanen Gewebeschichten sowie die Haut durch eine fortlaufende Naht mit resorbierbarem Polyglycolsäurefaden verschlossen.

Das Tier wurde dann in Bauchlage gedreht und die dorsale Katheteraustrittsstelle inspiziert. Der Katheter wurde mit etwa 1-1.5 ml einer sterilen 0.9%iger Kochsalzlösung, die 250 IU Heparin/ml enthielt, gespült. Das frei rasierte Areal am Hals des Tieres wurde mit einem hypoallergischen Pflasterbandstreifen zirkulär überlappend unter Freilassung der eigentlichen Katheteraustrittsstelle bedeckt. Anschließend wurde durch zwei gegeneinander geklebte Gewebestreifen der Katheter senkrecht zum Hautniveau fixiert und durch eine kranial und eine kaudal gelegene kutane Haltenaht zusätzlich befestigt.

Der Katheter wurde aus dem Pflasterband zusammen mit einer Nylonschnur, die mit den Fäden der kutanen Haltenähte verknotet worden war, durch einen geschlitzten etwa 20 cm langen PVC-Schlauch geführt. Diese Schutzkonstruktion wurde zusätzlich durch ein eng anliegendes schlauchförmiges Metallgeflecht (Abschirmschlauch eines Koaxialkabels) von etwa 15 cm Länge verstärkt und durch Gewebestreifen am Nacken des Tieres und am PVC-Schlauch befestigt. Katheter und überstehender Nylonfaden wurden mit einem Pflasterband in dem oberen Ende des PVC-Schlauches fixiert. Der in der Schutzkonstruktion umhüllte Katheter wurde zwischen zwei Gitterstäben der Käfigabdeckung nach oben geführt. Durch die flexible Befestigung der Katheterkonstruktion an einem Gummiband konnte sich die Ratte innerhalb des Käfigs freibewegen und insbesondere das Futter- und Wasserreservoir ungehindert erreichen. Durch die Ummantelung des Katheters mit dem PVC-Schlauch und dem Metallgeflecht wurde eine Beschädigung durch Kratzen oder Beißen verhindert.

Das hier vorgestellte Verfahren zur Platzierung eines Dauerkatheters in der Vena jugularis externa einschließlich der Konstruktion einer Schutzummantelung ermöglichte einen sicheren zentralvenösen Zugang. Dieser konnte ohne Öffnen des Käfigs von außerhalb für die Gewinnung venöser Blutproben und für die intravenöse Applikation von Substanzen genutzt werden. Die Durchgängigkeit und Rückläufigkeit des Katheters mußten engmaschig überwacht werden. Wenn ein Tier keine Infusionsbe-

handlung erhielt, wurde der Katheter mindestens zweimal täglich mit der oben beschriebenen heparinhaltigen Kochsalzlösung durchgespült.

3.2.3 Experimentelles Design

3.2.3.1 TRH-Stimulationsmodell

In diesem Versuchsansatz wurde eine Modulation des Zielorgans Schilddrüse unter physiologischen Rückkopplungsverhältnissen entlang der hypothalamo-hypophysär-thyreoidalen Achse indirekt über Freisetzung von endogenen TSH durch exogene Applikation von Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) induziert. TRH stimuliert auf hypophysärer Ebene die endogene Freisetzung von TSH, welches auf thyreoidaler Ebene sowohl funktionelle als auch morphologische Veränderungen bewirkt.

In diesem Versuch wurden zwei Katheter in den beiden Jugularvenen platziert. Nach einer 5-tägigen Erholungsphase wurden die Tiere in 5 Gruppen eingeteilt:

- Kontrolle, ohne Infusion (C)
- Dauerinfusion mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl-C, 1.2 ml/24h + 0.4 U Heparin/ml).
- Pulsatile Infusion von NaCl als einminütiger Puls von 100 µl alle 2 h (NaCl-P) + 0.4 U Heparin/ml).
- Kontinuierliche Applikation von 24 µg TRH/24 h in 1.2 ml NaCl+Heparin, wie unter 2 (TRH-C, TRH: Relefact® TRH 200, Hoechst AG).
- Pulsatile Gabe von 2 µg TRH in 100 µl/2h über eine Minute (TRH-P) wie unter 3.

Pulse wie kontinuierliche Infusion wurden mit Hilfe einer frei programmierbaren Miniinfusionspumpe (Cyclomat®, Ferring, Kiel) appliziert. Am Ende der Versuchsperiode wurden die Tiere getötet und die Schilddrüse entnommen.

3.2.3.1.1 Funktionsstudien

Fünf Tage vor und während der Infusion wurde jeweils eine Blutprobe zwischen 8.00-8.30 Uhr genommen. Um die physiologische sowie die durch TRH-Infusion induzierte TSH-Sekretion nachzuprüfen, wurde 0,3 ml Blut in zehnmütigem Abstand am 7. Tag der Stimulation über den rechten Jugularvenenkatheter während der gleich-

zeitigen Gabe von NaCl oder TRH über den linken Katheter in der Zeit zwischen 8.00 und 11.00 Uhr genommen. Nach der Bestimmung von TSH wurden Plasmaproben in stündlichen Intervallen gepoolt und die Plasmaspiegel von T3 und T4 bestimmt.

Zum Nachweis der erfolgreichen Infusion von TRH in den oben genannten Mustern wurden in Kooperation mit Prof. Dr. T. Visser, Rotterdam, die zirkulierenden TRH-Spiegel durch Abnahme nach folgendem Schema überprüft: 9.30-10.00: 10-minütiger Abstand, 10.00 h: TRH Puls, 10.00-10.10h alle 2, 10.10-11.00h alle 10 Minuten. Um eine Responsivität der hypothalamo-hypophysären Achse nach 7-tägiger Infusion zu überprüfen, erhielten alle Tiere um 11.00 Uhr einen Bolus von 0.1mg TRH intravenös appliziert. 30 min später erfolgte eine letzte Blutentnahme.

Um eine mögliche TRH-Wirkung auf die Schilddrüse zu untersuchen, wurden die Tiere von 2 Tagen vor bis zum Ende der Infusion täglich mit 10µg Thyroxin/100 g Körpergewicht (KG)/Tag i.v (L-Thyroxin, Henning, Berlin) behandelt. Die Infusions-schemata entsprachen den im vorhergehenden Versuchsteil beschriebenen Behandlungsmodi (NaCl-C+T4; NaCl-P+T4; TRH-C+T4 und TRH-P+T4).

3.2.3.1.2 Proliferationsstudien mit BrDU

Für die Untersuchungen der Proliferation der Schilddrüsenzellen wurde allen Tieren des TRH-Modells eine Stunde vor der Beendigung des Versuches 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrDU, 50µg/100g KG, Boehringer Mannheim) i.v. verabreicht. Zur Untersuchung der Wirkung von TRH auf die Schilddrüsenproliferation wurden die Tiere 2 Tage vor der Infusion mit 10µg Thyroxin/100 g KG/Tag (TRH-P+T4, Henning, Berlin) behandelt. Als Positivkontrolle wurden 6 Tiere über einen Zeitraum von 9 Wochen behandelt, wobei PTU (6n-Propyl-2-Thiouracil) in 0.1%-iger Lösung im Trinkwasser verabreicht wurde. Für die Hormonbestimmungen wurden 3 Wochen vor der Behandlung wöchentlich aus der Retroorbitalvene Blutproben gewonnen. Am Ende der Behandlungsphase wurde BrDU vor der Tötung verabreicht.

Durch den Einbau von BrDU in replizierende DNA in der S-Phase des Zellzyklus eignet sich das BrDU-Verfahren als spezifischer Marker für die proliferierenden Zellen eines Gewebes, die deutlich von nicht-proliferierenden Zellen abgegrenzt werden können. Die Schilddrüsen wurden unter Äthernarkose entfernt, gewogen und in 4%igem Formalinpuffer fixiert. Das Gewebe wurde in Paraffin eingebettet und auf eine Dicke von 2-4 µm geschnitten. Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen BrDU (Becton Dickinson, Heidelberg)

mittels ABC-Methode durchgeführt. Zur Auswertung wurden die positiven gegen die nicht-positiven Zellen ausgezählt und bei einer Gesamtzahl von n=1000 Zellen pro Schnitt der Prozentsatz proliferativer Thyreozyten für den Schnitt bestimmt.

Für die Auswertung wurden folgende Kriterien zugrunde gelegt:

- Gezählt wurden nur deutlich erkennbare Schilddrüsenfollikel mit Kolloid-gefülltem Lumen, es wurde ein Bereich der Schilddrüse ausgezählt, der sowohl randständige als auch zentrale Follikel innerhalb eines Quadranten umfaßte.
- Sowohl für die positiven als auch für die nicht-positiven Thyreozyten wurde eine direkte randständige Lage am Kolloid gefordert, um eine eindeutige Zuordnung als Thyreozyt zu gewährleisten.

3.2.3.1.3 Histomorphologie

Neben funktionellen Parametern wurden die histomorphologischen Veränderungen der Schilddrüsen untersucht. Unmittelbar anschließend an die Entnahme der Gewebe erfolgte die Fixation durch Immersion in einer 4%igen Paraformaldehyd- und 2.5%igen Glutaraldehydlösung in phosphatgepufferter Kochsalzlösung.

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden die Gewebe nach einer 4-stündigen Fixation in Paraffin eingebettet, in einer Dicke von 5µm geschnitten und anschließend mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Gewebe nach 24-stündiger Fixation mehrmalig gewaschen und für eine Stunde in ungepufferter, 1%iger Osmiumtetroxidlösung nachfixiert. Nach erneut mehrmaligem Waschen wurden die Gewebe dehydriert, in Kunstharz eingebettet und mit einem Ultramikrotom Schnitte von 60-90 nm Dicke angefertigt. Nach Kontrastierung mit Uranylazetat und Bleizitrat wurden die Schnitte mit einem Elektronenmikroskop (Philips EM 301) ausgewertet. Die Ultrastruktur- und Immunogoldmarkierungsstudie wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Walter Sierralta am Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover, durchgeführt.

3.2.3.1.4 Tg- und T4-Immunogold-Markierung

Für die Untersuchungen der Tg und T4-Immunogold-Markierung wurden die Schilddrüsen sofort nach der Entnahme in Würfel (1x1x1 mm) geschnitten und in mit 2% Paraformaldehyd und 0.5% Glutaraldehyd gepuffertem 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.2 für 4 Stunden fixiert. Danach wurden die Gewebe mit eiskaltem Phosphatpuffer ge-

waschen, dehydriert und anschließend mit LR-Gold® (Plano, München) infiltriert. Die Proben wurden dann in die Gelatinkapsel, Größe 0, welche mit 0.5% Benzoylperoxid aufgefüllt war und LR-Gold beinhaltet, unter 500 mm Hg für 30 min bei 6°C polymerisiert. Nach 2 Tagen wurden die Blöcke wie oben beschrieben geschnitten. Die Schnitte wurden auf Pioloform-coated Gold-Matrix eingebettet, mit Kaninchenantikörper gegen Ratten-Tg (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. JJM Vijlder, Amsterdam) und mit Monoklonalantikörper gegen T4 (Hytest, Biotrend, Köln) für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 4maligem Waschen wurden die Präparate mit Antikaninchen-Gold (Aurion, Durchmesser von Goldpartikel: 15 nm, für Tg) und Antimaus-Gold (Aurion, Durchmesser: 6 nm, für T4) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Schnitte mit 1% Glutaraldehyd fixiert und unter Behandlung mit Uranylacetat leicht kontrastiert.

Zur Auswertung wurden jeweils 5 einzelne Thyreozyten pro Schnitt und 10 Schnitte pro Schilddrüse herangezogen. Die Anzahl der Tg-Goldpartikel (15 nm) und der T4-Goldpartikel (6 nm) wurden zusammengezählt und auf Quadratmikrometer in ER, Apikalmembran und Mitochondrien bezogen. Auf eine Differenzierung der Kontrollgruppe und der TRH-behandelten Gruppe in eine mit pulsatilem und in eine mit kontinuierlicher Infusion behandelten Untergruppe wurde verzichtet.

3.2.3.2 TSH-Stimulationsmodell

In diesem experimentellen Ansatz, der zum Teil im National Institute of Health durchgeführt wurde, wurde durch eine TSH-suppressive T3-Behandlung die endogene TSH-Freisetzung der Versuchstiere während der gesamten Dauer des Versuchs unterdrückt und so eine Interferenz zwischen endogener TSH-Produktion und experimenteller, exogener TSH-Applikation vermieden. Durch dieses Modell kann eine eindeutige Beurteilung des direkten Effekts einer exogenen TSH-Applikation auf Funktion und Morphologie der Schilddrüsen festgestellt werden. Dabei erhielten die Tiere 4 Tage vor dem Versuchsbeginn als Trinkwasser destilliertes Wasser mit einem Zusatz von 0,3 µg/ml 3,5,3'-Triiodo-Thyronin (T3). Das Trinkwasser wurde alle 3 Tage erneuert. Hierdurch wurde durch die exogene TSH-Gabe die endogene TRH- und TSH-Freisetzung und somit die gesamte hypothalamo-hypophysär-thyreoidale Achse supprimiert. Diese Behandlung wurde auch während der mehrtägigen Versuchsphase fortgesetzt.

Analog zu den TRH-Experimenten wurde auch bei diesem TSH-Stimulationsmodell innerhalb jeder Versuchsreihe bei den pulsatile und bei den kontinuierlich behandelten Tieren über die Gesamtdauer des Versuchs eine Infusion einer identischen TSH-Menge in einem identischen Volumen Trägermedium durchgeführt. Bei jeder Versuchsreihe wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, bei der den Tiere ein äquivalentes Volumen der sterilen heparinhaltigen 0.9%igen Kochsalzlösung in den selben Modi infundiert wurde.

Zwei Tage vor der Katheterisierung der Vena jugularis externa wurde die TSH-suppressive Behandlung durch Ersatz des normalen Trinkwassers durch T3-haltiges Wasser begonnen und bis zum Abschluß des Versuches beibehalten. Für die Infusion wurden zwei verschiedene TSH-Präparationen (rTSH und rec-hTSH, NIH, USA) in jeweils 2 Dosierungen verwendet, so daß 4 Versuchsreihen gebildet wurden:

- A: Niedrigdosiertes rTSH (0.36 µg rTSH in 180µl/24 h)
- B: Hochdosiertes rTSH (10.8 µg rTSH in 180 µl/24 h)
- C: Niedrigdosiertes rec-hTSH (3.6 µg rec-hTSH in 180 µl/24h)
- D: Hochdosiertes rec-hTSH (108 µg rec-hTSH in 180µl/24h)

Die zwei Dosierungen der jeweiligen TSH-Präparationen unterscheiden sich um den Faktor 30; um die im Vergleich zu spezie-eigenem TSH geringere Bioaktivität von rec-hTSH innerhalb des Rattenmodells auszugleichen, lagen die Konzentrationen der rec-hTSH-Präparationen jeweils um den Faktor 10 über denen der entsprechenden rTSH-Präparation.

Innerhalb der 4 Versuchsreihen wurden jeweils 2 Gruppen gebildet. Die eine erhielt eine kontinuierliche, die andere eine pulsatile Infusion mit einer identischen absoluten TSH-Menge in einem identischen Volumen Trägermedium über einen Zeitraum von 4 Tagen. Es wurde ein Puls von 5 min Dauer und eine Flußgeschwindigkeit von 10 µl/min vorgegeben, so daß während eines Pulses ein Volumen von 50 µl der jeweiligen Infusionslösung infundiert wurde. Dieses enthielt Dosis entsprechend:

- A: Niedrigdosiertes rTSH: 0.01 µg rTSH
- B: Hochdosiertes rTSH: 0.3 µg rTSH
- C: Niedrigdosiertes rec-hTSH: 0.1 µg rec-hTSH
- D: Hochdosiertes rec-hTSH: 3 µg rec-hTSH

Das Intervall zwischen zwei Pulsen betrug 35 Minuten. Dieser 35-minütige Zyklus wurde ohne Unterbrechung über vier Tage wiederholt.

Innerhalb jeder Versuchsreihe wurde eine Kontrollgruppe mitgeführt, deren Tiere mit einem äquivalenten Volumen einer sterilen heparinhaltigen 0.9%igen Kochsalzlösung behandelt wurden. Unter Berücksichtigung der Daten der TRH-Experimente wurde auf eine Differenzierung der Kontrollgruppen verzichtet.

Aufgrund der noch begrenzten Verfügbarkeit rekombinanter humaner Thyreotropinpräparationen wurde die Zahl der Versuchstiere innerhalb der einzelnen Gruppen auf 4 begrenzt. Daher wurde auf eine statistische Auswertung der Daten verzichtet.

Blutproben wurden zwei Tage vor der Infusion täglich, am zweiten und vierten Infusionstag zwischen 9.30 und 9.50 Uhr genommen. Sechs Stunden nach Beendigung der Infusion, unmittelbar nach Gewinnung einer Blutprobe, wurde ein Bolus von 6 µg rTSH i.v. appliziert und drei Stunden danach wurde eine weitere Blutprobe genommen.

3.2.3.3 Tumorinduktionsmodell

Ziel des folgenden tierexperimentellen Modells war sequentielle Veränderungen bei der Entstehung von Schilddrüsenneoplasien *in-vivo* unter kontrollierter Jodzufuhr auf morphologischer, hormonaler und molekularer Ebene zu erfassen.

Es wurden neun Gruppen unter Variation des alimentären Jodgehaltes und der Bestrahlungsdosis gebildet:

1	Jod normal	keine Bestrahlung (Kontrollgruppe)	16 Tiere = Jn
2	Jod normal	Niedrigdosis (1 und 2 Gy-Bestrahlung)	16 Tiere = JnND
3	Jod normal	Hochdosis (4 und 6 Gy-Bestrahlung)	16 Tiere = JnHD
4	Jodmangel	keine Bestrahlung	16 Tiere = Jm
5	Jodmangel	Niedrigdosis (1 und 2 Gy-Bestrahlung)	16 Tiere = JmND
6	Jodmangel	Hochdosis (4 und 6 Gy-Bestrahlung)	16 Tiere = JmHD
7	Jodüberschuß	keine Bestrahlung	16 Tiere = Ju
8	Jodüberschuß	Niedrigdosis (1 und 2 Gy)	16 Tiere = JuND
9	Jodüberschuß	Hochdosis (4 und 6 Gy)	16 Tiere = JuHD

3.2.3.3.1 Alimentärer Jodgehalt

Unter Verwendung eines normierten Nagetierfutters (Altromin® Haltsstandarddiät für Ratten und Mäuse 1324, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage; Jodgehalt: 1.0 mg/kg), eines Diätfutters (Altromin® Sonderdiät für Ratten – Jodarme Diät - C 1042, Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage; Jodgehalt: 0.06 mg/kg) sowie unter Zusatz einer definierten Menge Kaliumjodid wurden drei Gruppen gebildet, welche folgende Jodkonzentrationen erhielten:

1	Jod normal (Jn)	7000 ng Jodid/100g KG/d
2	Jodmangel (Jm)	420 ng Jodid/100g KG/d
3	Jodüberschuß (Ju)	72000 ng Jodid/100g KG/d

3.2.3.3.2 Bestrahlung der Schilddrüse

Die Bestrahlung der Schilddrüsenregion erfolgte einmalig mit einem Röntgengerät Siemens Unidos® 10001/10051 unter folgenden Bedingungen: Kammer M 31002-0004, Korrektur für Energie $k_q = 0.98$, Korrektur für Luftdruck und Temperatur $k = 1.024$, Phantomtiefen = 1 cm sowie unter Einstellung der Parameter: Spannung $U = 125$ kV, Stromstärke $I = 20$ mA, Filterung 0,2 mm Cu, Tubus 6x8 cm², 40 cm Abstand, Lochblendendurchmesser $d = 15$ mm, Blende 4 mm Bleigummi. Die ermittelte Zeit-Dosis-Beziehung betrug $\text{Zeit } t = 1 \text{ min} / \text{Dosis } D_w = 0.6260 \text{ Gy}$. Die Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. R. Gerlach, Klinik für Strahlentherapie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. Dr. J. Dunst), durchgeführt.

3.2.3.3.3 Gewinnung der Blut- und Gewebeproben

Einmal wöchentlich wurde 1ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. In der 15., 35. und 55. Lebenswoche wurden von jeder bestrahlten Tiergruppen und jeder der jodbehandelten Gruppen jeweils zwei Tieren bzw. 4 der jeweiligen Kontrolltieren die Schilddrüsen entnommen und deren Gewichte bestimmt. Jeder Schilddrüsenlappen wurde halbiert und je zur Hälfte in 5%-igem gepuffertem Formalin bzw. in flüssigem Stickstoff konserviert. Die verbliebenen Tiere (je Gruppe jeweils 4 Ratten) wurden 12 Monate ohne Blutentnahmen nachbeobachtet (Gesamtversuchsdauer 2 Jahre).

3.2.3.3.4 Immunhistochemie

Das in Formalin fixierte Material wurde in Paraffin eingebettet, davon Serienschnitte (20 Schnitte je Schilddrüsenlappen) von 5 µm Dicke hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin und Elastica-van-Gieson gefärbt. Aus dem kryokonservierten Material wurden am Kryoschnitt ebenfalls Serienschnitte von 5 µm Dicke mit einer Standardfärbung angefertigt. Diese hatten im Vergleich zu den Paraffinschnitten eine schlechtere Qualität, so daß sie nur bedingt zur Auswertung herangezogen wurden. Die Einbettung erfolgte jeweils in Kanada-Balsam.

Zur Untersuchung der Proliferationsrate wurde der immunhistochemische Nachweis des Ki67-Antigens unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MIB-5 (dia 5055i®, dianova, Hamburg) geführt. MIB-5 weist das im Kern lokalisierte und mit der Zellproliferation assoziierte Antigen Ki67 nach, welches in allen aktiven Phasen (G1, S, G2, M) des Zellzyklus exprimiert wird (*Schlüter et al., 1993*). Je Schilddrüsenlappen wurden fünf ungefärbte Paraffinschnitte (5µm) mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe dehydratisiert. Es folgte eine 3x5-minütige Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer, waschen in PBS-Puffer (pH=7,4) und Blockierung mit Wasserstoffperoxid und Methanol. Zur Detektion wurde ein Avidin-Biotin-System (dianova, Uni-Tect® A.B.C. System XHC 01; Blockserum Schwein; Sekundärantikörper Maus, Ratte, Ziege; Substrat DAB) verwendet.

An den histologischen Präparaten wurden Follikelanzahl je mm², Kolloiddurchmesser, Follikeldurchmesser, Epithelhöhe sowie Neoplasierate lichtmikroskopisch bei 30- bzw. 80-facher Vergrößerung untersucht. Die Bestimmung der Follikelzahl erfolgte bei 30-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Aufsatzokulars mit eingearbeiteter Zählkammer von 1 mm² Größe. Es wurden in je 20 Schnitten ein zentrales, mittleres und peripheres Sichtfeld ausgezählt. Am Sichtfeldrand gelegene und angeschnittene Follikel wurden bei über 50%-igem Anteil mitgezählt. Die Kolloid- und Follikeldurchmesser wurden bei 80-facher Vergrößerung mit einem aufgesetzten Okularraster (minimaler Meßbereich 20 µm) bestimmt. Je Schnitt wurden 10 repräsentative Follikel vermessen (200 je Schilddrüsenlappen). Zur Beurteilung der Fibrosierung wurde die Follikelfläche mit der Follikelanzahl je mm² multipliziert. Dieser Wert repräsentiert die von Follikeln prozentual bedeckte Fläche je mm², der Rest ist Bindegewebe. Alle Schnitte wurden in voller Ausdehnung auf Neoplasien untersucht und klassifiziert:

- benigne Neoplasie und Metaplasie: Follikuläres Adenom, Plattenepithelmetaplasie, Dermoidzyste
- maligne Neoplasie: Follikuläres Karzinom, Papilläres Karzinom
- andere Karzinome: Plattenepithelkarzinom, Adenokarzinom

Diese Auswertung wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. H.-J. Holzhausen, Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (Direktor: Prof. F. W. Rath) durchgeführt.

3.2.4 Hormonanalytik

TSH wurde mittels eines Radioimmunoassay-Kit, der vom National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), Bethesda, Maryland, USA freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurde, gemessen. Die untere Nachweisgrenze war 360 pg/ml. Die Intra-Assay-Varianz betrug 7.1% - 9.8% (n=32), die Inter-Assay-Varianz zwischen 11.7-12.2%.

T3 und T4 wurden mittels kommerziell erhältlichen Enzymimmunoassays (Boehringer Mannheim), welche für Ratten-T3 und -T4 validiert wurden, gemessen. Die Koeffizienten der Intra- und Inter-Assay-Varianz wurden, in Abhängigkeit von der Konzentrationen, mit 3.7-7.1% bzw. 11.7-12.2% ermittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Zellbiologische Untersuchungen

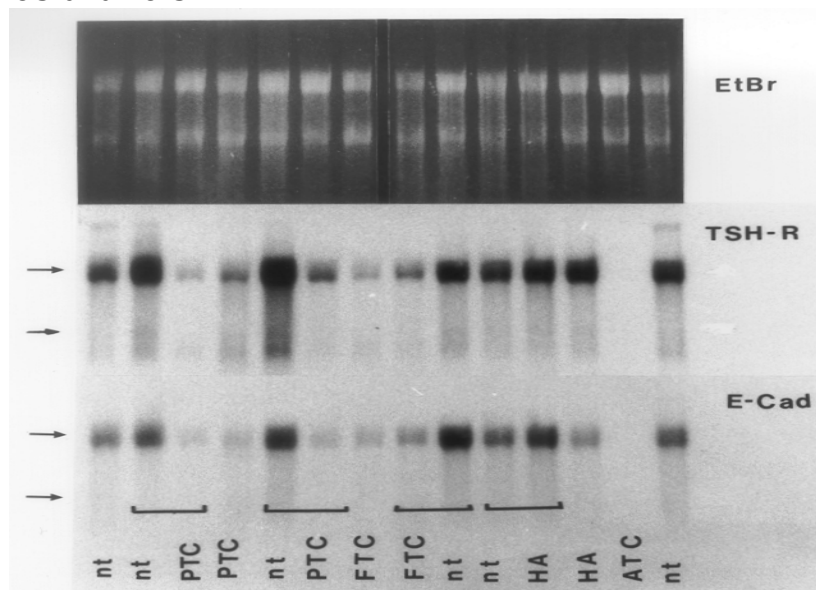
4.1.1 E-Cadherin und TSH-Rezeptor¹

4.1.1.1 Humane Gewebe und Primärkulturen

4.1.1.1.1 Humane Gewebe

In normalen Schilddrüsengeweben (n=12) exprimierten sowohl E-Cadherin-Transkript als auch -Protein einheitlich. Die mRNA-Expression von E-Cadherin und TSH-Rezeptor war nicht in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (n=11) nachweisbar, während sie in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (n=52) unterschiedlich exprimiert wurde (Abb. 3). Die Immunreaktivität von E-Cadherin verlief parallel zu der Expression von mRNA.

Abb. 3: mRNA-Expression von TSH-Rezeptor (TSH-R; 4.4 und 4.6 kB) und E-Cadherin (E-Cad; 4.5 kB) in Schilddrüsengeweben. nt: Normalgewebe, PTC: papilläres, FTC: follikuläres, ATC: anaplastisches undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom. HA: autonomes Adenom. In Klammer: Gewebe vom selben Patienten. EtBr: Ethidiumbromid als Normalisierungsmarker.
→: 18S und 28 S

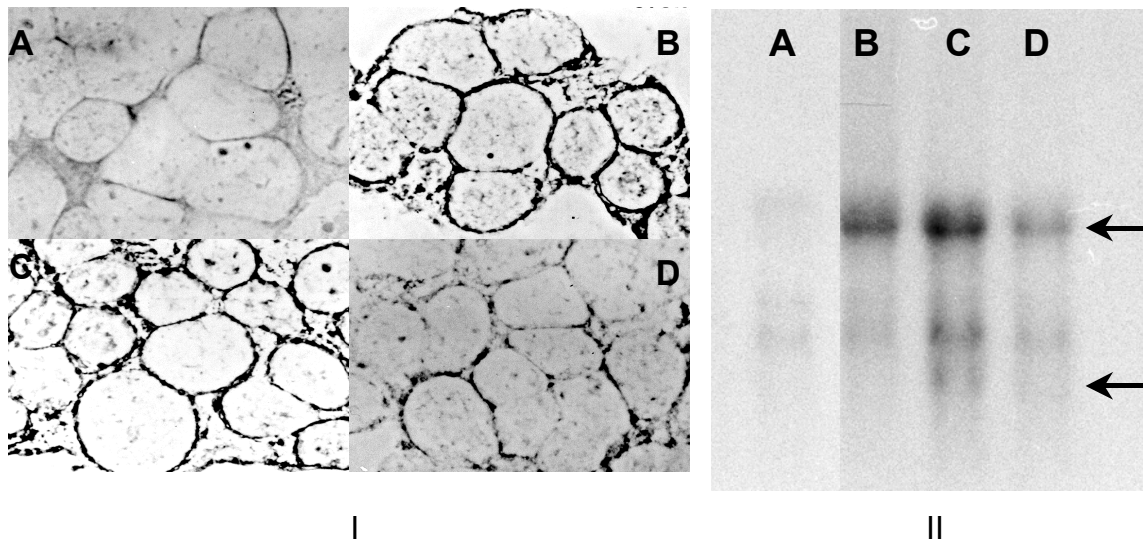


¹ zum Teil publiziert in Mol Cell Endocrinol 82 (1991): R7-R12; Exp Clin Endocrinol 100 (1992):51-56; Cancer Res 53 (1993): 4987-4993; Exp Clin Endocrinol 101 (1993): 78-82; JCEM 80 (1995): 2168-2172; Endocrinology 136 (1995): 3113-3119; Exp Clin Endocrinol Diabetes 104,Suppl 4, (1996): 24-28.

4.1.1.1.2 Primärkulturen

In 2 von 4 Primärkulturen konnte E-Cadherin-Protein weder vor noch nach Stimulation nachgewiesen werden. Northern-Blot-Analysen zeigten, daß mRNA von E-Cadherin ebenfalls nicht nachweisbar war. In zwei anderen Primärkulturen war E-Cadherin, sowohl Protein als auch Transkript, schwach detektierbar. Eine Behandlung mit TSH oder Forskolin für 24 Stunden induzierte eine deutlich erhöhte Immunreaktivität und stärkere mRNA-Expression von E-Cadherin, während eine Behandlung mit EGF für 24 Stunden nur eine leicht erhöhte Immunreaktivität und mRNA zeigte (Abb. 4).

Abb. 4: Immunreaktivität (I) und mRNA (II) von E-Cadherin in humanen Primärkulturen nach Behandlung mit Forskolin (B), TSH (C) und EGF(D) im Vergleich zur Kontrolle (A). (x60). →: 18S und 28 S



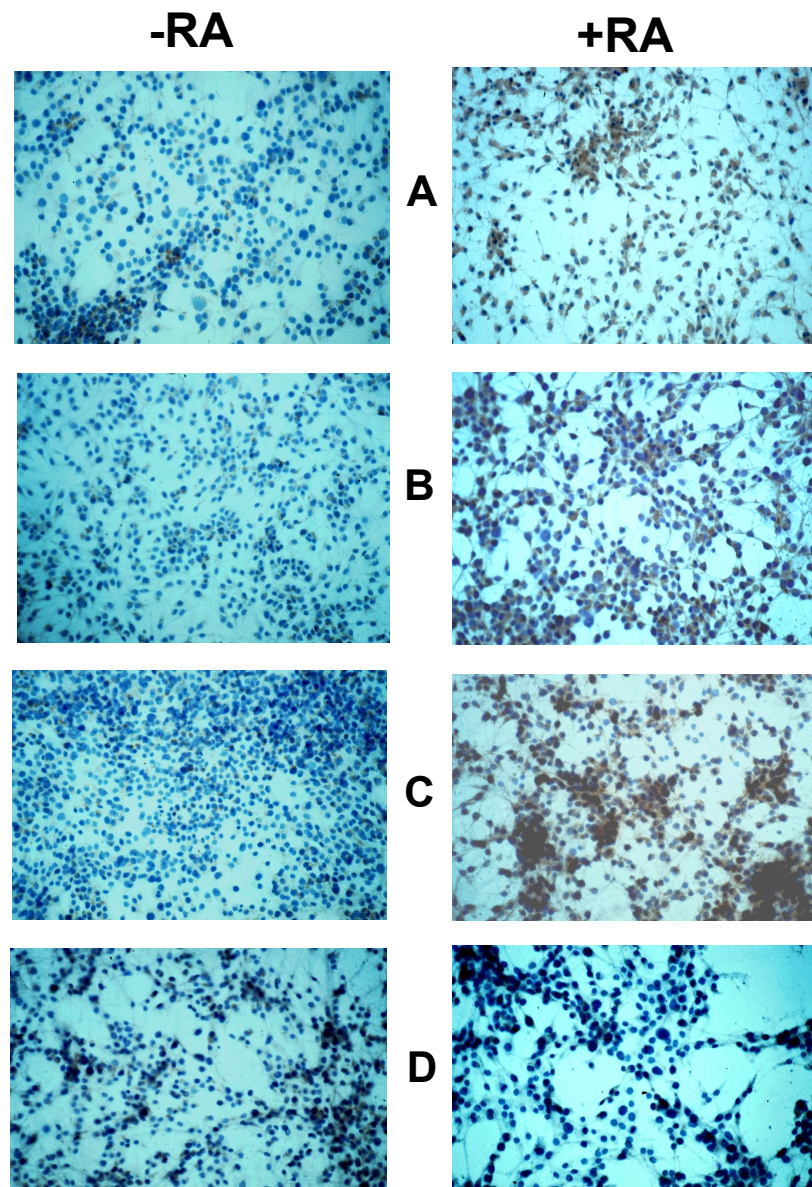
Um die endogene Aktivität von Peroxidase zu verhindern und unspezifische Immunreaktionen zu minimieren, wurden die Kryoschnitte bzw. Coverslips in Methanol/ H_2O_2 (4 Teile Methanol, 1 Teil 3%iges H_2O_2) für 20 min inkubiert, mit PBS gewaschen und mit Schweineserum (1:5 verdünnt) für weitere 20 min inkubiert. Mit dem 1%igen BSA/PBS verdünnten Antikörper wurden die Präparate im Kühlschrank bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach mehreren zwischengeschalteten Waschschrritten wurden die Präparate mit dem Brückenantikörper für 30 min bei Raumtemperatur, dann mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit Hämalaun (1:1 verdünnt) gegengefärbt, gewaschen und mit Aquatex eingebettet.

4.1.1.2 Zelllinie FTC-133

Aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit des Gewebes war eine Wiederholung der Experimente mit Zellen derselben Herkunft und demselben Tumorstatus nicht mög-

lich, daher wurde für weitere Untersuchungen der Regulation die etablierte Zelllinie FTC-133 verwendet.

Abb. 5: Immunreaktivität von E-Cadherin in der Zelllinie FTC-133. . **A:** Kontrolle, **B:** Forskolin 10^{-5} M, **C:** rec h TSH 0.1 mU/ml, **D:** EGF 5ng/ml. **+RA:** nach einer 72h-igen Vorbehandlung mit $1\mu\text{M}$ Retinsäure. (x20)



Für die Immunhistochemie wurden die Zellen direkt auf Thermanox-Plättchen (Coverslips) kultiviert und, wie oben beschrieben, stimuliert. Nach dem Absaugen von Kulturmedium wurden die Coverslips mit PBS gespült und unter dem Laminarflow getrocknet. Anschließend wurden sie für 10 min im kalten Methanol bei 4°C fixiert, nochmals mit PBS gespült und mit Einfriermedium (42.8 g Saccharose, 0.33 g MgCl_2 , 250 ml Glycerol, 250 ml PBS) überschichtet. Die Coverslips können bei -20°C bis zu einem Jahr gelagert werden.

In der Kontrolle exprimierten etwa 5% der konfluenten FTC-133-Zellen E-Cadherin. Eine Behandlung mit TSH, Forskolin, Insulin, EGF oder PMA führte zu keiner signifikanten Veränderung der Proteinexpression (Abb. 5).

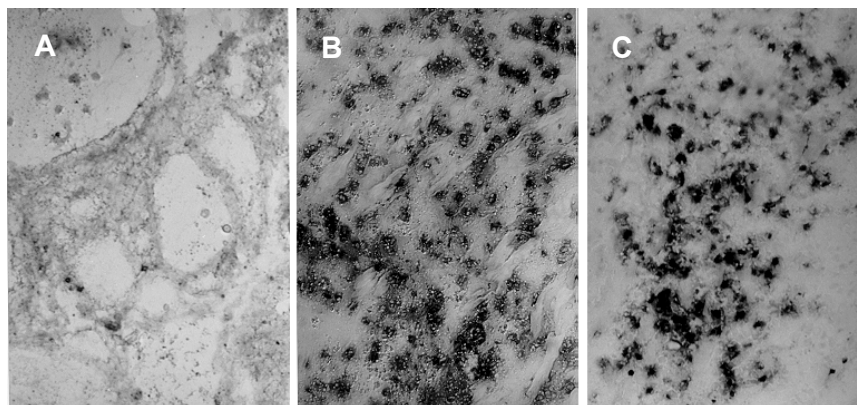
Die Vorbehandlung mit Retinsäure (RA) führte zu einem vergrößerten Zellkern und Zytoplasma, zur Abnahme der Zellzahl um etwa 30%, induzierte aber gleichzeitig eine Erhöhung der E-Cadherin-immunpositiven Zellen von 5% auf etwa 25% im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellen. Die Immunreaktivität von E-Cadherin war stärker nachweisbar, wenn die mit RA-vorbehandelten Zellen mit TSH oder Forskolin behandelt wurden, während EGF, Insulin oder PMA keine zusätzliche Wirkung zeigten (Abb. 5).

4.1.2 CD97²

4.1.2.1 Humane Gewebe

In normalen und neoplastischen Schilddrüsengeweben wurde folgender Zusammenhang überprüft: normale Gewebe (n= 11) sind CD97-Protein negativ, folliculäre und papilläre (n= 10) Schilddrüsenkarzinome besitzen CD97 schwach oder nicht, während anaplastische Karzinome (11/12) das Antigen stark exprimieren. Unsere Ergebnisse zeigten eine direkte Korrelation der Expression von CD97 mit dem Grad der Dedifferenzierung der nicht-hämatopoetischen Zellen (Abb.6).

Abb. 6: Immunreaktivität von CD 97 in Schilddrüsengeweben des selben Patienten. **A:** Normalgewebe, kaum nachweisbares CD97-Protein, **B:** Papilläres Schilddrüsenkarzinom mit stark exprimiertem CD 97, **C:** Lymphknotenmetastase ebenfalls mit stark exprimiertem CD97-Protein. (x40). Siehe dazu Legende Abb. 4

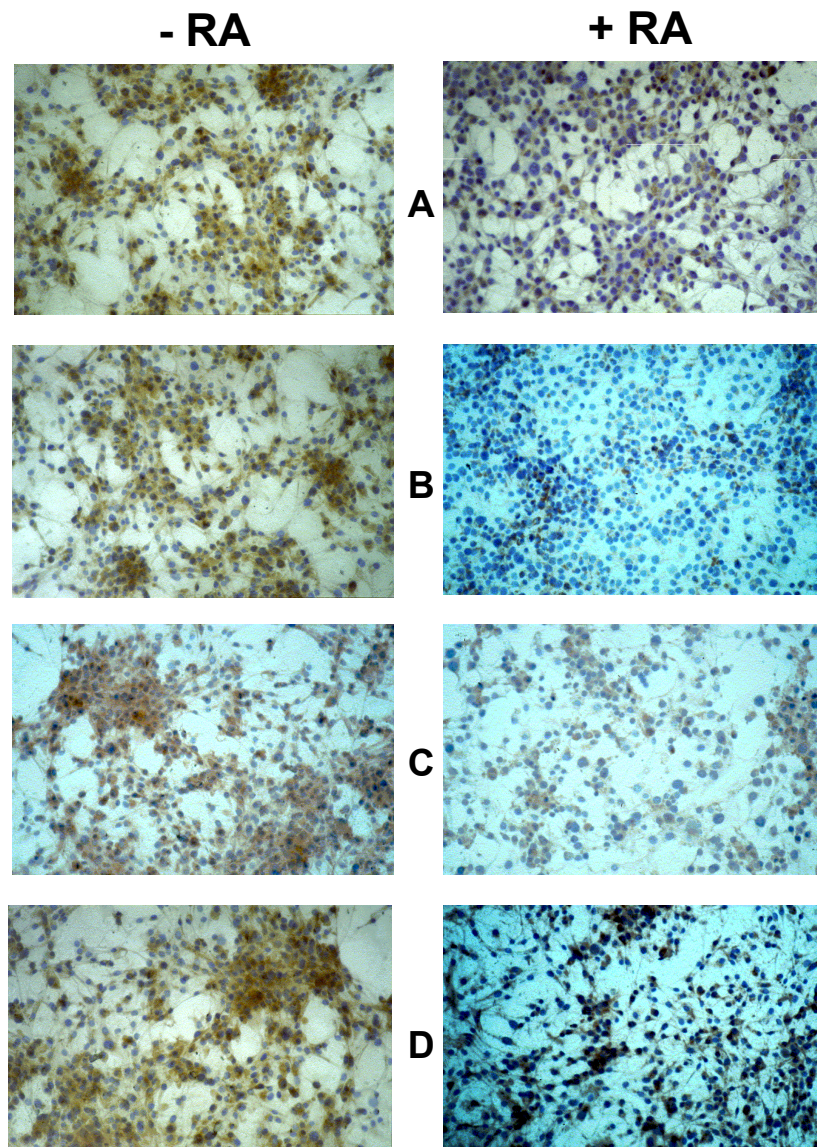


² zum Teil publiziert in Cancer Res 57 (1997): 1798-1806; J Clin Endocrinol Metab 84 (1999): 2784-2787.

4.1.2.2 Zelllinie FTC-133

In der Zelllinie FTC-133 wurde CD97 in 50% der Zellen unter Basalbedingungen exprimiert. Eine Behandlung mit TSH, Forskolin oder Insulin für 24 Stunden zeigte keinen Unterschied in der Immunreaktivität von CD97. EGF-Behandlung führte zu einer Erhöhung der CD97-positiven Zellen um 40% im Vergleich zur Kontrolle (von 50 auf 90%; $p < 0.001$), während nach PMA eine Verminderung um 20% beobachtet wurde (von 50 auf 30%; $p < 0.05$) (Abb. 7).

Abb. 7: Immunreaktivität von CD97 in der Zelllinie FTC-133. **A:** Kontrolle, **B:** PMA-, **C:** TSH- und **D:** EGF-Behandlung für 24 Stunden. **+RA:** nach einer 72h-igen Vorbehandlung mit $1\mu\text{mol/l}$ RA für 72 Stunden. Siehe dazu Legende Abb. 5. (x20)



Die Vorbehandlung mit RA für 72 Stunden reduzierte die Zellzahl um 18% nach 24h, 25% nach 48h ($p < 0.05$) und 33% nach 72h ($p < 0.001$) im Vergleich zur Kontrolle. Die Anzahl von CD97-positiven Zellen war nach 24-stündiger RA-Vorbehandlung unverändert, wurde aber nach 48 Stunden von 50% auf 42% und nach 72 Stunden von 50% auf 30% ($p < 0.01$) reduziert. TSH, Forskolin, PMA und Insulin zeigten keine zusätzliche Wirkung auf die CD97-Expression, während EGF eine nicht-signifikante Erhöhung der CD97-positiven Zellen von 30% auf 40% nach einer Vorbehandlung mit RA für 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle induzierte (Abb. 7).

4.1.3 Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren in der Schilddrüse

4.1.3.1 Humane Gewebe

Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren werden von nicht-neoplastisch verändertem Schilddrüsengewebe in weitaus geringerem Maße exprimiert als in tumorösen Organen. 93% der als Kontrollgewebe verwendeten Strumen ($n=15$) zeigten keine Expression von MMP-2, deren Inhibitor TIMP-2 wurde jedoch in 40% der Fälle exprimiert (Abb.5). 73% bzw. 80% der Strumen waren negativ für MMP-9 und dessen Inhibitor TIMP-1 (Abb. 8 und 9, Tab. 4).

Die höchsten Expressionen zeigten schlecht differenzierte, insuläre Karzinome ($n=7$) und undifferenzierte Karzinome ($n=16$). Schlecht differenzierte, insuläre Karzinome exprimieren MMP-9, TIMP-1 und TIMP-2 in allen Fällen sowie MMP-2 in 86% der Fälle. Undifferenzierte Karzinome zeigen für MMP-9 87%, TIMP-1 94%, MMP-2 56% und TIMP-2 100% Positivität (Abb. 8 und 9, Tab. 4).

Differenzierte Schilddrüsenkarzinome, welche dem Follikelepithel entstammen (FTC, $n=10$ und PTC, $n=17$) exprimieren MMPs und TIMPs ebenfalls stark und nur marginal niedriger als die undifferenzierten Karzinome, wobei PTCs die stärkste Expression zeigen (Tab. 5).

Tab. 4: Gesamtübersicht Gewebetyp, Anzahl der Gewebe und positive Immunreaktivität. FTC: follikuläres, PTC: papilläres, MTC: medulläres, UTC: undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom. Rez: Rezidiv

(n)	MMP 9		TIMP 1		MMP 2		TIMP 2	
	-	+	-	+	-	+	-	+
Struma (15)	11	4	12	3	14	1	9	6
FTC (7)	1	6	1	6	2	5	1	6
FTC Rez. (3)	2	1	1	2	2	1	0	3
PTC (8)	0	8	0	8	2	6	2	6
PTC Rez. (9)	0	9	0	9	1	8	0	9
MTC (10)	3	7	0	10	3	7	2	8
MTC Rez. (13)	1	12	1	12	9	4	4	9
Insuläres Ca (7)	0	7	0	7	1	6	0	7
UTC (16)	2	14	1	15	7	9	0	16

Tab. 5: Anteil der differenzierten Primärkarzinome mit positiver Immunreaktivität von MMP2 und -9, sowie TIMP-1 und -2. PTC: Papilläres (n=8) und FTC: Follikuläres Schilddrüsenkarzinom (n=7)

	PTC (n=8)	FTC (n=7)
MMP-9	100%	77%
TIMP-1	100%	83%
MMP-2	83%	67%
TIMP-2	89%	92%

Die medullären Karzinome zeigten ein indifferentes Expressionsmuster und unterschieden sich damit von den übrigen epithelialen Neoplasien der Schilddrüse: MMP-9 73% (FTC: 70%, PTC: 100%; UTC:87.5%; InsCa: 100%), TIMP-1 85% (FTC: 80%, PTC: 100%, UTC: 94%, InsCa: 100%), MMP-2 42% (FTC: 60%, PTC: 82%, UTC: 56%, InsCa: 86%), TIMP-2 65% (FTC: 90%, PTC: 88%, UTC: 100%, InsCa: 100%) (Abb.8 und 9, Tab. 5).

Abb. 8: Prozentualer Anteil der Gewebe mit positiver Immunreaktivität von MMP-2 und TIMP-2. FTC: Follikuläres, PTC: Papilläres, MTC: Medulläres und UTC: undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom. insCa: insuläres Karzinom

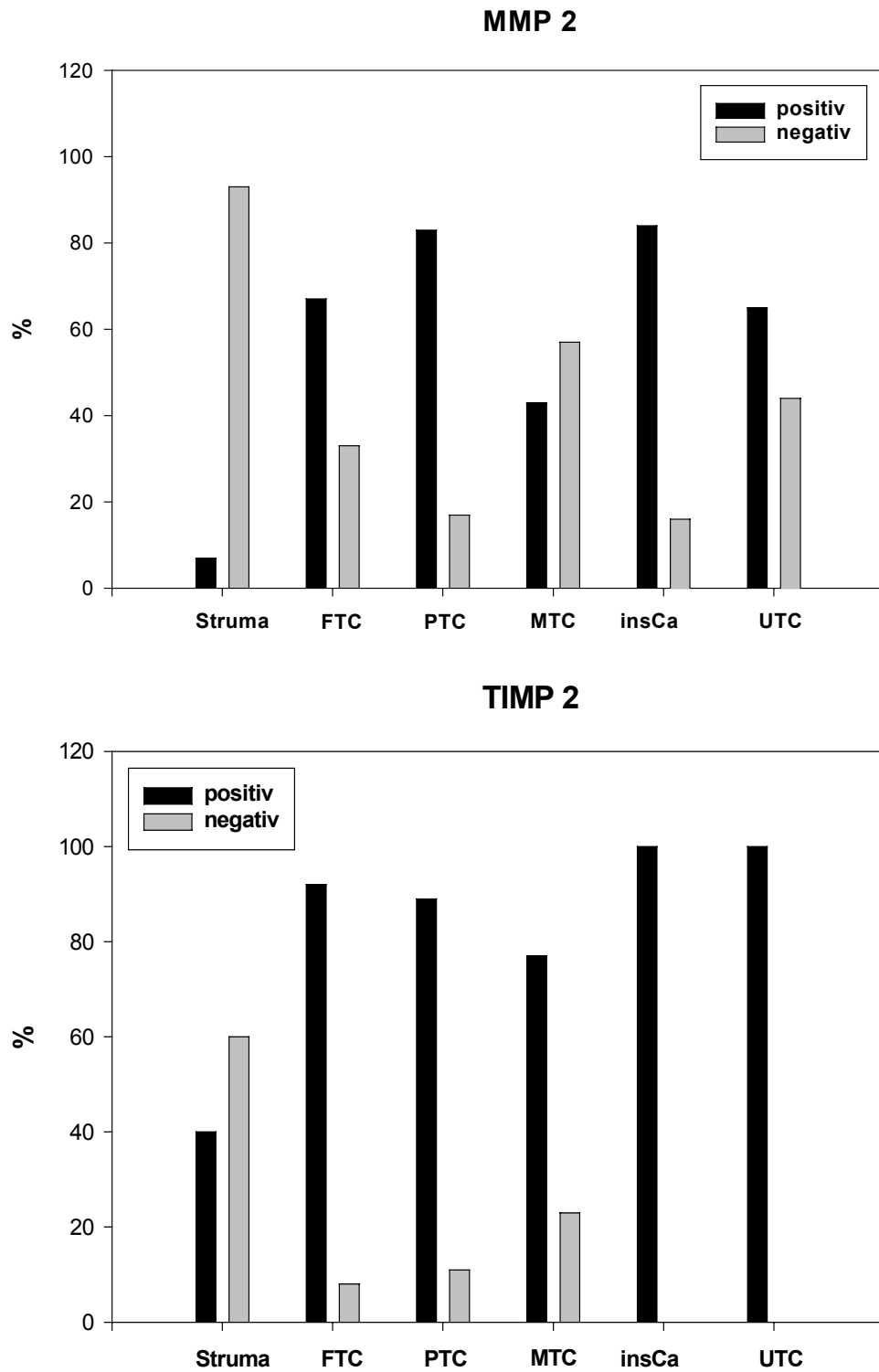
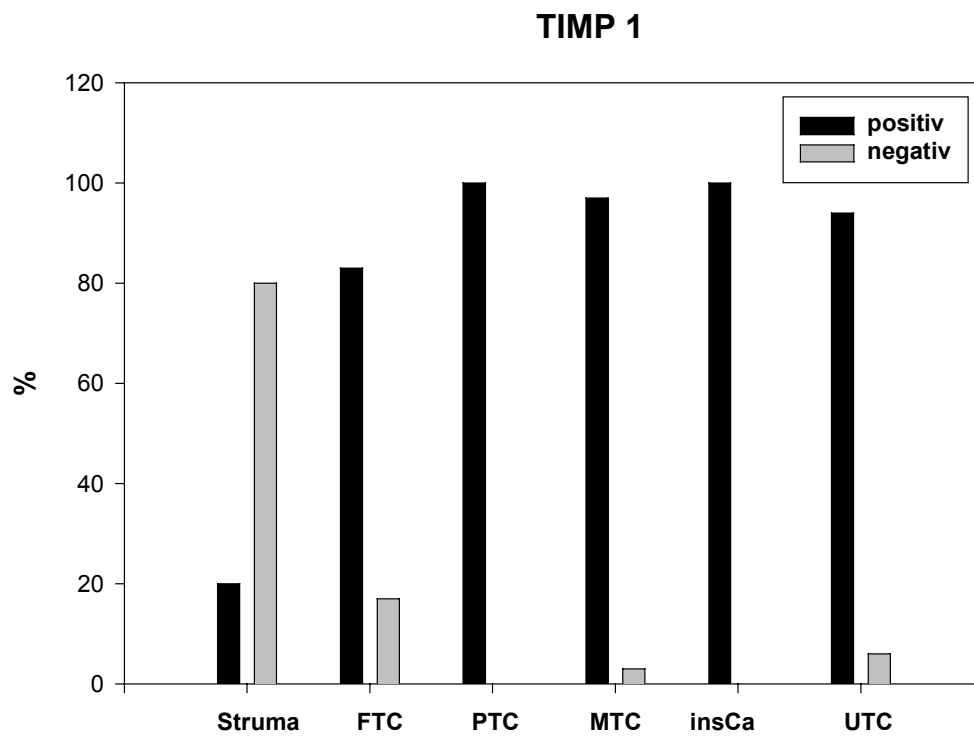
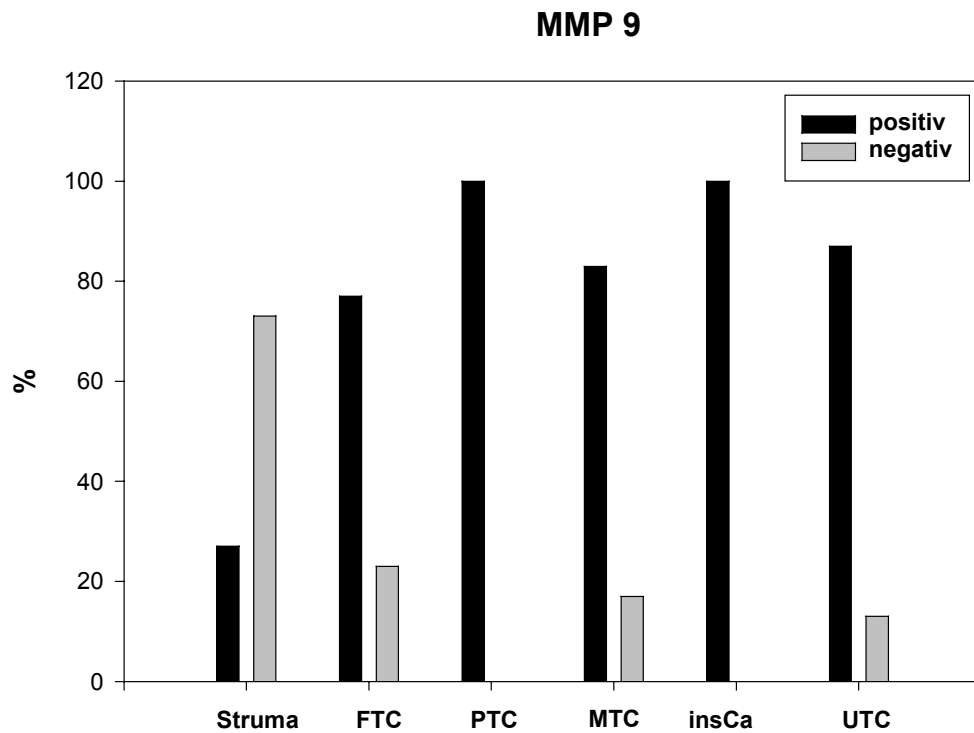


Abb. 9: Prozentualer Anteil der Gewebe mit positiver Immunreaktivität von MMP-9 und TIMP-1. FTC: Follikuläres, PTC: Papilläres, MTC: Medulläres und UTC: Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom. insCa: insuläres Karzinom



4.1.3.2 Korrelation der MMP- und TIMP-Expressionen zum pTNM-Stadium

Es wurden die Gewebe nach Tumorkategorie (T), Lymphknotenstatus (N) und Metastasierung (M) klassifiziert und immunhistochemisch untersucht, um eine mögliche Korrelation der MMP- und TIMP-Expressionen zum pTNM-Stadium darstellen zu können. Die Unterteilung der Tumorstadien erfolgte nach der Union Internationale Contre le Cancer (UICC)-Klassifikation:

pT 1:	Tumorgröße ≤ 1cm
pT 2:	Tumorgröße 1cm – 4cm
pT 3:	Tumorgröße > 4cm
pT 4:	Tumor jeder Größe mit Infiltration des parathyreoidalen Gewebes
pN 0:	kein Lymphknotenbefall
pN 1:	Lymphknotenmetastasen
pM 0:	keine Fernmetastasen
pM 1:	positiver Metastasennachweis

Die Ergebnisse zeigen, daß die Expression der Matrixmetalloproteinasen mit dem pTNM-Status der Schilddrüsenkarzinome stark assoziiert war, eine signifikante Korrelation ließ sich jedoch nicht nachweisen (Tab. 6 –9).

Tab. 6: Expression der Matrixmetalloproteinasen sowie ihrer Inhibitoren in follikulären Schilddrüsenkarzinomen und pTNM-Kategorien (Angaben sind die Anzahl der immunpositiven Fälle von 7 Geweben)

	MMP-9	TIMP-1	MMP-2	TIMP-2
pT 2	0/7	7/7	7/7	7/7
pT 3	7/7	7/7	7/7	7/7
pT 4	4/7	4/7	2/7	6/7
pN 0	5/7	5/7	3/7	5/7
pN 1	3/7	3/7	3/7	7/7
pM 0	7/7	7/7	5/7	7/7
pM 1	3/7	3/7	3/7	7/7

Tab. 7: Expression der Matrixmetalloproteinasen sowie ihrer Inhibitoren in papillären Schilddrüsenkarzinomen und pTNM-Kategorien (Angaben sind die Anzahl der immunpositiven Fälle von 8 Geweben)

	MMP-9	TIMP-1	MMP-2	TIMP-2
pT 2	8/8	8/8	6/8	6/8
pT 3	-	-	-	-
pT 4	8/8	8/8	7/8	7/8
pN 0	8/8	8/8	7/8	6/8
pN 1	8/8	8/8	7/8	6/8
pM 0	8/8	8/8	8/8	8/8
pM 1	8/8	8/8	8/8	8/8

Tab. 8: Expression der Matrixmetalloproteinasen sowie ihrer Inhibitoren in schlecht differenzierten Schilddrüsenkarzinomen vom insulären Typ und pTNM-Kategorien (Angaben sind die Anzahl der immunpositiven Fälle von 7 Geweben)

	MMP-9	TIMP-1	MMP-2	TIMP-2
pT 2	-	-	-	-
pT 3	7/7	7/7	5/7	7/7
pT 4	7/7	7/7	7/7	7/7
pN 0	7/7	7/7	5/7	7/7
pN 1	7/7	7/7	7/7	7/7
pM 0	7/7	7/7	7/7	7/7
pM 1	7/7	7/7	5/7	7/7

Tab. 9: Expression der Matrixmetalloproteinasen sowie ihrer Inhibitoren in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen und pTNM-Kategorien (Angaben sind die Anzahl der immunpositiven Fälle von 16 Geweben)

	MMP-9	TIMP-1	MMP-2	TIMP-2
pT 2	-	-	-	-
pT 3	11/16	16/16	5/16	16/16
pT 4	15/16	15/16	10/16	16/16
pN 0	-	-	-	-
pN 1	14/16	15/16	9/16	16/16
pM 0	0/16	16/16	0/16	16/16
pM 1	14/16	14/16	10/16	16/16

4.1.3.3 Zelllinie FTC-133

Nach einer 72-stündigen Vorbehandlung mit bzw. ohne 1µM *all-trans*-Retinsäure (RA) wurden die FTC-133-Zellen 24, 48 und 72 Stunden mit Insulin, PMA, Forskolin, TSH oder EGF stimuliert. Mittels RT-PCR wurden die Transkripte von MT1-MMP, MMP-1, MMP-2 und MMP-9 sowie TIMP-1, -2 und -3 untersucht.

Wie in Tab. 10 und Abb. 10 dargestellt, wurden die Transkripte von MT1-MMP, MMP-2 und TIMP-1 und -2 unabhängig von der Vorbehandlung und von der 24-stündigen Stimulation unverändert exprimiert. Unter Basalbedingungen war mRNA von MMP-1, MMP-9 und TIMP-3 in der FTC-133 nicht detektierbar. Eine Behandlung mit PMA oder EGF für 24 Stunden induzierte eine Expression von MMP-9-mRNA, während MMP-1 und TIMP-3 nur unter PMA-Behandlung detektierbar war.

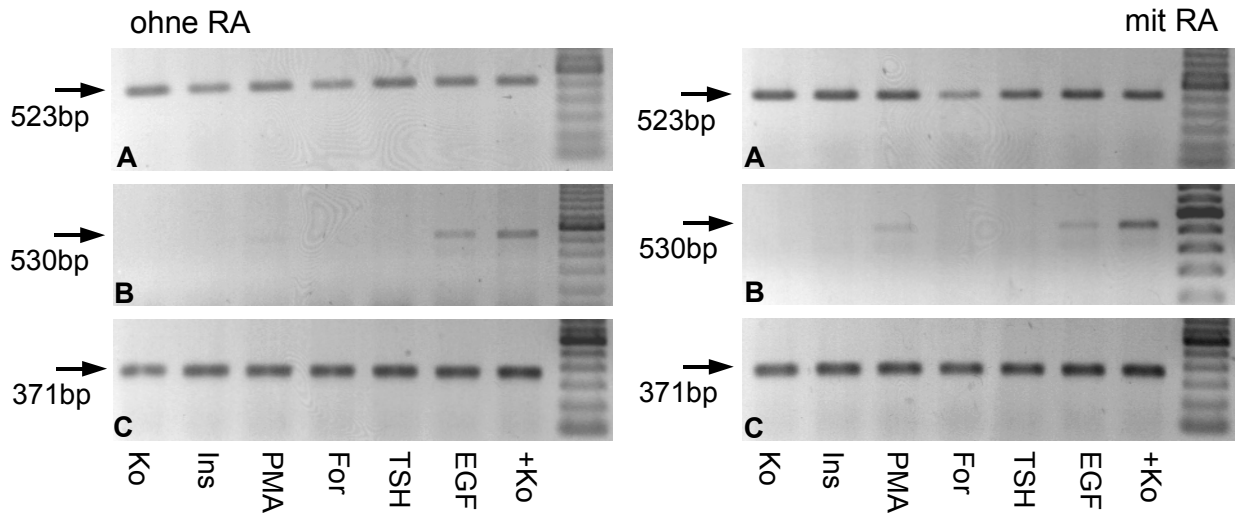
Eine Vorbehandlung mit RA für 72 Stunden führte zu einer Re-Expression von MMP-9 unter basalen Kulturbedingungen. Die Expression wurde unter zusätzlicher Behandlung von PMA oder EGF verstärkt (Tab.11, Abb. 11).

Tab. 10: mRNA-Expression der FTC-133-Zellen unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen

Stimulation	MT1-MMP	MMP-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
Kontrolle	++	-	++	-	++	++	-
Insulin	++	-	++	-	++	++	-
PMA	++	+	++	+	++	++	+
Forskolin	++	-	++	-	++	++	-
TSH	++	-	++	-	++	++	-
EGF	++	-	++	+	++	++	-
RA	++	-	++	+	++	++	++
Insulin+RA	++	-	++	-	++	++	++
PMA+RA	++	+	++	++	++	++	++
Forskolin+RA	++	-	++	-	++	++	++
TSH+RA	++	-	++	-	++	++	++
EGF+RA	++	-	++	++	++	++	++

Die Zellen wurden zunächst mit bzw. ohne Retinsäure (RA, 1µM) für 72 Stunden vorbehandelt. Nach 24 Stunden in Leermedium wurden sie für 24 h mit Insulin (5µg/ml), PMA (10 ng/ml), Forskolin (10⁻⁵ M), rec-hTSH (100 µU/ml) oder EGF (5ng/ml) stimuliert. -: keine, +: schwache aber erkennbare, ++: moderate Expression im Vergleich zur Kontrolle.

Abb. 10: Expression von MMP-2 (A), MMP-9 (B) und TIMP-2 (C) unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen



Die Zellen wurden zunächst mit bzw. ohne Retinsäure (RA, 1 μ M) für 72 Stunden vorbehandelt. Nach 24 Stunden in Leermedium wurden sie für 24 h mit Insulin (5 μ g/ml), PMA (10 ng/ml), Forskolin (10⁻⁵ M), rec-hTSH (100 μ U/ml) oder EGF (5ng/ml) stimuliert. Ko: Kontrolle; +Ko: positive Kontrolle.

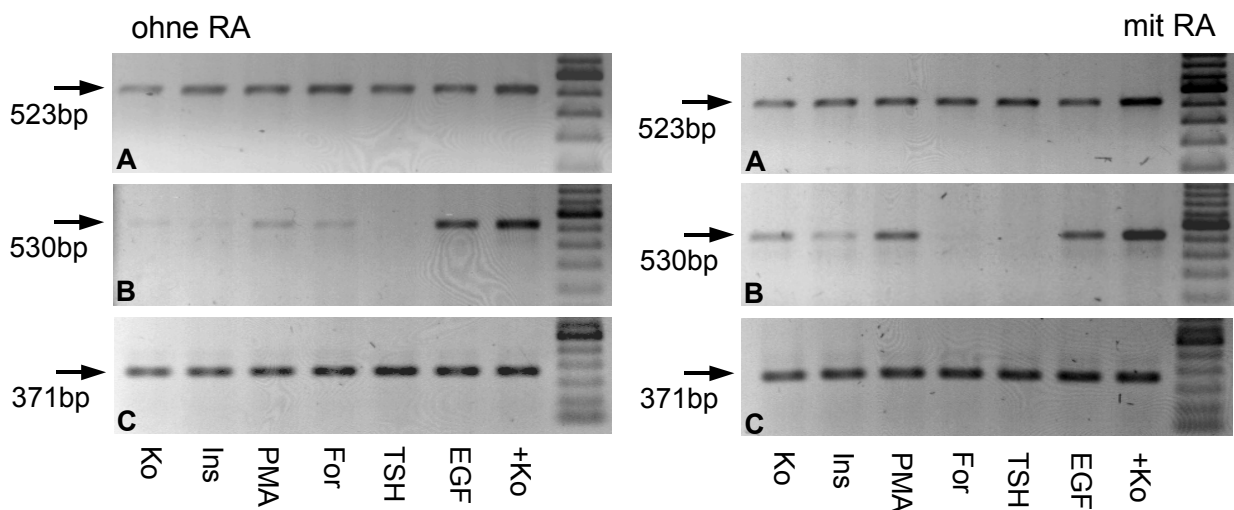
Tab. 11: mRNA-Expression der FTC-133-Zellen unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen

Stimulation	MT1-MMP	MMP-1	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
Kontrolle	++	-	++	-	++	++	++
Insulin	++	-	++	-	++	++	++
PMA	++	++	++	+	++	++	++
Forskolin	++	-	++	-	++	++	++
TSH	++	-	++	-	++	++	++
EGF	++	-	++	+	++	++	++
RA	++	-	++	++	++	++	++
Insulin+RA	++	-	++	+	++	++	++
PMA+RA	++	++	++	+++	++	++	++
Forskolin+RA	++	-	++	-	++	++	++
TSH+RA	++	-	++	-	++	++	++
EGF+RA	++	-	++	+++	++	++	++

Die Zellen wurden zunächst mit bzw. ohne Retinsäure (RA, 1 μ M) für 72 Stunden vorbehandelt. Nach 24 Stunden in Leermedium wurden sie für 72 Stunden mit Insulin (5 μ g/ml), PMA (10 ng/ml), Forskolin (10⁻⁵ M), rec-hTSH (100 μ U/ml) oder EGF (5ng/ml) stimuliert. -: keine, +: schwache aber erkennbare, ++: moderate, +++: starke Expression im Vergleich zur Kontrolle.

Nach 48 stündiger Stimulation zeigten die Expressionslevel von MMPs und TIMPs keinen Unterschied im Vergleich zu denen nach 24 Stunden. Mit Ausnahme einer erhöhten MMP-1-Expression nach PMA führte eine Stimulation für 72 Stunden zu keinem Unterschied im Expressionsniveau von MMPs und TIMPs im Vergleich zu dem nach 24 Stunden ohne Vorbehandlung mit RA. Eine Vorbehandlung mit 1µM RA für 72 Stunden induzierte ein höheres Expressionsniveau von MMP-9-mRNA als ohne RA-Vorbehandlung. Die Erhöhung ist noch deutlicher nach einer weiteren 72-stündigen Stimulation mit PMA oder EGF. Insulin induzierte die Expression von MMP-9 in den für 72 Stunden mit RA vorbehandelten Zellen.

Abb. 11: Expression von MMP-2 (A), MMP-9 (B) und TIMP-2 (C) unter unterschiedlichen Stimulationsbedingungen



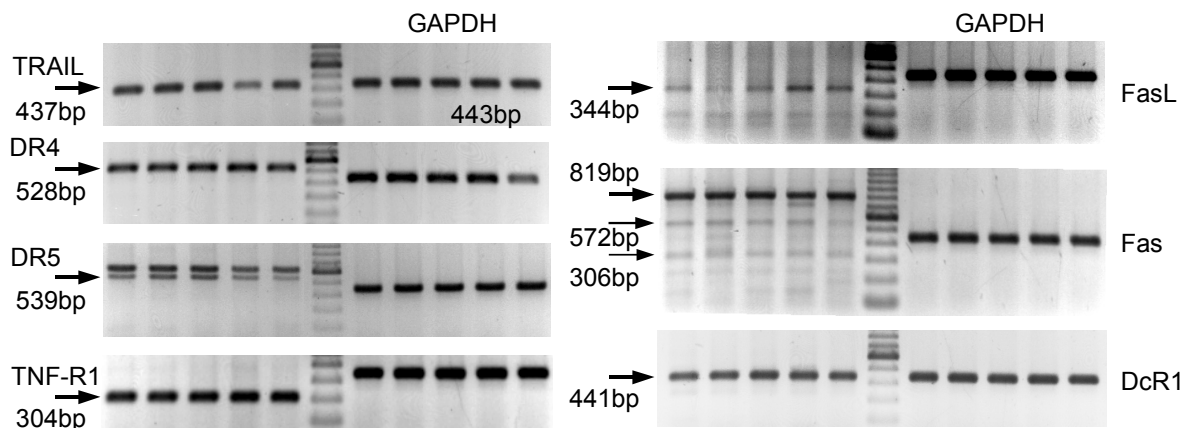
Die Zellen wurden zunächst mit bzw. ohne Retinsäure (RA, 1µM) für 72 Stunden vorbehandelt. Nach 24 Stunden in Leermedium wurden sie für 72 h mit Insulin (5µg/ml), PMA (10 ng/ml), Forskolin (10^{-5} M), rec-hTSH (100 µU/ml) oder EGF (5ng/ml) stimuliert. Ko: Kontrolle; +Ko: positive Kontrolle.

4.1.4 Expression und Regulation von Apoptose-induzierten Genen in der Schilddrüse³

4.1.4.1 Humane Gewebe

Die „Death-Domain“-Rezeptoren DR4 und TNF-R1 wurden in allen Geweben exprimiert, DR5 in 60% bzw. 70% der FTC bzw. PTC, 100% in benignen Strumen und 100% der UTC nachgewiesen. DcR1 wurde in allen Geweben unabhängig davon, ob es sich um benigne oder maligne Gewebeveränderungen handelte, exprimiert. Fas-Transkripte wurden in allen benignen Strumen, 9 von 10 FTC, 8 von 10 PTC und 8 von 10 UTC nachgewiesen. Eine deutliche Expression von zwei Fas-Isoformen mit jeweils 572 bp und 306 bp wurde in allen benignen Strumen, in 90% der FTC, 50% der PTC und etwa 20% der UTC exprimiert. Das Transkript des Fas-Liganden wurde in zwei benignen Strumen und in allen UTC nachgewiesen (Abb. 12-15).

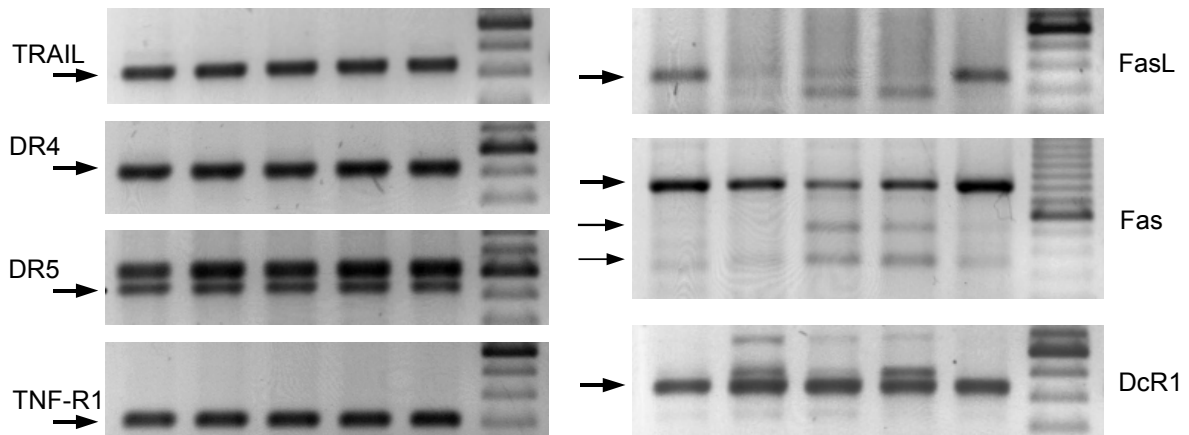
Abb. 12: mRNA-Expression von DR4, DR5, TNF-R1, Fas, TRAIL, FasL und Köderrezeptor DcR1 sowie GAPDH in benignen Schilddrüsengeweben



1 µg Gesamt-RNA wurde für die RT-PCR eingesetzt. Die 443 bp Bande der GAPDH zeigt, daß die Proben gleichmäßig aufgetragen wurden. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurde GAPDH nicht in den weiteren Abbildungen in dieses Abschnitts gezeigt.

³ zum Teil publiziert in Langenbeck's Arch Chir 384 (1999):54-59.

Abb.13: mRNA-Expression von DR4, DR5, TNF-R1, Fas, TRAIL, FasL und Köderrezeptor DcR1 in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC). Siehe dazu Legende Abb. 12



Aus den gezeigten Daten resultiert, daß die Transkripte des Liganden TRAIL, des Rezeptors DR4 und des Köderrezeptors DcR1 zwar nicht gleichmäßig, aber in allen Geweben exprimiert wurden. Eine verminderte Expression des Rezeptors DR5 war in unterschiedlichem Ausmaß in differenzierten Karzinomen nachweisbar, aber nicht in undifferenzierten Karzinomen. Fas- und FasL-mRNA wurden in malignen Geweben unterschiedlich exprimiert (Abb. 12-15).

Abb. 14: mRNA-Expression von DR4, DR5, TNF-R1, Fas, TRAIL, FasL und Köderrezeptor DcR1 in follikulären Schilddrüsenkarzinomen. Siehe dazu Legende Abb. 12

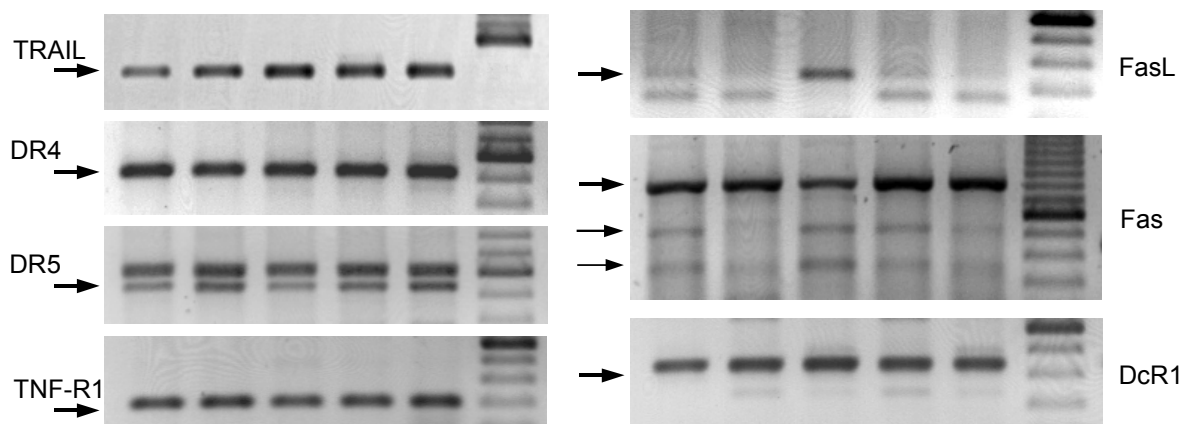
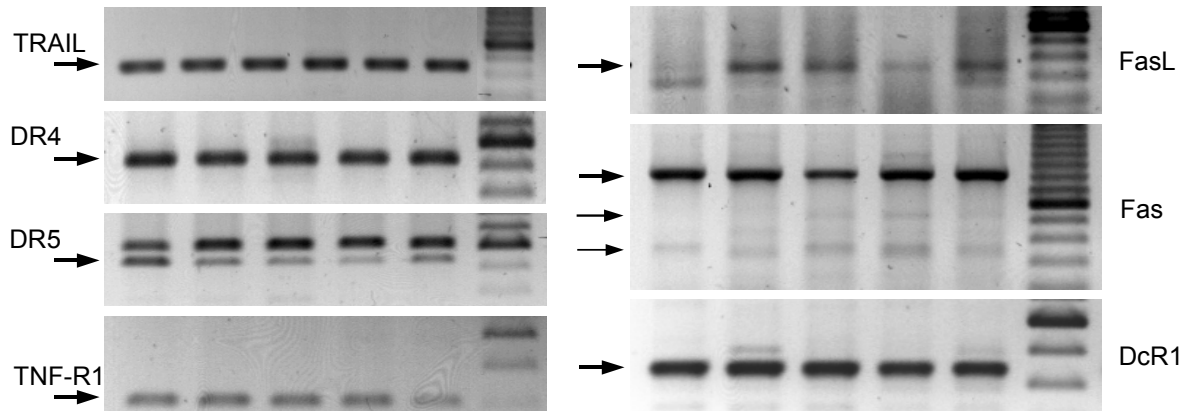
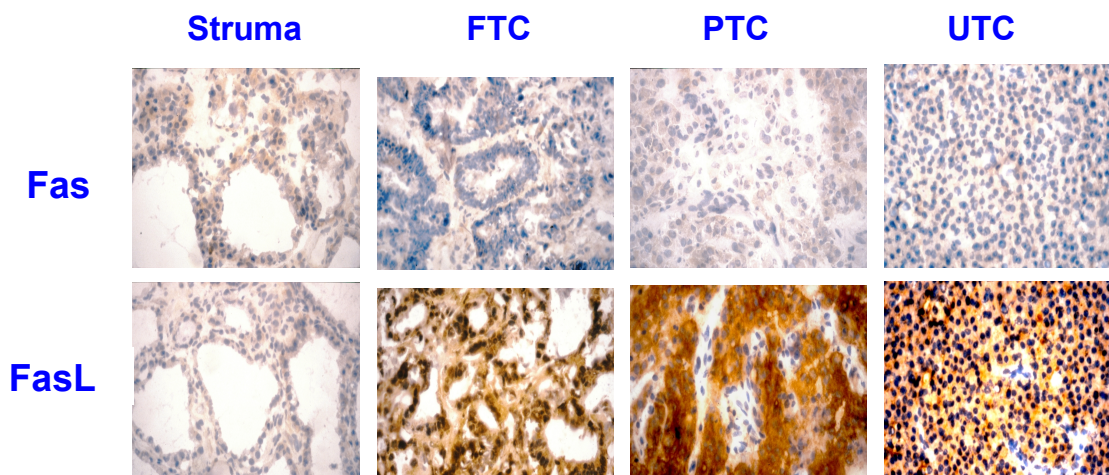


Abb. 15: mRNA-Expression von DR4, DR5, TNF-R1, Fas, TRAIL, FasL und Köderrezeptor DcR1 in papillären Schilddrüsenkarzinomen. Siehe dazu Legende Abb. 12



Wie Abb. 16 exemplarisch zeigte, daß FasL nicht in bSD, variabel in differenzierten und stark in undifferenzierten Karzinomen exprimiert wurde, während Fas schwach in bSD, unterschiedlich in differenzierten und kaum in undifferenzierten Karzinomen nachgewiesen werden konnte.

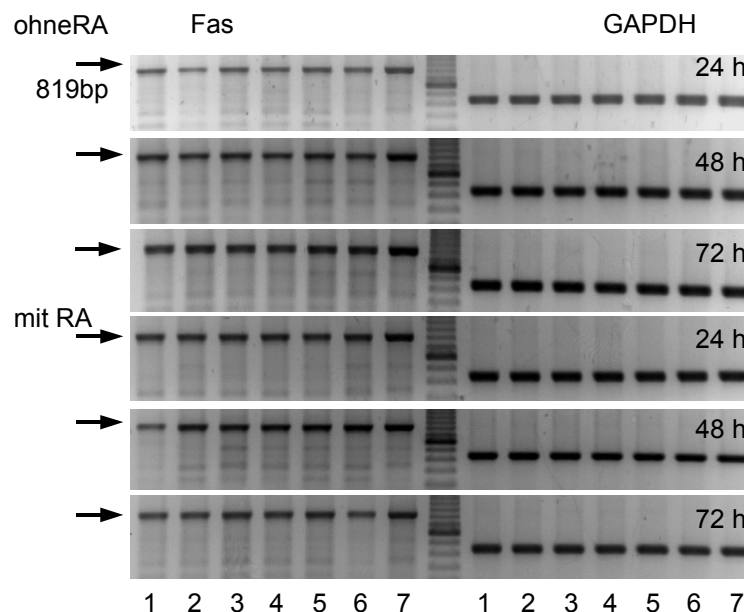
Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis von Fas und FasL in benigner Struma, follikulärem (FTC), papillärem (PTC) und undifferenziertem Schilddrüsenkarzinom (UTC). Siehe dazu Legende von Abb. 5. (x20)



4.1.4.2 Zelllinie 8505C

Die Schilddrüsentumorzelllinie 8505C entstammt einem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom, bei dem papilläre Strukturen und ein intakter TSH-Rezeptor erhalten sind (Hoang-Vu unpubl. Daten).

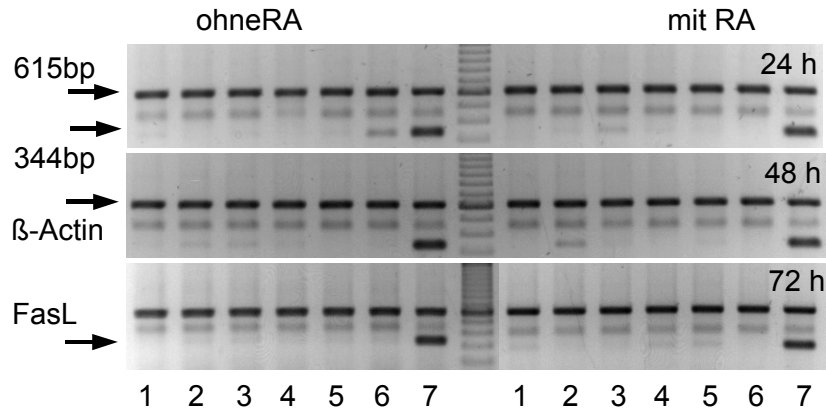
Abb. 17: Expression von Fas- und GAPDH-mRNA in der Schilddrüsentumorzelllinie 8505C nach Stimulation mit Insulin (2), PMA (3), Forskolin (4), TSH (5) und EGF (6) im Vergleich zur Kontrolle (1) für 24, 48 und 72 Stunden. Oberer Teil: Ohne Retinsäurebehandlung, unterer Teil: nach 72 Stunden mit 1 μ M Retinsäure. 7: positive Kontrolle



Für die Stimulation wurden die Zellen kultiviert, bis sie eine konfluente Monolayer Schicht bildeten. Nach 24h in Basalmedium wurden die Zellen mit bzw. ohne Retinsäure für 72 Stunden vorbehandelt. Nach weiteren 24 Stunden im Basalmedium wurden sie wie oben beschrieben stimuliert. 1 μ g Gesamt-RNA wurde für die RT-PCR eingesetzt. Die 443 bp Bande der GAPDH zeigte, daß die Proben gleichmäßig aufgetragen wurden.

Unabhängig von der Vorbehandlung wurde mRNA von Fas in allen Stimulationsmodi zu allen Untersuchungszeitpunkten exprimiert. Das FasL-Transkript war nur nach EGF-Stimulation für 24 Stunden nachweisbar, während es nach 72 Stunden Vorbehandlung mit Retinsäure nicht mehr exprimiert wurde. (Abb. 17 und 18). Während die mRNA-Expression von DR4, DR5, TRAIL und TNF-R1 keine Veränderung zeigte (Abb. 19-21), wurde die Expression von DcR1 nach Insulin, PMA, Forskolin und TSH-Behandlung nach 72h herab reguliert. Im Gegensatz dazu stimulierte EGF die DcR1-Expression (Abb. 22). Eine RA-Vorbehandlung für 72h hob diese Wirkung auf (Abb. 22).

Abb. 18: Expression von FasL- und β -Actin-mRNA in der Schilddrüsentumorzelllinie 8505C nach Stimulation mit Insulin (2), PMA (3), Forskolin (4), TSH (5) und EGF (6) im Vergleich zur Kontrolle (1) für 24, 48 und 72 Stunden. 7: Positivkontrolle



Für die Stimulation wurden die Zellen kultiviert, bis sie eine konfluente Monolayer Schicht bildeten. Nach 24h in Basalmedium wurden die Zellen mit bzw. ohne Retinsäure für 72 Stunden vorbehandelt. Nach weiter 24 Stunden im Basalmedium wurden sie wie oben beschrieben stimuliert. 1 μ g Gesamt-RNA wurde für die Multiplex RT-PCR eingesetzt. Die 344 bp Bande der β -Actin zeigte, daß die Proben gleichmäßig aufgetragen wurden.

Abb. 19: Expression von TRAIL- (437 bp), DR4- (528 bp) und β -Actin-mRNA (615 bp) in der Schilddrüsentumorzelllinie 8505C nach Stimulation mit Insulin (2), PMA (3), Forskolin (4), TSH (5) und EGF (6) im Vergleich zur Kontrolle (1) für 24, 48 und 72 Stunden. 7: Positivkontrolle. Siehe dazu Legende Abb. 18

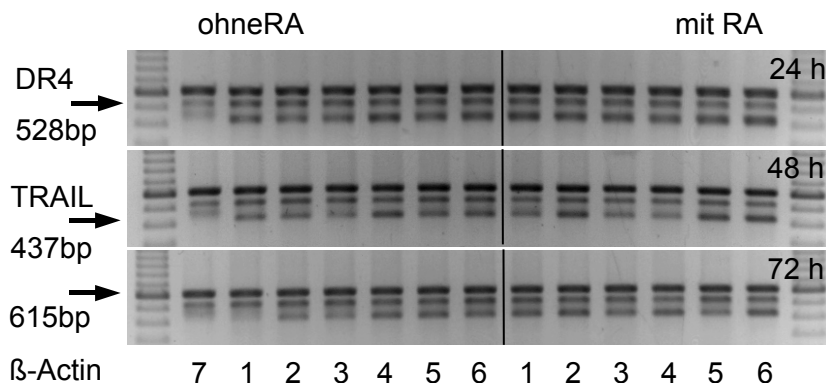


Abb. 20: Expression von DR5- (539 bp) und GAPDH-mRNA (443 bp) in der Schilddrüsentumorzelllinie 8505C nach Stimulation mit Insulin (2), PMA (3), Forskolin (4), TSH (5) und EGF (6) im Vergleich zur Kontrolle (1) für 24, 48 und 72 Stunden. 7: Positivkontrolle. Siehe dazu Legende Abb. 17

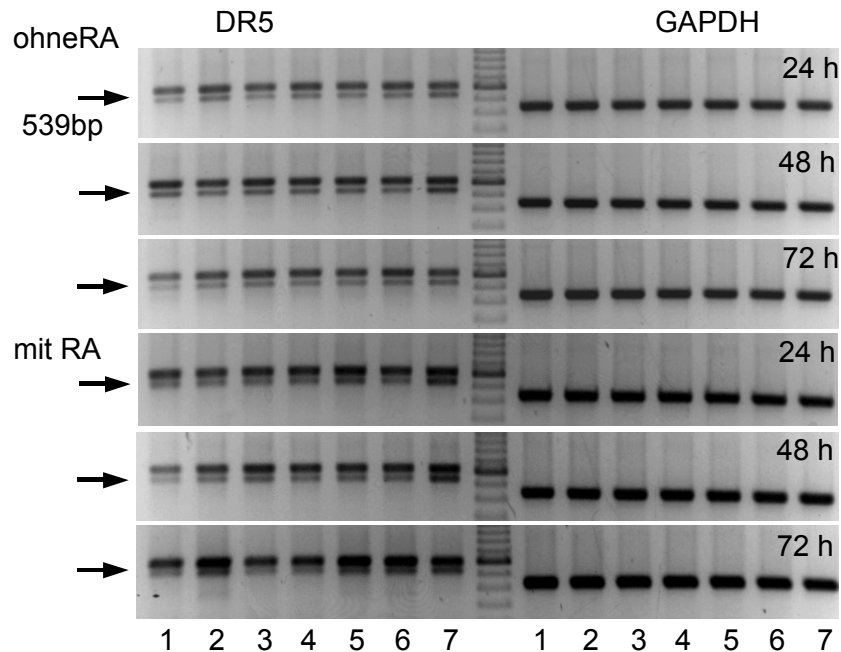


Abb. 21: Expression von TNF-R1- (304 bp) und GAPDH-mRNA (443 bp) in der Schilddrüsentumorzelllinie 8505C nach Stimulation mit Insulin (2), PMA (3), Forskolin (4), TSH (5) und EGF (6) im Vergleich zur Kontrolle (1) für 24, 48 und 72 Stunden. 7: Positivkontrolle. Siehe dazu Legende Abb. 17

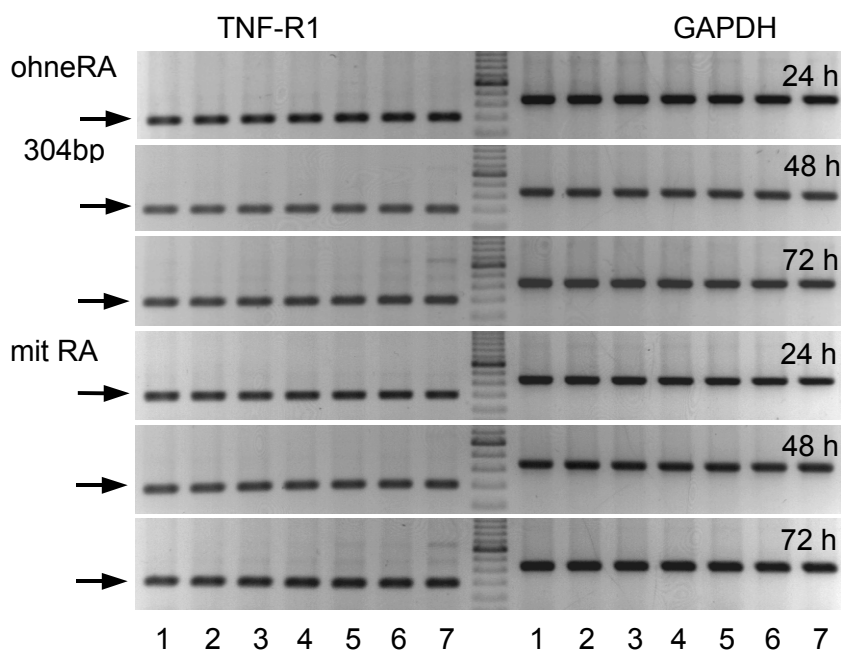
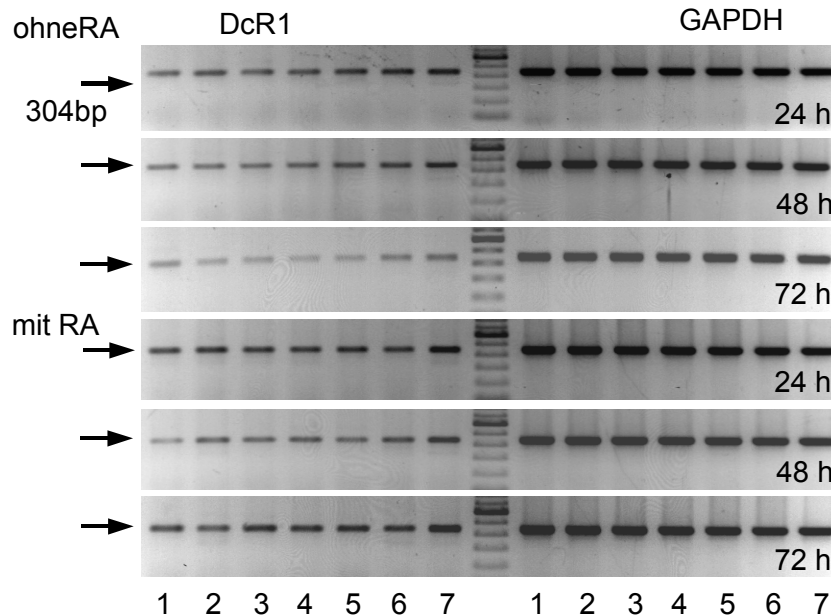


Abb. 22: Expression von DcR1- (441 bp) und GAPDH-mRNA (443 bp) in der Schilddrüsentumorzelllinie 8505C nach Stimulation mit Insulin (2), PMA (3), Forskolin (4), TSH (5) und EGF (6) im Vergleich zur Kontrolle (1) für 24, 48 und 72 Stunden. 7: positive Kontrolle. Siehe dazu Legende Abb. 17



4.1.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Expression von E-Cadherin scheint mit der Dedifferenzierung, Progression sowie Metastasierung der Schilddrüsenkarzinome assoziiert zu sein. TSH kann als ein Stimulator betrachtet werden, der sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression induziert. Im Gegensatz dazu sind Substanzen wie EGF, FCS und Phorbol ester (PMA) in der Lage, Proliferation und Dedifferenzierung auszulösen. EGF führt zu einer Down-Regulation von E-Cadherin-Expression in humanen Schilddrüsenzellen.

CD97 ist in Strumagewebe nicht nachweisbar, papilläre und follikuläre Karzinome zeigen keine oder nur eine geringe Reaktivität für CD97, während fast alle undifferenzierten Karzinome CD97 sehr stark exprimieren. Vergleichsuntersuchungen zwischen normalem und tumorösem Gewebe desselben Patienten machen deutlich, daß der CD97-Antigen parallel mit zunehmender Malignität der Schilddrüsenkarzinome stärker exprimiert wird. CD97 repräsentiert möglicherweise einen zusätzlichen Marker für Klassifikation, Staging und Subtypisierung der 3 Thyreozytenkarzinomen.

Die Zelllinien sowohl aus follikulärem Karzinom (FTC-133) als auch aus undifferenziertem Schilddrüsenkarzinom (8505C) weisen eine deutliche Expression von CD97 auf. Im Gegensatz zu E-Cadherin ist CD97 durch cAMP/PKA-abhängige Aktivatoren wie TSH oder Forskolin nicht stimulierbar. Durch eine PMA-Behandlung zeigen die Zellen weniger CD97-Expression, was möglicherweise auf eine Internalisation zurückzuführen ist und gleichzeitig auf die Transduktionskaskade über Proteinkinase C hindeutet. Im Gegensatz dazu führt *all-trans* Retinsäure, die *in-vitro* und *in-vivo* eine Redifferenzierung in Schilddrüsentumorzellen induzieren kann, auf FTC-133 Zellen zu einer verminderten CD97 bei gleichzeitig erhöhter E-Cadherin Expression. Über welche Wirkungsmechanismen dies erfolgt, ist noch unklar.

Das Transkript von MT1-MMP, MMP-2 sowie TIMP-1 und -2 wurde unabhängig von der Vorbehandlung und von der 24-stündigen Stimulation unverändert exprimiert. Während unter Basalbedingungen mRNA von MMP-1 und -9 sowie TIMP-3 in der FTC-133 nicht detektierbar war, induzierte eine Behandlung mit PMA oder EGF für 24 Stunden eine Expression von mRNA. Eine Vorbehandlung mit RA für 72 Stunden führte zu einer Expression von MMP-9 und unter Kontrollbedingungen. Die Expression wurde unter zusätzlicher Behandlung von PMA oder EGF verstärkt. Nach 48 stündiger Stimulation zeigten die Expressionslevel von MMPs und TIMPs keinen Unterschied im Vergleich zu denen nach 24 Stunden. Eine Stimulation für 72 Stunden führte ebenfalls zu keinem Unterschied im Expressionsniveau von MMPs und TIMPs im Vergleich zu dem nach 24 Stunden ohne Vorbehandlung mit RA. Eine Vorbehandlung mit 1µM RA für 72 Stunden induzierte jedoch ein höheres Expressionsniveau von MMP-9- und TIMP-3-mRNA als ohne RA-Vorbehandlung. Die Erhöhung der MMP-9-mRNA ist noch deutlicher nach einer weiteren 72-stündigen Stimulation mit PMA oder EGF. Besonders zu beachten ist, daß Insulin die Expression von MMP-9 in den für 72 Stunden mit RA vorbehandelten Zellen induziert.

Die Transkripte des Liganden TRAIL, des Rezeptors DR4 und des Köderrezeptors DcR1 wurden zwar nicht gleichmäßig, aber in allen Geweben exprimiert. Die Expression des Rezeptors DR5 wurde in unterschiedlichem Ausmaß in differenzierten Karzinomen vermindert, während sie gleichmäßig in undifferenzierten Karzinomen exprimiert wurde. Fas- und FasL-mRNA wurden in malignen Geweben unterschiedlich exprimiert. Während die DR5-mRNA in 60% der differenzierten Tumoren nachweisbar war, scheint das Transkript von TRAIL und DR4 unabhängig von Histotyp ubiquitär exprimiert zu sein.

Die Ergebnisse zeigen, daß dedifferenzierte Schilddrüsengewebe Differenzierungsmarker wie E-Cadherin, TSH-Rezeptor verloren haben, aber Dedifferenzierungsmarker wie CD97, MMPs jedoch verstärkt exprimieren. Die zu einem klinisch manifestierten Tumorwachstum initiiierenden Veränderungen der Homöostase zwischen Apoptose und Proliferation in den untersuchten Geweben ist bereits abgelaufen, so daß eine schrittweise Untersuchung der Tumorgenese nicht mehr möglich ist. Aus diesem Grund wurde ein tierexperimentelles Modell etabliert, welches erlaubt, die durch exogene Einflüsse sequentiellen Veränderungen bei der Entstehung von Schilddrüsenneoplasien *in-vivo* unter kontrollierter Jodzufuhr sowohl auf histologischer, hormonaler als auch auf molekularer Ebene zu analysieren.

4.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

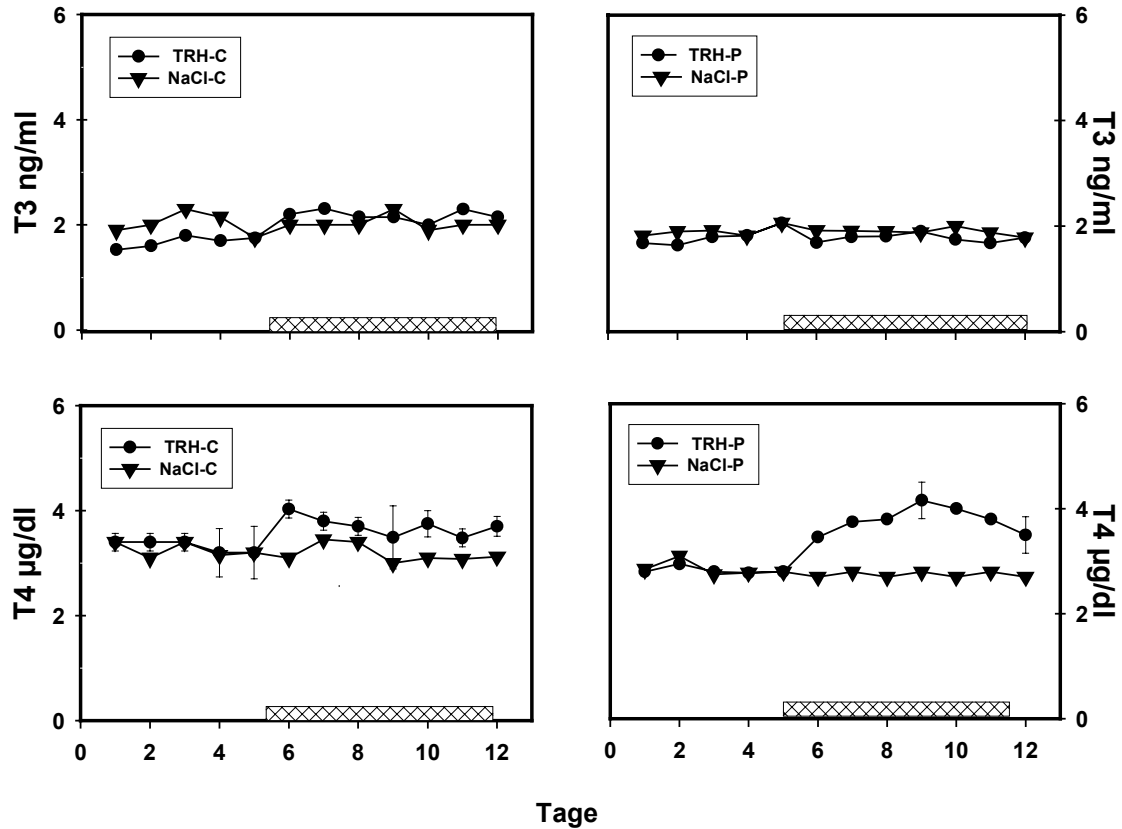
4.2.1 TRH-Stimulationsmodell ⁴


4.2.1.1 Schilddrüsenhormone

Wie in Abb. 23 dargestellt, zeigten die T3- und T4-Konzentrationen vor und während der Infusion bei den Kontrollgruppen (NaCl-C und NaCl-P), unabhängig von dem Infusionsmodus, keine signifikanten Unterschiede. Während der 12-tägigen experimentellen Phase betragen die durchschnittlichen T3-Plasmakonzentrationen der TRH-C-Gruppe zwischen 1.53 ± 0.08 und 2.31 ± 0.08 ng/ml, die der TRH-P-Gruppe zwischen 1.64 ± 0.04 und 2.06 ± 0.05 ng/ml und unterschieden sich somit zu keinem Zeitpunkt signifikant von den T3-Plasmakonzentrationen der beiden Kontrollgruppen. Der T4-Plasmaspiegel unterschied sich nach Abschluß des ersten Infusionstages einmalig hochsignifikant von dem entsprechenden Wert in der Kontrollgruppe NaCl-C. Unter TRH-P fand sich dagegen vom ersten bis zum fünften Infusionstag ein hochsignifikanter Anstieg der T4-Plasmakonzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe NaCl-P (Abb. 23; $p < 0.001$).

⁴ zum Teil publiziert in J Endocrinol 146(1995):339-348; Exp Clin Endocrinol & Diabetes 104(1996):51-53.

Abb. 23: T3- und T4-Plasmakonzentrationen vor und während der Infusion mit NaCl oder NaCl+TRH



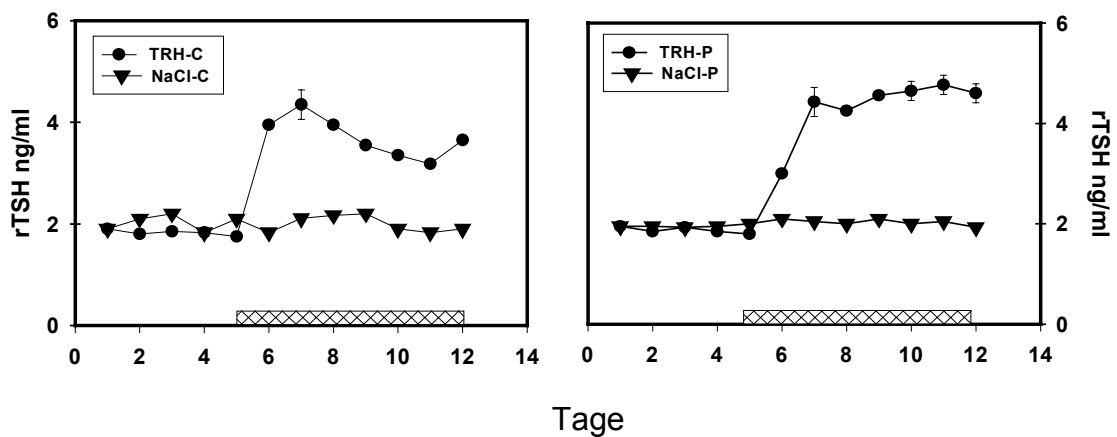
Fünf Tage vor und während der Infusion wurde täglich eine Blutprobe zwischen 8.00-8.30 Uhr genommen, um die physiologische sowie die durch Infusion induzierte Schilddrüsenhormonsekretion nachzuprüfen. TRH-C: kontinuierliche TRH-, TRH-P: pulsatile TRH-Infusion. NaCl-C: kontinuierliche NaCl-, NaCl-P: pulsatile NaCl-Infusion. : Infusionsphase. (n=8, x±SEM)

Unter TRH-C zeigten die T4-Plasmakonzentrationen zwischen dem 1. und dem 4. Infusionstag einen Abfall (4.03 ± 0.17 auf 3.49 ± 0.46 µg/dl), während T4 in der TRH-P-Gruppe innerhalb der selben Zeitspanne von 3.46 ± 0.06 auf 4.16 ± 0.35 µg/dl anstieg. Sowohl hinsichtlich des statistischen Vergleichs der unter TRH-Infusion erreichten T4-Plasmaspiegel der jeweiligen Gruppe mit denen der entsprechenden Kontrollgruppe (TRH-C vs. NaCl-C bzw. TRH-P vs. NaCl-P) als auch hinsichtlich des Verlaufs der T4-Freisetzung zwischen dem 1. und dem 4. Infusionstag zeigte sich eine klare funktionelle Überlegenheit des pulsatilen gegenüber dem kontinuierlichen Applikationsmodus.

4.2.1.2 Ratten-Thyreotropin (rTSH)

Während der gesamten Dauer der TRH-Infusion wurde ein hochsignifikanter Anstieg der rTSH-Plasmakonzentrationen ($p < 0.001$), gegenüber denen der entsprechenden Kontrollgruppen NaCl-C und NaCl-P festgestellt. Im zeitlichen Verlauf der peripheren rTSH-Plasmaspiegel ergaben sich jedoch deutlich Unterschiede zwischen beiden TRH-Versuchsgruppen, die auf eine höhere Effektivität der pulsatilen gegenüber der kontinuierlichen TRH-Infusion, auch bezüglich der Stimulation der hypophysären Sekretion, hindeuten. Von einem fast identischen Niveau der rTSH-Freisetzung nach Abschluß des zweiten Infusionstages von 4.35 ± 0.17 ng/ml für die TRH-C bzw. 4.43 ± 0.29 ng/ml für TRH-P fielen die rTSH-Werte im weiteren Verlauf der Infusion in der TRH-C auf 3.18 ± 0.12 ng/ml, während in der TRH-P ein Anstieg auf 4.77 ± 0.19 ng/ml zu beobachten war (Abb. 24).

Abb. 24: rTSH-Konzentrationen vor und während der Infusion mit NaCl oder NaCl+TRH

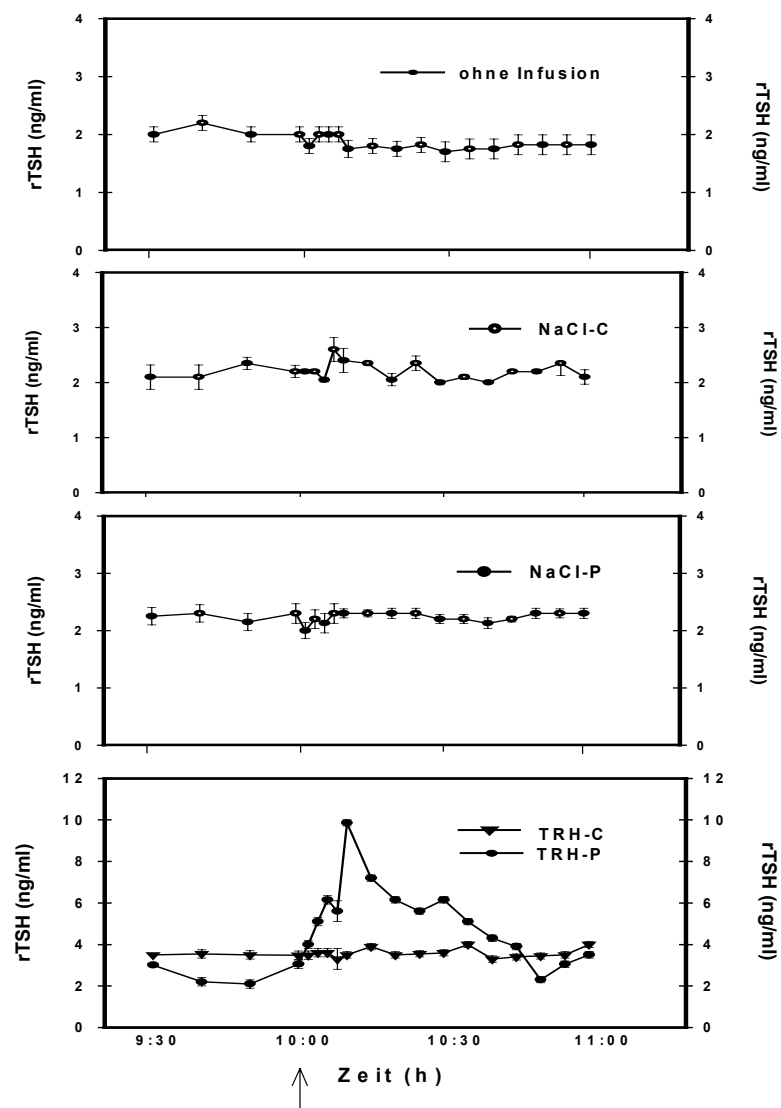


Fünf Tage vor und während der Infusion wurde täglich eine Blutprobe zwischen 8.00-8.30 Uhr genommen, um die physiologische sowie die durch Infusion induzierte TSH-Sekretion nachzuprüfen. TRH-C: kontinuierliche TRH-, TRH-P: pulsatile TRH-Infusion. NaCl-C: kontinuierliche NaCl-, NaCl-P: pulsatile NaCl-Infusion. : Infusionsphase. (n=8, $x \pm \text{SEM}$).

4.2.1.2.1 rTSH-Freisetzung am Ende der Infusion

Innerhalb des Zeitraums von 30 min vor bis 60 min nach Applikation des letzten Pulses am 7. Tag der Infusion wurde ein Monitoring der rTSH-Freisetzung durchgeführt. Der Verlauf der rTSH-Spiegel ist in Abb. 25 dargestellt.

Abb. 25: rTSH-Verlauf 30 min vor und 60 min nach dem TRH-Puls



Um die physiologische sowie die durch Infusion induzierte TSH-Sekretion nachzuprüfen wurde 0,3 ml Blut in zehnmütigem Abstand am 7. Tag der Stimulation über den rechten Jugularvenenkatheter während der gleichzeitigen Gabe von NaCl oder TRH über den linken Katheter in der Zeit zwischen 8.00 und 11.00 Uhr genommen. TRH-C: kontinuierliche TRH-, TRH-P: pulsatile TRH-Infusion. NaCl-C: kontinuierliche NaCl-, NaCl-P: pulsatile NaCl-Infusion. —▶ : Puls. (n=8, $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

In den Kontrollgruppen lagen die rTSH-Werte für die NaCl-C-behandelten Tiere zwischen 2.00 ± 0.04 - 2.60 ± 0.22 ng/ml und unterschieden sich nicht signifikant von denen der NaCl-P-behandelten Tiere (rTSH: 2.00 ± 0.15 – 2.30 ± 0.37 ng/ml). Die Abb. 25 zeigte den rTSH-Verlauf für eine zusätzliche Kontrollgruppe, deren Tiere keine Infusion bekamen. Innerhalb dieser Gruppe lagen die rTSH-Plasmakonzentrationen während des oben beschriebenen Zeitraumes zwischen 1.70 ± 0.17 und 2.20 ± 0.13 ng/ml. Innerhalb des Versuchszeitraumes hatte weder die Beendigung der kontinuierlichen noch die der pulsatischen NaCl-Infusionsbehandlung eine erkennbare Auswirkung auf die Höhe der rTSH-Spiegel.

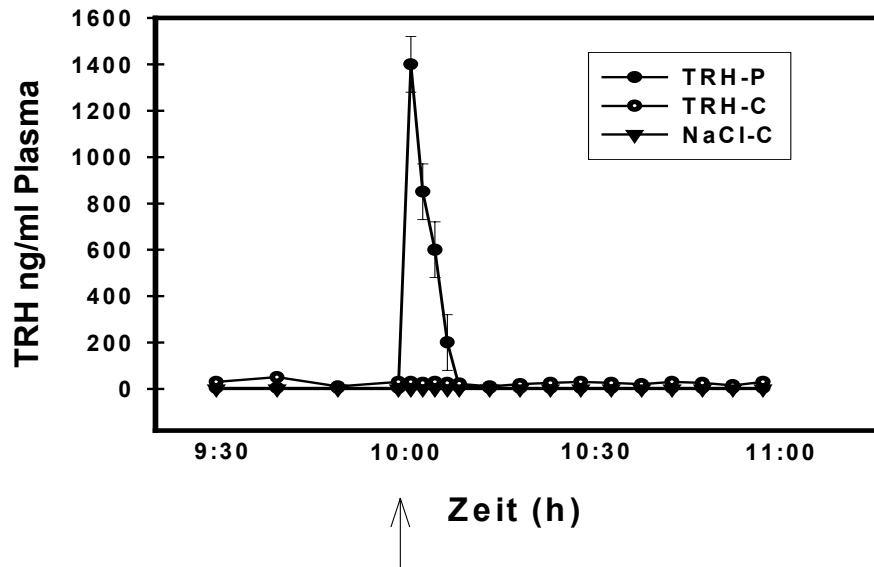
Unter TRH-C zeigte sich eine Fluktuation der rTSH-Konzentration zwischen 3.30 ± 0.17 und 4.00 ± 0.15 ng/ml. Infolge des TRH-Pulses um 10.00 Uhr stieg die rTSH-Konzentration innerhalb von 10 min von einem Basalwert von 3.01 ± 0.21 ng/ml auf das über das 3-fache (9.86 ± 0.34 ng/ml) in der TRH-P-Gruppe an ($p < 0.001$). Die zu denselben Zeitpunkten bestimmten rTSH-Konzentrationen innerhalb der TRH-C-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von der TRH-P-Gruppe (3.50 ± 0.24 vs. 3.60 ± 0.25).

Die rTSH-Konzentrationen in der TRH-P-Gruppe fielen innerhalb von 40 bis 50 min nach Erreichen des Stimulationsmaximums wieder auf die vor der Pulsapplikation gemessenen Werte ab.

4.2.1.2.2 TRH-Konzentrationen am Ende der Infusion

Ziel der TRH-Bestimmung innerhalb des Zeitraums von 30 min vor bis 60 min nach TRH-Puls am 7. Tag der Infusion war sowohl der direkte Nachweis vom infundierten TRH als auch die Gegenüberstellung der beiden Applikationsmodi.

In der TRH-C-Gruppe schwankten die TRH-Konzentrationen zwischen 22.0 ± 5.7 und 52.0 ± 4.9 ng/ml. Bei der TRH-P-Gruppe konnte der letzte Puls nachgewiesen werden: von einem Basalwert von 3.6 ± 0.6 ng/ml wurde 2 min nach dem Puls ein Maximum von 1400 ± 120 ng/ml, 8 min später Werte innerhalb des für die TRH-C-Gruppe angegebenen Bereichs, und weitere 15 min später die vor dem Puls gemessenen Basalwerte erreicht (Abb. 26).

Abb. 26: TRH-Konzentrationen 30 min vor und 60 min nach dem TRH-Puls

Zum Nachweis der erfolgreichen Infusion von TRH in den oben genannten Mustern wurden die zirkulierenden TRH-Spiegel durch Abnahme nach folgendem Schema überprüft: 9.30-10.00: 10-minütiger Abstand, 10.00 h: TRH Puls, 10.00-10.10 alle 2, 10.10-11.00 alle 10 Minuten. TRH-P: pulsatile, TRH-C: kontinuierliche TRH-Infusion. NaCl-C: kontinuierliche NaCl-Infusion. → : TRH-Puls (n=6, \bar{x} ±SEM).

4.2.1.2.3 rTSH-Antwort auf einen TRH-Bolus

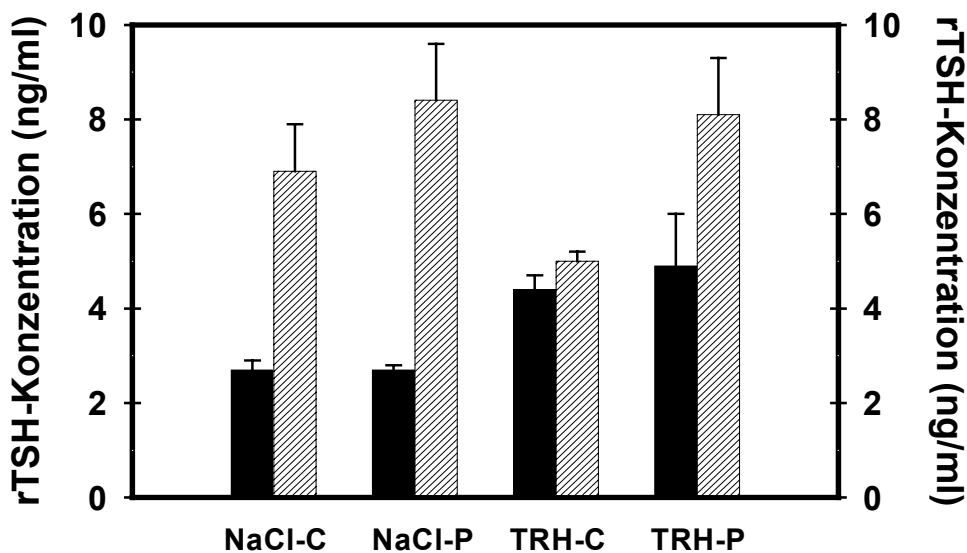
Die rTSH-Konzentrationen wurden jeweils 30 min vor und 30 min nach einem 0.1 mg TRH-Bolus untersucht.

In der NaCl-C-Gruppe zeigte sich ein Anstieg der TSH-Plasmakonzentrationen von 2.7 ± 0.2 auf 6.9 ± 1.0 ng/ml, welcher mit der in der NaCl-P-Gruppe beobachteten Differenz vergleichbar war (von 2.7 ± 0.1 auf 8.4 ± 1.2 ng/ml; $p < 0.001$). In den beiden TRH-Gruppen waren die TSH-Plasmakonzentrationen 30 min vor dem Bolus nicht signifikant verschieden (TRH-C: 4.4 ± 0.3 ; TRH-P: 4.9 ± 1.1 ng/ml; $p > 0.05$). Der TRH-Bolus führte in der TRH-C zu einem Anstieg um 13.6% auf 5.0 ± 0.2 ng/ml, in der TRH-P-Gruppe jedoch um 65.3% auf 8.1 ± 1.2 ng/ml.

Nach Abschluß der Infusion mit jeweils identischer TRH-Menge reagierten die Tiere mit pulsatilem Anstieg der TSH-Konzentration auf einen identischen TRH-Bolus mit einer prozentual deutlich höheren Steigerung der endogenen TSH-Sekretion als die Tiere nach kontinuierlicher Applikation.

Beim Vergleich der rTSH-Antwort auf den TRH-Bolus zwischen beiden kontinuierlich infundierten Gruppen zeigte sich, daß der Anstieg der rTSH-Konzentrationen in der TRH-C-Gruppe nur 72.5% der in der NaCl-infundierten Gruppe gemessenen Konzentrationen betrug. Im Gegensatz dazu erreichte die TRH-P-Gruppe durch den TRH-Bolus 96.4% der rTSH-Wertes der NaCl-P-Gruppe. Somit blieb in der TRH-P-Gruppe im Vergleich zu der entsprechenden Kontrollgruppe die Ansprechbarkeit auf einen TRH-Bolus nach 7-tägiger TRH-Infusion weitestgehend erhalten, während sie in der kontinuierlichen TRH-Infusionsgruppe deutlich beeinträchtigt war (Abb. 27).

Abb. 27: rTSH-Konzentrationen 30 min vor und 30 min nach einem 0.1mg TRH-Bolus



Um eine Responsivität der hypothalamo-hypophysären Achse nach 7-tägiger Infusion zu überprüfen, erhielten alle Tiere um 11.00 Uhr einen Bolus von 0.1mg TRH intravenös appliziert. Blutentnahme erfolgte 30 min vor und nach dem Bolus. TRH-C: kontinuierliche TRH-, TRH-P: pulsatile TRH-Infusion. NaCl-C: kontinuierliche NaCl-, NaCl-P: pulsatile NaCl-Infusion.

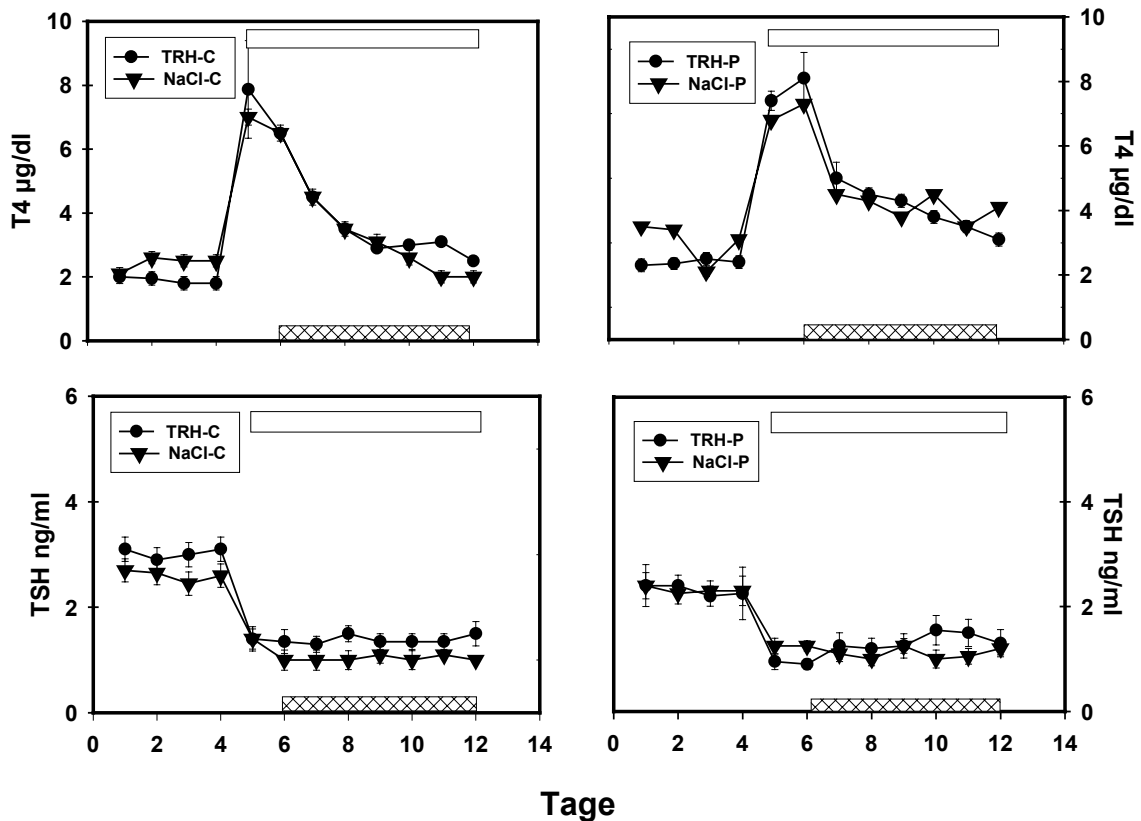
■ : 30 min vor Bolus, ▨ : 30 min nach 0.1 mg TRH-Bolus. (n=6, $x \pm \text{SEM}$).

4.2.1.3 T4-Suppression

Vor den T4-Applikationen lagen die durchschnittlichen T4-Plasmakonzentrationen bei 2.36 ± 0.21 $\mu\text{g/dl}$. Unter T4-Behandlung stiegen sie auf 7.87 ± 1.53 $\mu\text{g/dl}$ und fielen im weiteren Verlauf, trotz täglicher T4-Gabe, wieder ab (Abb. 28). TSH-Plasmakonzentrationen betragen vor der T4-Applikation 2.66 ± 0.23 ng/ml und sanken in allen

Behandlungsgruppen nach Beginn der T4-Substitution auf 1.95 ± 0.72 ng/ml. Es bedeutete, daß TRH, unabhängig vom Infusionsmodus, den Inhibitionseffekt von T4 auf hypophysärer Ebene nicht aufheben konnte (Abb. 28).

Abb. 28: T4- und TSH-Plasmakonzentrationen vor und während der T4-Substitution.
 □ : T4 Gabe; ▨ : Infusion



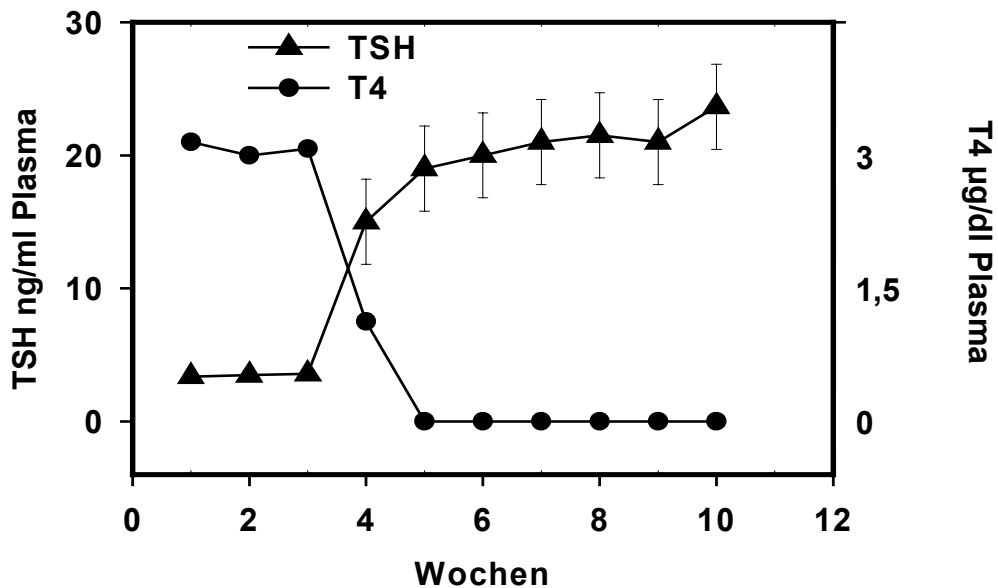
Um eine mögliche TRH-Wirkung auf die Schilddrüse zu untersuchen wurden die Tiere von einem Tag vor bis zum Ende der Infusion, täglich mit $10\mu\text{g}$ Thyroxin/100 g KG/Tag i.v. behandelt. Die Infusionsschemata entsprachen den im vorhergehenden Versuchsteil beschriebenen Behandlungsmodi (NaCl-C+T4; NaCl-P+T4; TRH-C+T4 und TRH-P+T4).

4.2.1.4 PTU-Behandlung

Drei Wochen nach Behandlungsbeginn mit PTU sanken die T4-Plasmakonzentrationen von einem mittleren Spiegel von 3.37 ± 0.21 µg/dl auf unterhalb des Meßbereichs liegende Werte ab und blieben auf diesem Konzentrationsniveau bis zum Ende des Versuches.

Die TSH-Plasmakonzentrationen nahmen einen umgekehrten Verlauf: mit Beginn der dritten Woche war ein Anstieg zu beobachten bei einem Basalwert von 3.56 ± 0.32 ng/ml auf 23.66 ± 3.2 ng/ml (Abb. 29).

Abb. 29: T4- und TSH-Plasmakonzentrationen 3 Wochen vor und 9 Wochen nach PTU-Gabe. (n=6, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)



Als Positivkontrolle wurden 6 Tiere über einen Zeitraum von 9 Wochen behandelt, wobei PTU (6n-Propyl-2-Thiouracil) in 0.1%-iger Lösung im Trinkwasser verabreicht wurde. Für die Hormonbestimmungen wurden 3 Wochen vor der Behandlung wöchentlich aus der Retroorbitalvene Blutproben gewonnen.

4.2.1.5 Proliferation

Die prozentuale Anzahl der BrDU-markierten Thyreozyten betrug $0.8 \pm 0.1\%$ bei NaCl-C, $0.7 \pm 0.2\%$ bei NaCl-P, $3.0 \pm 0.2\%$ bei TRH-C, sowie $2.9 \pm 0.2\%$ bei TRH-P. Unter T4-Behandlung betrug die Rate BrDU-positiver Thyreozyten bei NaCl-C: 0.6 ± 0.1 , NaCl-P: 0.6 ± 0.2 , TRH-C: 0.5 ± 0.1 und TRH-P: 0.4 ± 0.1 , während sie bei PTU-behandelten Tieren auf $3.2 \pm 0.2\%$ anstieg.

Abb. 30: Beispiel eines BrDU-positiven und eines BrDU-negativen Thyreozyten.
(x160)

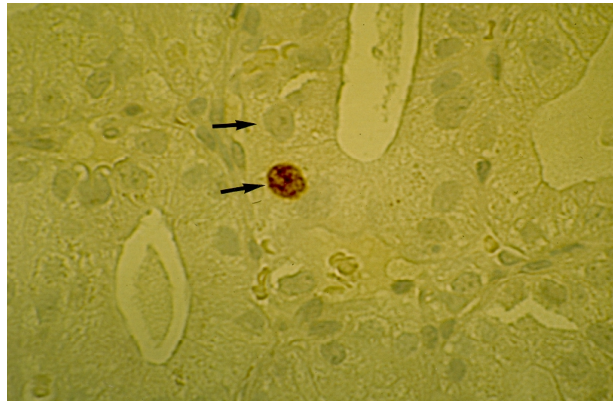
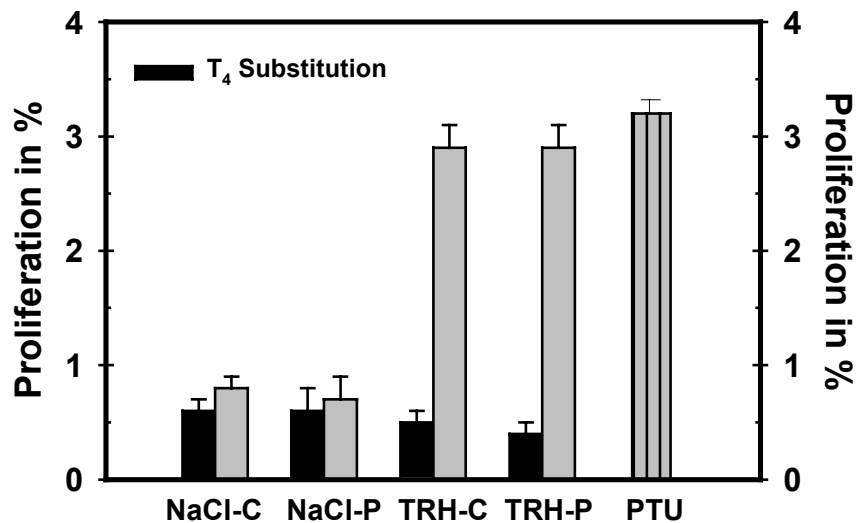


Abb. 31: Proliferationsrate unter verschiedenen Behandlungen mit und ohne T₄-Substitution. (n=6±SEM)



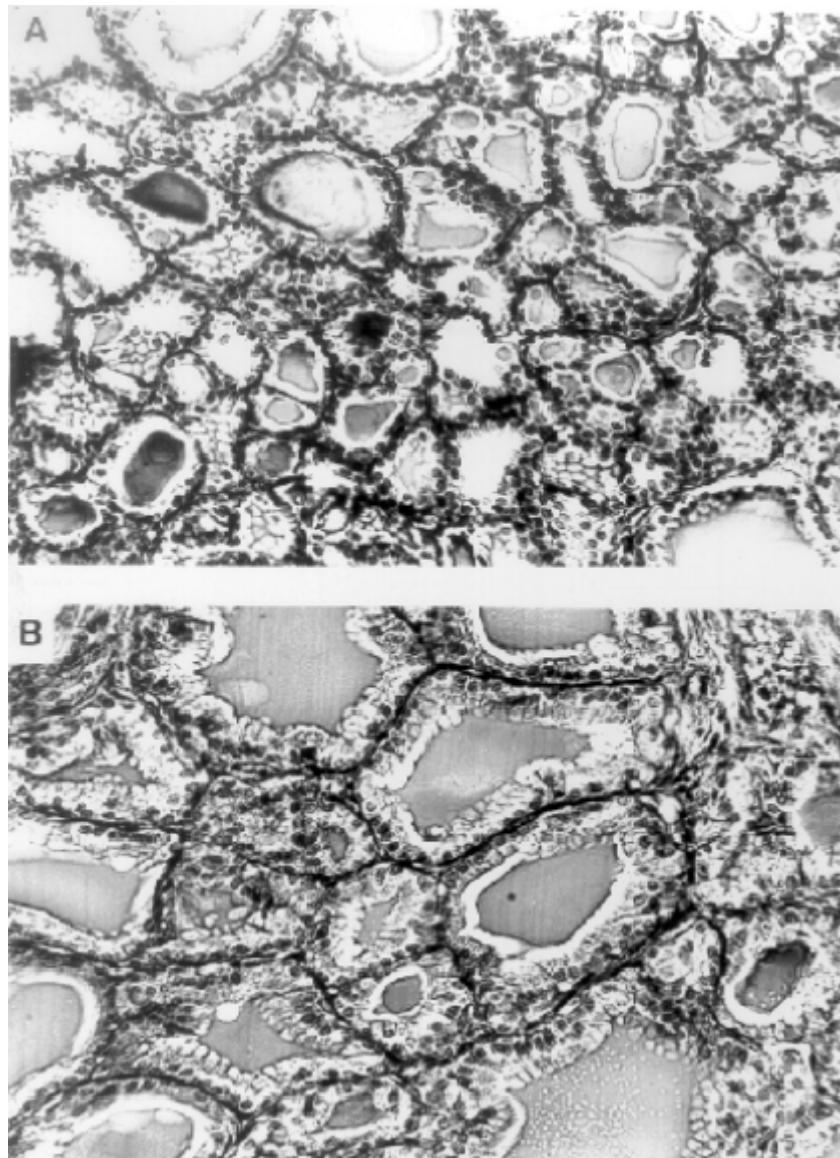
Für die Untersuchungen der Proliferation der Schilddrüsenzellen wurde allen Tieren des TRH-Modells eine Stunde vor der Beendigung des Versuches 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrDU, 50µg/100g KG) i.v. verabreicht. Zur Untersuchung der Wirkung von TRH auf die Schilddrüsenproliferation wurden die Tiere 2 Tage vor der Infusion mit 10µg Thyroxin/100 g KG/Tag (TRH-P+T₄) behandelt. Als Positivkontrolle wurden 6 Tiere über einen Zeitraum von 9 Wochen behandelt, wobei PTU (6n-Propyl-2-Thiouracil) in 0.1%-iger Lösung im Trinkwasser verabreicht wurde. Am Ende der Behandlungsphase wurde BrDU eine Stunde vor der Tötung i.v. verabreicht.

4.2.1.6 Histomorphologische Veränderungen

Histologie

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Kontrollschilddrüsen zeigten den typischen Aspekt eines funktionell ruhenden, gering sekretorisch aktiven Schilddrüsengewebes bei im Vordergrund stehender Sekretstapelung mit großen, kolloidgefüllten Follikeln und einem das Follikellumen begrenzenden einschichtigen, flachen Epithel mit homogenem Zytoplasma (Abb. 32A).

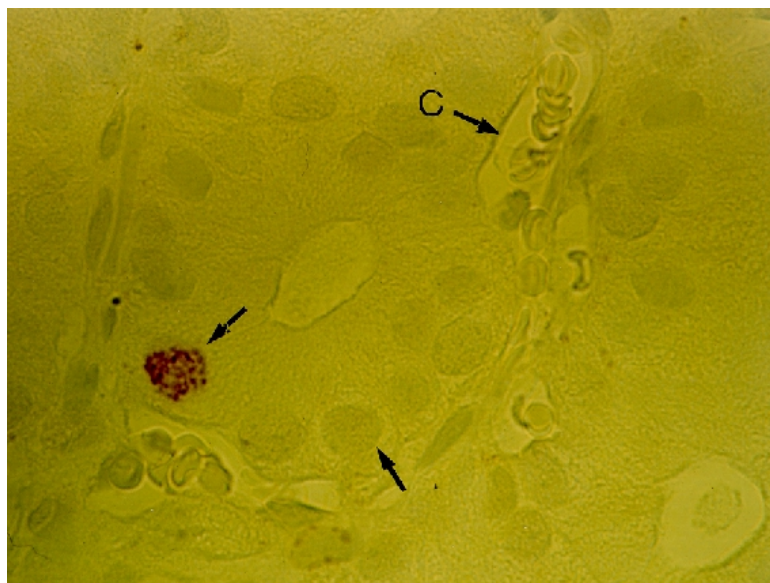
Abb. 32: Lichtmikroskopie einer Schilddrüse nach TRH-Infusion (B). A: Kontrolle (x60)



Die TRH-Infusion (Abb. 32B) führte zu folgenden lichtmikroskopischen Veränderung: die Follikel­epithelzellen zeigten deutliche Hypertrophie und waren iso- bis hochprismatisch, das Zytoplasma aufgelockert und milchglasartig getrübt. Insgesamt ergab sich so der Aspekt einer funktionell hochaktiven Schilddrüse in den Phasen der Sekretbildung und Sekretausschwemmung bei relativ geringer follikulärer Sekretstapelung. Obwohl diese histologischen Veränderungen häufig in den Geweben der TRH-P behandelten Tiere ausgeprägter waren oder zumindest betonter erschienen als in den TRH-C behandelten Tieren, war eine zweifelsfreie Differenzierung der Versuchstiere in solche, die eine kontinuierliche und in solche, die eine pulsatile TRH-Infusion erhalten hatten, aufgrund lichtmikroskopischer Kriterien nicht immer eindeutig möglich. Es konnten jedoch die TRH-behandelten Schilddrüsen eindeutig von denen der Kontrolltiere unterschieden werden.

Eine 9-wöchige Behandlung mit 0.1% PTU im Trinkwasser führte zu einer Erhöhung der Proliferationsrate der Thyreozyten. Der makroskopische Aspekt der PTU-Schilddrüsen zeigte im Gegensatz zu allen anders behandelten Gruppen eine auffällige Volumenzunahme, kleine, entspeicherte Follikel mit hohem Epithel und geringem Kolloidanteil. Im Randbereich der Follikel waren häufig sinusoidale Erweiterungen der versorgenden Kapillaren erkennbar (Abb. 33).

Abb. 33: Schilddrüsenhistologie nach PTU-Behandlung



→: BrDU-markierte und -unmarkierte Zelle. C: sinusoid erweiterte Kapillare. (x250). Siehe dazu Legende Abb. 31.

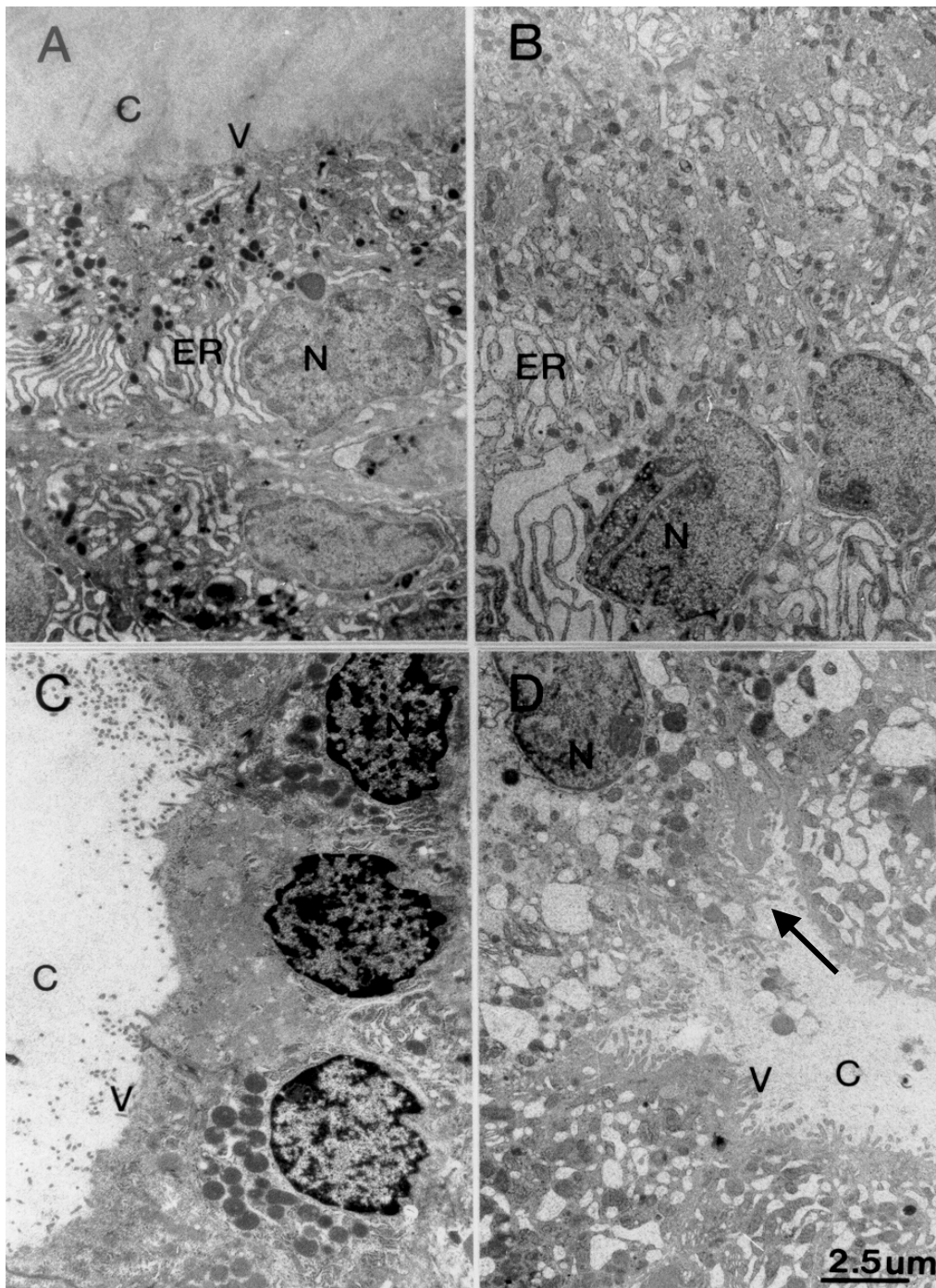
Ultrastruktur

In den Schilddrüsenpräparaten der Kontrollgruppen ließen sich folgende subzelluläre Strukturen differenzieren: Nukleus und Karyoplasma mit randständig betonten Heterochromatinschollen sowie die von Poren unterbrochene Kernmembran mit perinukleärer Zisterne, Cytoplasma mit den Membranschläuchen eines gut entwickelten endoplasmatischen Reticulums sowie Golgiapparat, Mitochondrien, Lysosomen und Sekretgranula verschiedener Reifungsstufen, basale und apikale, gegen das Kolloid deutlich abgegrenzte Plasmamembran mit einigen Mikrovilli und Interzellkontakten (Abb. 34A).

Deutliche ultrastrukturelle Veränderungen der Thyreozyten wurden bei TRH-behandelten Tieren festgestellt (Abb. 34D). Die Zahl und Größe der Zisternen des endoplasmatischen Reticulums nahmen so stark zu, daß der überwiegende Teil des gesamten zytoplasmischen Raumes von diesen ausgefüllt wurde. In einzelnen Präparaten war eine ballonartige Auftreibung der endoplasmatischen Zisternen zu erkennen. Die Anzahl und der Ausprägungsgrad des Golgiapparats hatten gegenüber der Kontrollsituation deutlich zugenommen. Ebenso waren die Mitochondrien, Lysosomen und Sekretgranula in weitaus höherer Zahl nachweisbar. Bei TRH-C behandelten Thyreozyten erschien stellenweise die Plasmamembran rupturiert. Dieses Phänomen wurde bei 6 von 7 TRH-C behandelten Schilddrüsen nachgewiesen.

Die Ultrastruktur der PTU-behandelten Thyreozyten zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine wesentlichen Veränderungen: Nukleus und Karyoplasma mit randständig betonten Heterochromatinschollen und Cytoplasma mit den Membranschläuchen eines sehr gut entwickelten endoplasmatischen Reticulums sowie Golgiapparat, Mitochondrien wie bei den Kontrollschilddrüsen. Lysosomen und Sekretgranula waren kaum nachweisbar (Abb. 34B). In den Präparaten der T4-behandelten Gruppen wiesen die Thyreozyten ultrastrukturell einen großen Nukleus, ein verkleinertes Cytoplasma, kaum erkennbare Mitochondrien und endoplasmatisches Reticulum auf. Es zeigte sich eine typische inaktive Zelle (Abb. 34C).

Abb. 34: Ultrastruktur der Schilddrüse unter PTU-Behandlung für 9 Wochen (**B**), T4 für 9 Tage (**C**) und TRH-P-Infusion für 5 Tage (**D**) im Vergleich zur Kontrolle (**A**)



Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Gewebe nach 24-stündiger Fixation mehrfach gewaschen und für eine Stunde in ungepufferter, 1%iger Osmiumtetroxidlösung nachfixiert. Nach erneut mehrmaligem Waschen wurden die Gewebe dehydriert, in Kunstharz eingebettet und mit einem Ultramikrotom Schnitte von 60-90 nm Dicke angefertigt. Nach Kontrastierung mit Uranylazetat und Bleizitrat wurden die Schnitte mit einem Elektronenmikroskop ausgewertet. C: Kolloid, V: Mikrovilli, ER: Endoplasmatisches Reticulum, N: Nucleus. → : rupturierte Plasmamembran.

Die Auswertung der ultrastrukturellen Veränderungen ließ erkennen, daß ein erhöhtes Verhältnis zwischen den Flächen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Zytoplasmas nach der 5-tägigen Behandlung von TRH im Vergleich zur Kontrolle oder zu TRH+T4 vorlag: TRH: $61.4 \pm 16.9\%$ der Gesamtflächen des Cytoplasmas, NaCl: $16.2 \pm 4.8\%$ ($p < 0.001$). TRH-Behandlung führte zu einer signifikant erhöhten Anzahl der Mitochondrien: TRH: 23 ± 3 /Zelle, NaCl: 12 ± 2 /Zelle ($p < 0.001$) und der Lysosomen: TRH: 363 ± 67 /Zelle, NaCl: 231 ± 69 /Zelle ($p < 0.001$). Im Gegensatz dazu supprimierte T4-Substitution die durch TRH-induzierten Veränderungen: relative Proportion ER/Cytoplasma: NaCl: $16.2 \pm 4.8\%$, TRH+T4: $10.2 \pm 2.8\%$ ($p < 0.001$); Anzahl der Mitochondrien: NaCl: 12 ± 2 /Zelle, TRH+T4: 8 ± 1.8 /Zelle ($p < 0.001$), Lysosomen: NaCl: 231 ± 69 , TRH+T4: 128 ± 19.2 /Zelle ($p < 0.001$).

4.2.1.7 Immunogoldmarkierung

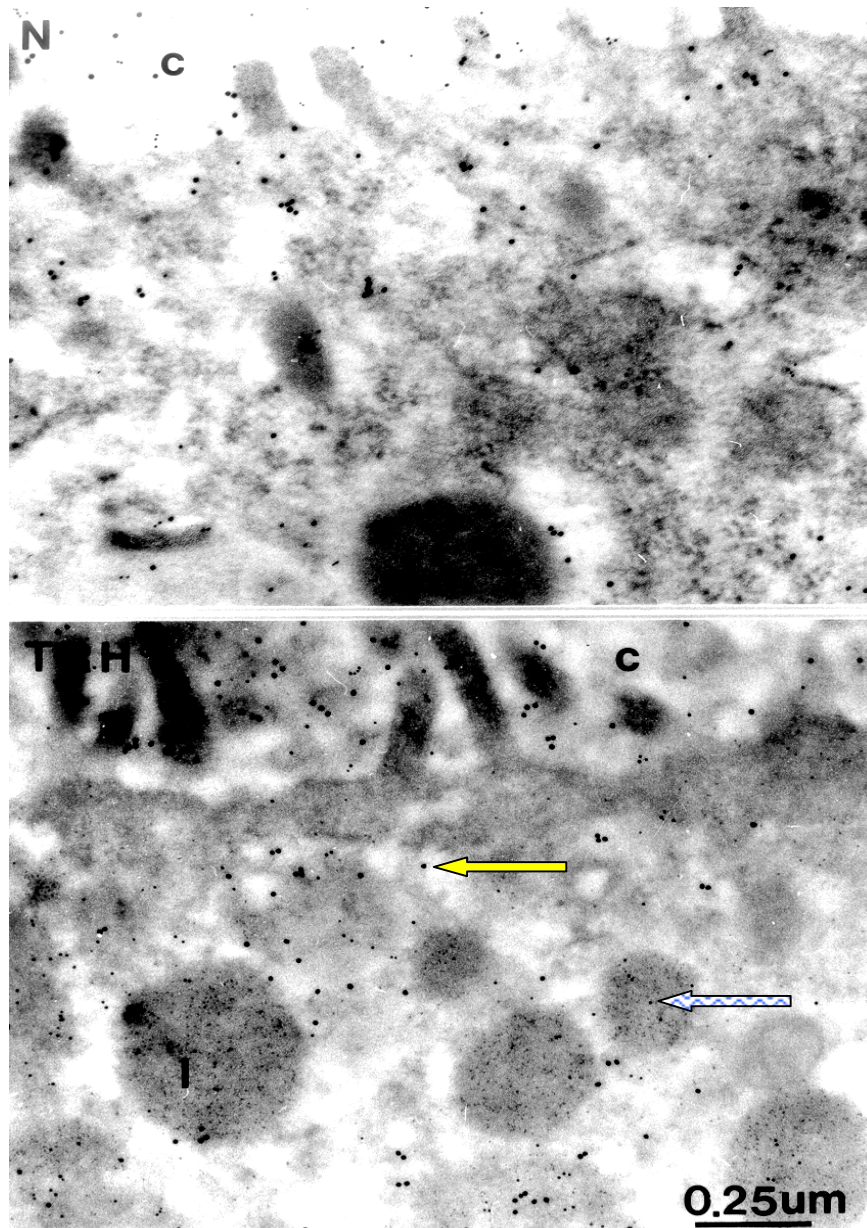
T4-Immunogold-Markierung



In den Kontrollschilddrüsenzellen war die T4-Markierung nicht in den Golgi-Apparaten und in den Zysten des ER, schwach in Nukleus und sehr stark im Kolloid nachweisbar. Die Dichte der T4-markierten Goldpartikel im Kolloid unterschied sich nicht zwischen TRH- und NaCl-behandelten Gruppen. Die Anzahl der T4-Goldpartikel innerhalb des Cytoplasmas ist in den TRH-behandelten Thyreozyten im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher: 452 ± 11 vs. 173 ± 9 Goldpartikel/ μm^2 ($p < 0.001$; Abb. 35). Die Ergebnisse der Goldmarkierung korrelierten mit den peripheren T4-Konzentrationen (siehe Abschnitt 4.2.1.1).

Tg-Immunogold-Markierung

Mittels Immunogold-Markierung wurde Thyreoglobulin (Tg) als Hauptprodukt innerhalb der ER cisternae nachgewiesen. In der Kontrolle war die Tg-Markierung sehr spärlich im Golgi-Apparat sowie in den Zysten des ER, nicht aber im Nukleus oder Mitochondrien nachweisbar. Die Dichte der Tg-Markierung im Kolloid bei der TRH-Infusion ist vergleichbar mit der in den Kontrollen. Eine signifikante Erhöhung der Anzahl von Goldpartikeln wurde in den vergrößerten Zysten des ER in der TRH-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle festgestellt: TRH: 374 ± 12 vs. NaCl: 197 ± 9 Goldpartikel/ μm^2 ($p < 0.001$).

Abb. 35: Immunogold-markiertes T4 (Goldpartikel-Durchmesser: 6 nm) und Tg (Goldpartikel: 15 nm) im apikalen Bereich der Thyreozyten



Für die Immunmarkierung wurden die Schnitte auf Pioloform-coated Gold-Matrix eingebettet, mit Kaninchenantikörper gegen Ratten-Tg und mit Monoklonalantikörper gegen T4 für 2 Stunden bei Raumtemperatur und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach 4maligem Waschen wurden die Präparate mit Antikaninchen-Gold (Durchmesser: 15 nm, für Tg) und Antimaus-Gold (Durchmesser: 6 nm, für T4) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Schnitte mit 1% Glutaraldehyd fixiert und unter Behandlung von Uranylacetat leicht kontrastiert. N: Normaler Thyreozyt, TRH: TRH-Behandlung. C: Kolloid; I: Lysosom.  : Goldmarkiertes Tg (Durchmesser: 15 nm) ;  : Goldmarkiertes T4 (Durchmesser: 6 nm).

Zusammenfassend führte eine kurzfristige TRH-Infusion zu einer Verdoppelung der immunreaktiven TSH-Plasmakonzentration, welche wiederum eine erhöhte Proliferationsrate, eine ultrastrukturell nachweisbare Hypertrophie der Thyreozyten, eine erhöhte periphere T4-Konzentration und eine erhöhte intrathyreoidale Tg-Produktion induzierte. Diese Ergebnisse zeigten, daß Veränderungen der TSH-Plasmakonzentration im physiologischen Bereich ultrastrukturelle Veränderungen der Thyreozyten verursachen.

4.2.2 TSH-Stimulationsmodell ⁵

4.2.2.1 rTSH und T4-Verlauf unter Suppression

Der zeitliche Verlauf der endogenen rTSH-Plasmakonzentrationen wurde nach Beginn der Suppressionsbehandlung durch Zusatz von 0.3 µg T3/ml im Trinkwasser gezeigt, daß nach 4-tägiger Suppressionsbehandlung ein sehr rascher und signifikanter ($p < 0.05$) Abfall der endogenen rTSH-Freisetzung bei einem Ausgangswert von 11.59 ± 2.52 auf 1.81 ± 0.36 ng/ml eintrat.

Die T4-Plasmaspiegel zeigten wie der oben beschriebene Verlauf der rTSH-Werte eine zeitliche Verzögerung von etwa 48 h. Als direkte Folge der Suppression der endogenen rTSH-Freisetzung sanken die T4-Plasmakonzentrationen von einem Ausgangswert von 2.23 ± 0.05 auf 0.26 ± 0.06 µg/dl, so daß sich die Werte vor und nach 4-tägiger Suppression hochsignifikant unterschieden ($p < 0.001$). Die 4-tägige T3-Vorbehandlung erreichte eine effektive Suppression der endogenen rTSH-Plasmaspiegel um den Faktor 6.4 bzw. die der T4-Plasmaspiegel um den Faktor 8.6.

4.2.2.2 T4-Antwort nach TSH-Gabe in Tieren mit und ohne T3-Suppression

Die durch die exogene TSH-Applikation induzierte T4-Änderung war in mit T3 supprimierten Ratten eindeutiger nachweisbar als bei nicht supprimierten Tieren: in der nicht supprimierten Gruppe betrug die Differenz zwischen den T4-Basalkonzentrationen und dem Maximum 1.8 ± 0.2 µg/dl, während in der supprimierten Gruppe ein Unterschied

⁵ zum Teil publiziert in Horm Metab Res 27(1995):173-178; Exp Clin Endocrinol & Diabetes 104(1996): 51-53.

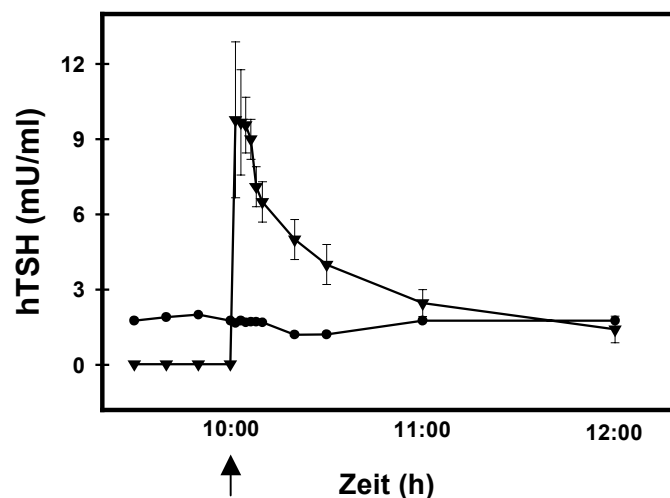
von $3.8 \pm 0.3 \mu\text{g/dl}$ bestand. Die T3-suppressive Vorbehandlung erhöhte damit die Detektionswahrscheinlichkeit einer durch exogene TSH-Applikation induzierten Änderung der T4-Konzentrationen.

4.2.2.3 Konzentrationen des humanen TSH (hTSH) am Ende der Infusion

In diesem Experiment wurde der Verlauf der hTSH-Plasmakonzentrationen innerhalb eines Zeitraumes von 30 min vor bis 120 min nach Beendigung einer 4-tägigen, niedrigdosierten rec-hTSH-Infusion ($3.6 \mu\text{g rec-hTSH/24h}$) untersucht. Das Infusionsvolumen und die Infusionsgeschwindigkeit waren bei kontinuierlich bzw. pulsatil infundierten Gruppen vergleichbar.

Die Probenentnahme war identisch mit der bei TRH-Monitoring (siehe dazu 3.2.3.1). In der kontinuierlich infundierten Gruppe betragen die hTSH-Plasmakonzentrationen während des Beobachtungszeitraums $1.76 \pm 0.06 \text{ mU/ml}$. Bei der pulsatil behandelten Gruppe lagen die Basalwerte von hTSH bei $0.03 \pm 0.02 \text{ mU/ml}$. Innerhalb einer Minute nach dem hTSH-Puls wurde ein Maximalwert von $9.77 \pm 3.11 \text{ mU/ml}$ erreicht, anschließend fiel der hTSH-Spiegel nach 60 min auf Werte von $2.46 \pm 0.54 \text{ mU/ml}$ bzw. nach 120 min auf Werte von $1.41 \pm 0.53 \text{ mU/ml}$ ab (Abb. 36).

Abb. 36: hTSH-Plasmakonzentrationen am Ende der Infusion



Zum Nachweis der erfolgreichen Infusion von hTSH wurden die zirkulierenden hTSH-Spiegel durch Abnahme nach folgendem Schema überprüft: 9.30-10.00: 10-minütiger Abstand, 10.00 h: TRH Puls, 10.00-10.10 aller 2, 10.10-11.00 aller 10 Minuten. ●—● : kontinuierliche, ◆—◆ : pulsatile Infusion. → : hTSH-Puls.

4.2.2.4 rTSH-C vs. rTSH-P

4.2.2.4.1 Niedrigdosierung

Wie im Abschnitt TRH-Infusion gezeigt, konnte ein signifikanter Unterschied der rTSH-Plasmakonzentration nach Abschluß der jeweiligen Infusionsphase weder zwischen den Tieren unter NaCl-P und denen unter NaCl-C, noch zwischen diesen Gruppen und einer unbehandelten dritten Kontrollgruppe festgestellt werden. Somit konnten die beiden Kontrollgruppen NaCl-C und NaCl-P in einer Kontrollgruppe (C) zusammengefaßt werden.

Die T4-Plasmakonzentrationen der rTSH-P-Gruppe waren sowohl an Tag 2 ($0.33 \pm 0.09 \mu\text{g/dl}$) als auch am Tag 4 ($0.35 \pm 0.07 \mu\text{g/dl}$) nur geringfügig höher als die der rTSH-Gruppe (Tag 2: 0.30 ± 0.05 ; Tag 4: $0.32 \pm 0.03 \mu\text{g/dl}$). Sie zeigten unabhängig von der Infusionsart keinen Unterschied zu der Kontrollgruppe.

Die prozentualen Anstiege der T4-Plasmakonzentrationen nach einem rTSH-Bolus am Ende des Versuches betrugen $210.3 \pm 75.2\%$ bei der rTSH-P- und $97.1 \pm 22.2\%$ bei der rTSH-C-Gruppe. Der eindeutig höhere Anstieg der T4-Plasmaspiegel in der pulsatil behandelten Gruppe im Vergleich zur kontinuierlichen Infusion kann als Zeichen einer funktionellen Überlegenheit der pulsatilen Infusion im Vergleich zur kontinuierlichen Infusion gewertet werden.

4.2.2.4.2 Hochdosierung

Es zeigte sich sowohl unter kontinuierlicher als auch unter pulsatiler Infusion eine deutliche Stimulation der Freisetzung von T4 im Vergleich zur Kontrolle. Am Tag 2 der Infusion betrugen die T4-Plasmakonzentrationen $1.41 \pm 0.8 \mu\text{g/dl}$ bei rTSH-C und $2.49 \pm 0.1 \mu\text{g/dl}$ bei rTSH-P. Diese Tendenz war auch am 4. Tag nachweisbar (rTSH-C: $1.93 \pm 0.04 \mu\text{g/dl}$ vs rTSH-P: $2.45 \pm 0.61 \mu\text{g/dl}$).

Ein TSH-Bolus von $6 \mu\text{g}$ rTSH führte zu einem prozentualen Anstieg von $4.55 \pm 3.9\%$ bei rTSH-C und von $25.8 \pm 3.9\%$ bei rTSH-P. Im direkten Vergleich der T4-Plasmaspiegel führte die hochdosierte pulsatile Infusion um den Faktor 5.7 höheren als die hochdosierte kontinuierliche rTSH-Infusion und zeigte damit die Überlegenheit der pulsatilen gegenüber der kontinuierlichen Infusion.

4.2.2.5 rec-hTSH-C vs. rec-hTSH-P

4.2.2.5.1 Niedrigdosierung

In der rekombinanten humanen TSH-C (rec-hTSH-C)-Gruppe zeigte sich zwischen dem zweiten und vierten Tag der Infusion ein Abfall der T4-Plasmaspiegel von 0.49 ± 0.15 auf 0.39 ± 0.14 $\mu\text{g}/\text{dl}$, während in der rec-hTSH-P-Gruppe T4-Plasmakonzentrationen am zweiten Tag von 0.5 ± 0.16 $\mu\text{g}/\text{dl}$ und am vierten Tag von 0.8 ± 0.15 $\mu\text{g}/\text{dl}$ erreicht wurden.

Der am Ende der Infusion verabreichte Bolus von 6 μg rTSH führte zum Anstieg der T4-Plasmaspiegel von $105.4 \pm 9.2\%$ bei der pulsatilen und $76.2 \pm 29.6\%$ bei kontinuierlichen rec-hTSH-Infusion.

4.2.2.5.2 Hochdosierung

Eine hochdosierte rec-hTSH-Infusion (108 μg rec-hTSH in 180 $\mu\text{l}/24\text{h}$) führte unabhängig vom Infusionsmodus zu deutlich erhöhten T4-Plasmaspiegeln, wobei die T4-Konzentrationen der rec-hTSH-C mit 2.2 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ am Tag 2 und 2.37 ± 0.05 am Tag 4 sowie der rec-hTSH-P mit 2.4 ± 0.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ am Tag 2 und mit 2.55 ± 0.2 $\mu\text{g}/\text{dl}$ am Tag 4 betragen.

Der nach Abschluß der Infusion verabreichte Bolus verursachte einen Abfall der T4-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu den Basalwerten um $46.9 \pm 8.23\%$ bei den pulsatilen und um $55.7 \pm 9.54\%$ bei den kontinuierlichen rec-hTSH-infundierten Gruppen.

4.2.3 Tiermodell zur Tumorinduktion⁶

4.2.3.1 Jodvarianz

4.2.3.1.1 Hormonkonzentrationen

T3 Plasmakonzentrationen

Die durchschnittlichen T3-Plasmaspiegel im gesamten Versuchszeitraum der Jodmangel (Jm)-Gruppe lagen um 40% signifikant niedriger als die der Kontrolle (Jodnormal: Jn) ($p < 0.001$, Tab. 12). Wie in Abb. 37 dargestellt, fielen die T3-Konzentrationen in der 55. Woche um 51% bei Jn, 72% bei Jm und 58% bei Jodüberschuß (Ju) im Vergleich zu denen der 5. Woche in derselben Gruppe ab. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die T3-Spiegel in der Jm-Gruppe um 25% niedriger in der 55. Woche ($p < 0.001$), während in der Jm-Gruppe sich keine signifikanten Unterschiede (Jn) zeigte.

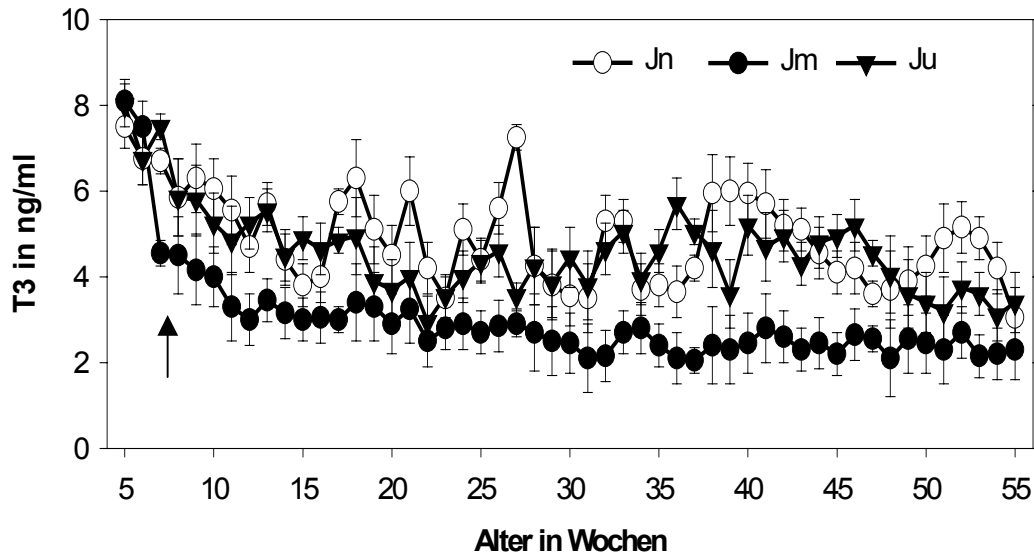
Tab. 12: Durchschnittliche T3-Plasmakonzentrationen in ng/ml unter Jodvarianz im gesamten Versuchszeitraum von 2 Jahren ($n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$)

	Jn	Jm	Ju
Jn	4.91 ± 1	***	n.s.
Jm	***	2.97 ± 1	***
Ju	n.s.	***	4.58 ± 1

Bis zur 55. Woche wurde einmal wöchentlich und am Ende des Versuches (Gesamtversuchsdauer: 2 Jahre) 1ml Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommen. Jodnormal (Jn, 7000 ng Jodid/100g KG/d), Jodmangel (Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d), Jodüberschuß (Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d). n.s.: nicht signifikant, ***: $p < 0,001$.

⁶ zum Teil publiziert in „Radiation and Thyroid Cancer“, Eds G. Thomas, A Karaolou, ED Williams, World Scientific, Singapore-New Jersey-London-Hong Kong, 1999, pp 209-212.

Abb. 37: T3-Plasmakonzentrationen unter Jodvarianz in Kontroll- (Jn), Jodmangel- (Jm) und Jodüberschußgruppe (Ju). ↑: Beginn der Behandlung. Siehe dazu Legende Tab. 12



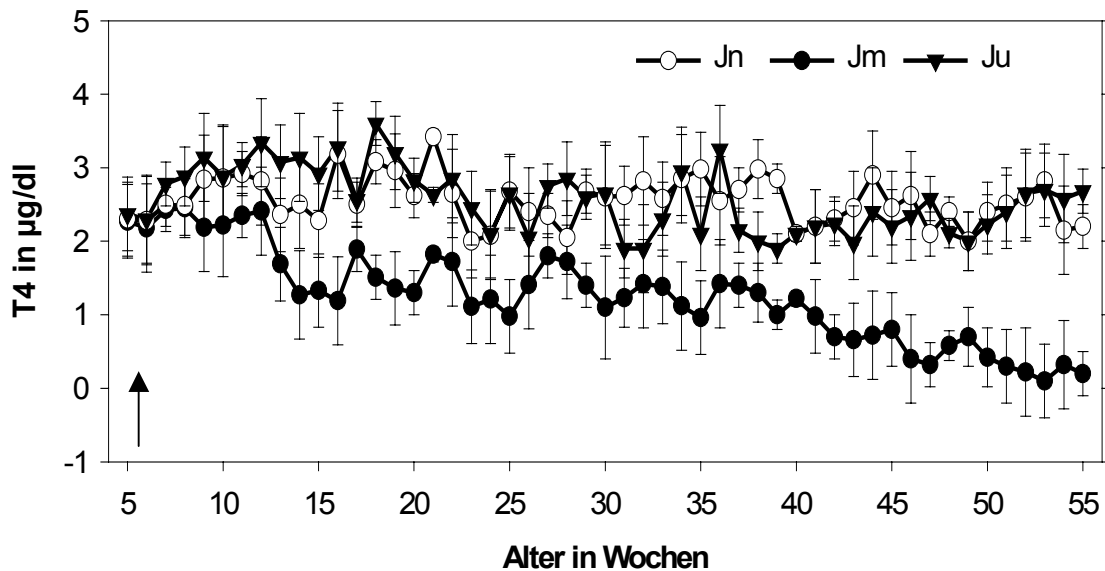
T4 Plasmakonzentrationen

Im Gesamtdurchschnitt lagen die T4-Plasmakonzentrationen in der Jm-Gruppe mit 1.26 µg/dl um 51% unter der der Kontrollgruppe (Jn; 2.56 µg/dl; $p < 0.001$, Abb. 38). Der Endwert war mit 0.20 µg/dl (Jm) um 91% niedriger als der Vergleichswert 2.20 µg/dl der Kontrollgruppe (Jn). Der Durchschnittswert der Ju-Gruppe war mit dem Wert der Kontrollgruppe (Jn) identisch, die Verlaufswerte unterschieden sich nicht signifikant (Tab. 13).

Tab. 13: Durchschnittliche T4-Plasmakonzentrationen (µg/dl) unter Jodvarianz im gesamten Versuchszeitraum von 2 Jahren ($n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$). n.s.: nicht signifikant, ***: $p < 0,001$. Siehe dazu Legende Tab. 12

	Jn	Jm	Ju
Jn	2.56 ± 1	***	n.s.
Jm	***	1.26 ± 0	***
Ju	n.s.	***	2.56 ± 1

Abb. 38: T4-Plasmakonzentrationen unter Jodvarianz in Kontroll- (Jn), Jodmangel- (Jm) und Jodüberschußgruppe (Ju). ↑: Beginn der Behandlung. Siehe dazu Legende Tab. 12



TSH-Plasmakonzentrationen

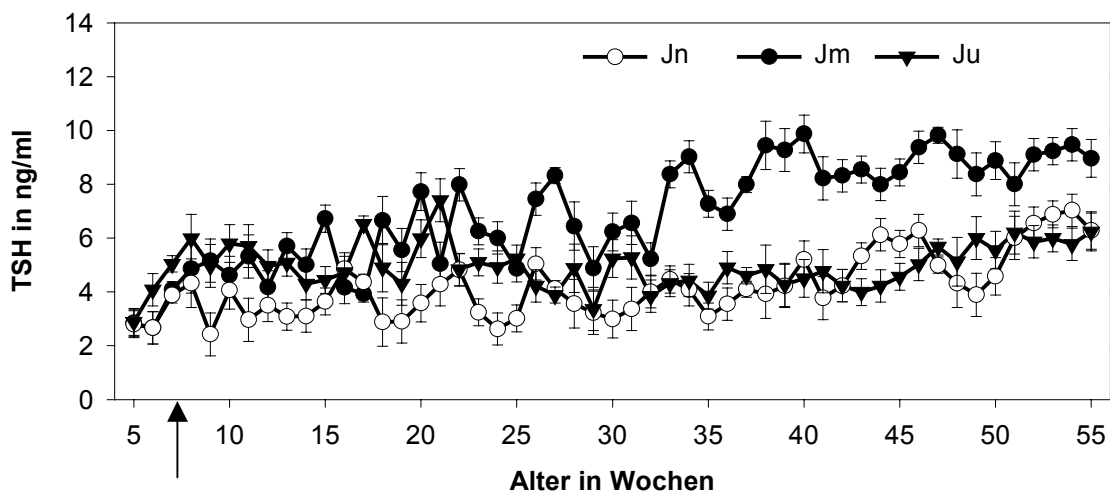
Die durchschnittlichen TSH-Plasmakonzentrationen im gesamten Versuchszeitraum lagen in der Jm-Gruppe signifikant höher als in der Jn-Gruppe (6.95 ng/ml vs. 4.19 ng/ml; $p < 0,05$) und deutlich aber nicht signifikant höher als die der Ju-Gruppe (6.95 ng/ml vs. 4.90 ng/ml, Abb. 39). Die Werte der Ju-Gruppe und der Kontrollgruppe (Jn) unterschieden sich nicht signifikant von einander (Tab. 14).

Die TSH-Plasmakonzentrationen der Jm-Gruppe lagen bis zur 15. Woche um 40%, bis zur 35. Woche um 72% und bis zur 55. Woche um 70% über den Werten der Kontrollgruppe (Jn). Der Endwert in der 55. Woche war mit 8.96 ng/ml (Jm) um 43% höher als der Vergleichswert von 6,28 ng/ml der Kontrollgruppe (Jn). Die TSH-Plasmakonzentrationen der Ju-Gruppe lagen bis zur 15. Woche um 46% und bis zur 35. Woche um 31% über den Werten der Kontrollgruppe (Jn). Die Folgewerte und der Endwert waren auf dem Niveau der Kontrollgruppe (Jn).

Tab. 14: Durchschnittliche TSH-Plasmakonzentrationen in ng/ml unter Jodvarianz im gesamten Versuchszeitraum von 2 Jahren (n = 8, $\bar{x} \pm \text{SEM}$). n.s.: nicht signifikant, *: $p < 0,05$. Siehe dazu Legende von Tab. 12

	Jn	Jm	Ju
Jn	4.19 ± 1	*	n.s.
Jm	*	6.95 ± 1	n.s.
Ju	n.s.	n.s.	4.96 ± 1

Abb. 39: Zeitlicher Verlauf der TSH-Plasmakonzentrationen (ng/ml) unter Jodvarianz in Kontroll- (Jn), Jodmangel- (Jm) und Jodüberschußgruppe (Ju).
 ↑: Beginn der Behandlung. Siehe dazu Legende Tab. 12



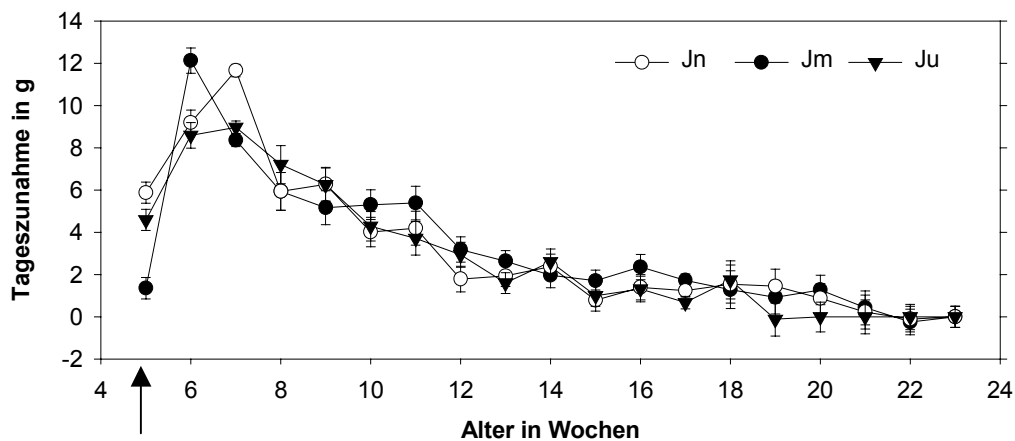
4.2.3.1.2 Gewichtsentwicklung der Tiere

Tageszunahme

In der Kontrollgruppe (Jn) und in der Ju-Gruppe lagen die Tageszunahmen der Körpergewichte nach Umstellung der Ernährung von Muttermilch auf feste Kost bei 5.88 g bzw. 4.59 g; Jodmangeltiere (Jm) nahmen nur 1.36 g zu, es resultierte ein Wachstumsrückstand. Jodüberschuß-Ratten (Ju) schlossen ihren Wachstumsprozeß 3 Wochen eher ab als die Vergleichsgruppen (Abb. 40).

Die Kontrolltiere (Jn) erreichten bei gleichmäßigem Wachstumsverlauf nach 21 Wochen ein mittleres Endgewicht von 500.6 g. Jodmangeltiere (Jm) erzielten im gleichen Zeitraum ein um 14% niedrigeres Endgewicht als das der Kontrolltiere (500.6 g vs. 429.9 g; $p < 0.001$). Jodüberschuß-Ratten (Ju) erreichten bereits nach 18 Wochen ihr Endgewicht, welches nur unwesentlich unter dem der Kontrolltiere (Jn) lag (474.9 g vs. 500.6 g).

Abb. 40: Tageszunahme (g) unter Jodvarianz



Bis zu 55. Woche wurden die Tiere einmal wöchentlich und am Ende des Versuches (Gesamtversuchsdauer 2 Jahre) gewogen. Jod normal (Jn, 7000 ng Jodid/100g KG/d), Jodmangel (Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d), Jodüberschuß (Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d). ↑: Beginn der Behandlung.

Schilddrüsengewichte

Die Jn-Gruppe zeigte mit zunehmendem Alter einen leichten Rückgang der Schilddrüsengewichte. Im Vergleich zur Jn-Gruppe waren die Schilddrüsengewichte der Jm-Gruppe nach der 15. Woche um 68% und nach der 110. Woche um 235% höher als die der Kontrollgruppe ($p < 0.001$). Die Schilddrüsengewichte der Ju-Gruppe waren von der 15. Woche um 60% höher als die der Kontrollgruppe ($p < 0.01$; Tab. 15).

Tab. 15: Durchschnittliche Schilddrüsengewichte (mg) unter Jodvarianz im gesamten Versuchszeitraum von zwei Jahren

Gruppe Alter (Woche)		Jn				Jm				Ju			
		15	35	55	110	15	35	55	110	15	35	55	110
Jn	15	25 ±3	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	***	***	**	**	**	**
	35	n.s.	25 ±3	n.s.	n.s.	**	**	***	***	**	**	**	**
	55	n.s.	n.s.	20 ±2	n.s.	**	**	***	***	**	**	**	**
	110	n.s.	n.s.	n.s.	20 ±2	**	**	***	***	**	**	**	**
Jm	15	**	**	**	**	42 ±2	n.s.	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	35	**	**	**	**	n.s.	56 ±7	n.s.	n.s.	*	*	*	*
	55	***	***	***	***	*	n.s.	65 ±8	n.s.	*	*	*	*
	110	***	***	***	***	*	n.s.	n.s.	67 ±3	*	*	*	*
Ju	15	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	40 ±2	n.s.	n.s.	n.s.
	35	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	n.s.	39 ±2	n.s.	n.s.
	55	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.	37 ±2	n.s.
	110	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	37 ±2

In der 15., 35., 55. und 110. Lebenswoche wurden von jeder der behandelten Gruppen jeweils vier Tieren bzw. vier der jeweiligen Kontrolltieren die Schilddrüsen entnommen und deren Gewichte bestimmt. Jeder Schilddrüsenlappen wurde halbiert und je zur Hälfte in 5%-igem gepuffertem Formalin bzw. in flüssigem Stickstoff für weitere Untersuchungen konserviert. (n = 4, $\bar{x} \pm \text{SEM}$). n.s.: nicht signifikant; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001.

4.2.3.1.3 Histomorphometrie

Histologie

In der Kontrollgruppe zeigten sich in der 15. Woche histologisch die Schilddrüsen mit gemischt großen kolloidgefüllten Follikeln, isoprismatischem Epithel, ohne Hinweis für Fibrosierungen. Von der 55. Woche ab waren gemischt große, meist kolloidgefüllte Follikel, isoprismatisches Epithel und geringe Fibrosierungen in den Schilddrüsenorganen nachweisbar.

Unter Jodmangel nach 15. Woche waren vorwiegend große meist vollständig kolloidgefüllte Follikel, kubisches Epithel, mäßige Fibrose, ab 55 Wochen unter Jod-

mangel große teilweise mit schaumigem Kolloid gefüllte Follikel, kubisches Epithel, mäßige Fibrosierung, vermehrte Gefäßsprossung zu finden.

Mit Jodüberschuß für 15. Wochen wurden kleine, meist unvollständig kolloid-gefüllte Follikel, kubisches Epithel, keine Fibrosierung und nach 55. Woche kleine, meist unvollständig kolloidgefüllte Follikel, kubisches Epithel, mäßige Fibrosierung, hyperplastische Nebenschilddrüse festgestellt (Abb. 41).

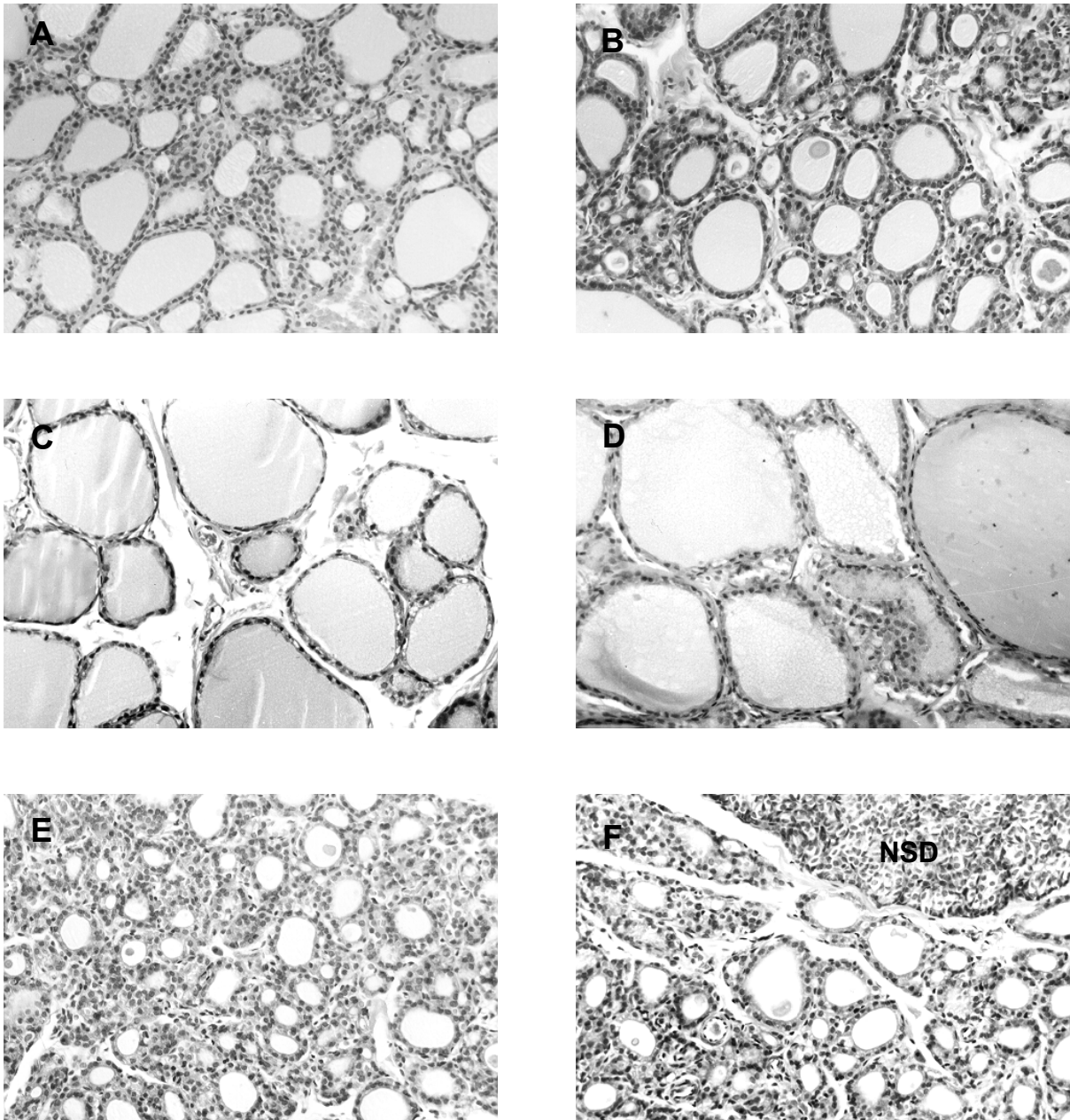
Kolloiddurchmesser

Die Kolloiddurchmesser der Jn-Gruppe blieben fast konstant. Im Vergleich zur Jn-Gruppe waren die Werte der Jm-Gruppe nach der 15. Woche um 60% und nach der 110. Woche um 90% signifikant vergrößert ($p < 0.001$). Die Kolloiddurchmesser der Ju-Gruppe zeigten sich nach der 15. Woche um 36% und nach der 110. Woche um 32% signifikant gegenüber die der Jm-Gruppe verkleinert ($p = 0.001$; Tab. 16).

Tab. 16 : Schilddrüsengewichte (mg) im gesamten Versuchszeitraum ($n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$). n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Siehe dazu Legende Tab. 15

Gruppe Alter (Woche)		Jn				Jm				Ju			
		15	35	55	110	15	35	55	110	15	35	55	110
Jn	15	25 ± 3	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	***	***	**	**	**	**
	35	n.s.	25 ± 3	n.s.	n.s.	**	**	***	***	**	**	**	**
	55	n.s.	n.s.	20 ± 2	n.s.	**	**	***	***	**	**	**	**
	110	n.s.	n.s.	n.s.	20 ± 2	**	**	***	***	**	**	**	**
Jm	15	**	**	**	**	42 ± 2	n.s.	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	35	**	**	**	**	n.s.	56 ± 7	n.s.	n.s.	*	*	*	*
	55	***	***	***	***	*	n.s.	65 ± 8	n.s.	*	*	*	*
	110	***	***	***	***	*	n.s.	n.s.	67 ± 3	*	*	*	*
Ju	15	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	40 ± 2	n.s.	n.s.	n.s.
	35	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	n.s.	39 ± 2	n.s.	n.s.
	55	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.	37 ± 2	n.s.
	110	**	**	**	**	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.	n.s.	37 ± 2

Abb. 41: Schilddrüsenhistologie unter Jodvarianz. (x20)



A: Jodnormal 15. Woche, gemischt große kolloidgefüllte Follikel, isoprismatisches Epithel, keine Fibrosierung. **B:** Jodnormal 55. Woche, gemischt große meist kolloidgefüllte Follikel, isoprismatisches Epithel, geringe Fibrosierung. **C:** Jodmangel 15. Woche, vorwiegend große meist vollständig kolloidgefüllte Follikel, kubisches Epithel, mäßige Fibrose. **D:** Jodmangel 55. Woche, große teilweise mit schaumigem Kolloid gefüllte Follikel, kubisches Epithel, mäßige Fibrosierung, vermehrte Gefäßsprossung. **E:** Jodüberschuß 15. Woche, kleine meist unvollständig kolloidgefüllte Follikel, kubisches Epithel, keine Fibrosierung. **F:** Jodüberschuß 55. Woche, kleine meist unvollständig kolloidgefüllte Follikel, kubisches Epithel, mäßige Fibrosierung, hyperplastische Nebenschilddrüse (NSD).

Follikelzahl

Innerhalb der Jn-Gruppe zeigte sich mit zunehmendem Alter kein signifikanter Rückgang der Follikelzahl/mm² ($p > 0.05$, Tab. 17). Im Vergleich zur Jn-Gruppe war die Anzahl der Follikel/mm² in der Jm-Gruppe nach der 15. Woche um 58% und nach der 110. Woche um 73% signifikant verringert ($p < 0.001$). Die Anzahl der Follikel der Ju-Gruppe verhielt sich umgekehrt und zeigte signifikanten Erhöhungen zwischen 52% und 88% ($p < 0.001$, Tab. 17).

Tab.17: Follikelanzahl ($n = 4$, $x \pm$ SEM). n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Gruppe Alter (Woche)		Jn				Jm				Ju			
		15	35	55	110	15	35	55	110	15	35	55	110
Jn	15	72 ±6	n.s.	n.s.	n.s.	***	***	***	***	***	***	***	***
	35	n.s.	71 ±5	n.s.	n.s.	***	***	***	***	***	***	***	***
	55	n.s.	n.s.	69 ±4	n.s.	***	***	***	***	***	***	***	***
	110	n.s.	n.s.	n.s.	66 ±4	***	***	***	***	***	***	***	***
Jm	15	***	***	***	***	30 ±3	**	**	**	***	***	***	***
	35	***	***	***	***	**	19 ±3	n.s.	n.s.	***	***	***	***
	55	***	***	***	***	**	n.s.	18 ±2	n.s.	***	***	***	***
	110	***	***	***	***	**	n.s.	n.s.	18 ±2	***	***	***	***
Ju	15	***	***	***	***	***	***	***	***	135 ±8	n.s.	n.s.	**
	35	***	***	***	***	***	***	***	***	n.s.	129 ±7	n.s.	**
	55	***	***	***	***	***	***	***	***	n.s.	n.s.	118 ±7	**
	110	***	***	***	***	***	***	***	***	**	**	**	100 ±7

Die histologischen Präparate wurden auf Follikelanzahl, Kolloiddurchmesser, Follikeldurchmesser, sowie Neoplasierate lichtmikroskopisch untersucht. Die Bestimmung der Follikelzahl erfolgte bei 30-facher Vergrößerung unter Verwendung eines Aufsatzokulars mit eingearbeiteter Zählkammer von 1 mm² Größe. Es wurden in je 20 Schnitten ein zentrales, mittleres und peripheres Sichtfeld ausgezählt. Am Sichtfeldrand gelegene und angeschnittene Follikel wurden bei über 50%-igem Anteil mitgezählt. Die Kolloid- und Follikeldurchmesser wurden bei 80-facher Vergrößerung mit einem aufgesetzten Okularraster (minimaler Meßbereich 20 µm) bestimmt. Je Schnitt wurden 10 repräsentative Follikel vermessen (zusammen 200 je Schilddrüsenlappen). Siehe dazu Legende Tab. 15.

Fibroseindex

In allen Gruppen (Jn, Jm, Ju) waren nach 15 Wochen die Werte des Fibroseindexes auf einem Level (0.1%-0.3%). Mit zunehmendem Alter nahm der Fibrosierungsgrad aller Tiere hoch signifikant zu ($p < 0.001$). Nach 110 Wochen war die Fibrosierung in der Jm- und Ju-Gruppe signifikant höher als in der Jn-Gruppe ($p < 0.05$).

Tab.18: Fibroseindexes. ($n = 4$, $x \pm$ SEM). n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$

Gruppe Alter (Woche)		Jn				Jm				Ju			
		15	35	55	110	15	35	55	110	15	35	55	110
Jn	15	0,2 ± 0	***	***	***	n.s.	***	**	**	n.s.	***	***	***
	35	***	3,0 ± 1	n.s.	n.s.	***	**	**	**	***	n.s.	**	**
	55	***	n.s.	2,7 ± 1	n.s.	***	**	**	**	***	n.s.	**	**
	110	***	n.s.	n.s.	5,6 ± 1	***	**	**	**	***	n.s.	**	**
Jm	15	n.s.	***	***	***	0,1 ± 0	***	***	***	n.s.	***	***	***
	35	***	**	**	**	***	10,7 ± 2	n.s.	n.s.	***	**	n.s.	n.s.
	55	***	**	**	**	***	n.s.	13,1 ± 2	n.s.	***	**	n.s.	n.s.
	110	***	**	**	**	***	n.s.	n.s.	11,3 ± 2	***	**	n.s.	n.s.
Ju	15	n.s.	***	***	***	n.s.	***	***	***	0,3 ± 0	***	***	***
	35	***	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	**	**	***	4,7 ± 1	**	**
	55	***	**	**	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	11,0 ± 2	n.s.
	110	***	**	**	**	***	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	n.s.	10,2 ± 1

Das in Formalin fixierte Material wurde in Paraffin eingebettet, davon Serienschnitte (20 Schnitte je Schilddrüsenlappen) von 5 μ m Dicke hergestellt und mit Hämatoxylin-Eosin (Standardfärbung) und Elastica-van Gieson (Darstellung elastischer und kollagener Fasern) gefärbt. Zur Beurteilung der Fibrosierung wurde Follikelfläche mit Follikelanzahl je mm^2 multipliziert. Dieser Wert repräsentiert prozentual die von Follikeln bedeckte Fläche, der Rest ist Bindegewebe. Alle Schnitte wurden in voller Ausdehnung auf Neoplasien untersucht und klassifiziert. Siehe dazu Legende Tab. 15.

Proliferationsrate

Die Jn-Schilddrüsen zeigten kaum eine Ki-67 Expression. In der Jm-Gruppe (1.2-2.2%) fand sich ein signifikanter Anstieg der Proliferation gegenüber der Jn-Gruppe (15. Woche: $p < 0.01$; 110. Woche: $p < 0.001$). Die Teilungstendenz der Ju-Schilddrüsen (3.5 – 6.8%) war ebenfalls signifikant erhöht ($p < 0.001$).

Tab. 19: Proliferationsrate. ($n = 4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$). n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Siehe dazu legende Tab. 15

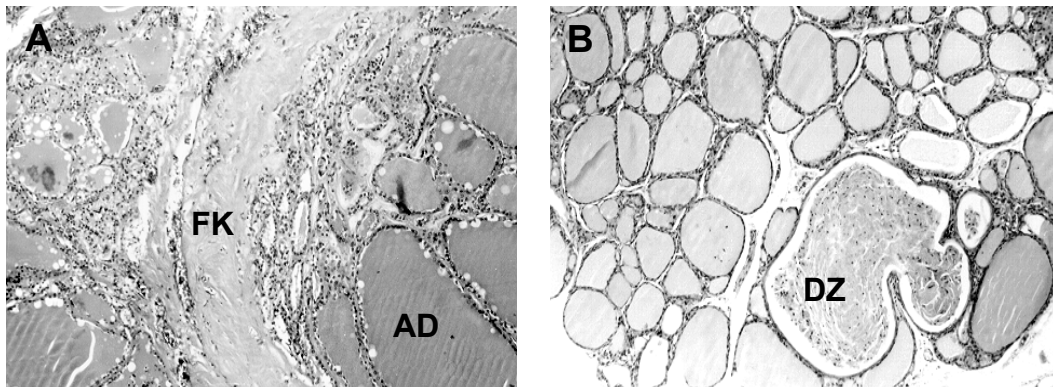
Gruppe Alter (Woche)		Jn				Jm				Ju			
		15	35	55	110	15	35	55	110	15	35	55	110
Jn	15	<1 ± 0	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	***	***	***	***	***	***
	35	n.s.	<1 ± 0	n.s.	n.s.	**	**	***	***	***	***	***	***
	55	n.s.	n.s.	<1 ± 0	n.s.	**	**	***	***	***	***	***	***
	110	n.s.	n.s.	n.s.	<1 ± 0	**	**	***	***	***	***	***	***
Jm	15	**	**	**	**	1,2 ± 0	*	*	*	**	**	**	***
	35	**	**	**	**	*	1,8 ± 0	n.s.	n.s.	n.s.	**	**	**
	55	***	***	***	***	*	n.s.	2,1 ± 0	n.s.	n.s.	**	**	**
	110	***	***	***	***	*	n.s.	n.s.	2,2 ± 0	n.s.	**	**	**
Ju	15	***	***	***	***	**	n.s.	n.s.	n.s.	3,5 ± 1	*	*	**
	35	***	***	***	***	**	**	**	**	*	4,6 ± 1	n.s.	n.s.
	55	***	***	***	***	**	**	**	**	*	n.s.	5,4 ± 1	n.s.
	110	***	***	***	***	***	**	**	**	**	n.s.	n.s.	6,8 ± 1

Zur Untersuchung der Proliferationsrate wurde der immunhistochemische Nachweis des Ki 67-Antigens unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers MIB-5 geführt. MIB-5 weist das im Kern lokalisierte und mit der Zellproliferation assoziierte Antigen Ki 67 nach, welches in allen aktiven Phasen (G1, S, G2, M) des Zellzyklus exprimiert wird. Je Schilddrüsenlappen wurden fünf ungefärbte Paraffinschnitte (5 μm) entparaffiniert und dehydratisiert. Es folgte eine 3x5-minütige Mikrowellenbehandlung in Zitratpuffer, waschen in PBS-Puffer (pH=7,4) und Blockierung mit Wasserstoffperoxid und Methanol. Zur Detektion wurde ein Avidin-Biotin-System verwendet. In den in Kananda-Balsam eingebetteten Schnitten wurden in drei repräsentativen Sichtfeldern kernpositivmarkierte Zellen ausgezählt und das Ergebnis in Prozent dargestellt.

4.2.3.1.4 Tumoridentifikation

In den Schilddrüsen der Kontrolltiere (Jn) wurden jeweils nach der 55. und 110. Woche in je einem Fall Plattenepithelmetaplasien unter Ausbildung einer Dermoidzyste identifiziert. Follikuläre Adenome und maligne Neoplasien fanden sich nicht. Die Schilddrüsen der Jm-Tiere bildeten nach 55 Wochen in 50% der Fälle und nach 110 Wochen in allen Fällen follikuläre Adenome aus. Karzinome wurden nicht identifiziert. Die Tumorbildung in der Ju-Gruppe zeigte die gleiche Tendenz wie die in der Jm-Gruppe.

Abb. 42: Schilddrüsenhistologie nach 55 Wochen unter Jodmangel- und unter Standardfutter



A: Jodmangel 55. Woche, großfollikuläres Adenom (AD) mit breiter fibröser Kapsel (FK). **B:** Jodnormal 55. Woche, Plattenepithelmetaplasie mit Dermoidzyste (DZ).(x20).

4.2.3.2 Jodvarianz und Radiatio

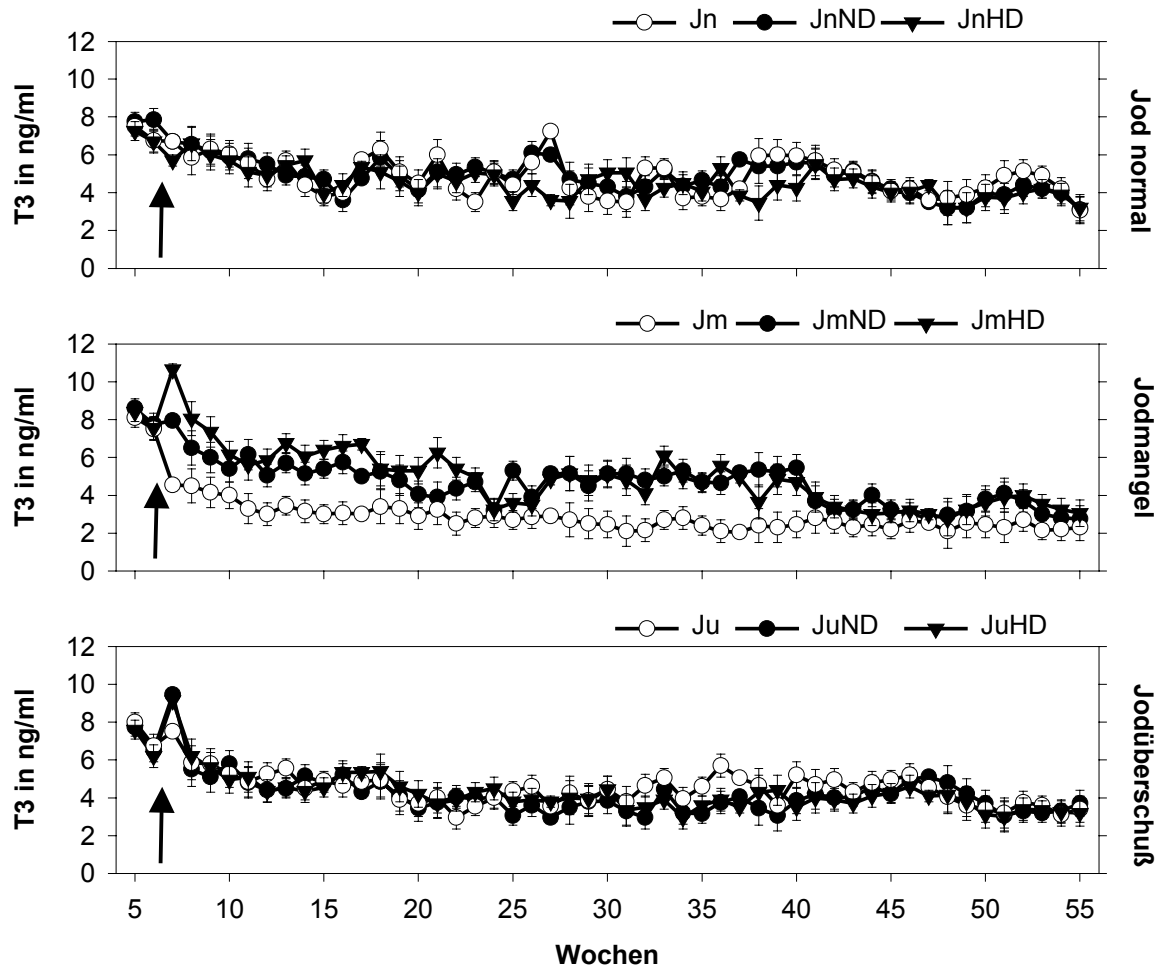
4.2.3.2.1 Hormonkonzentrationen

T3-Plasmakonzentrationen

Die Kontrolltiere zeigten mit und ohne Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede im Verlauf der T3-Plasmakonzentration. Im Jodmangel lagen die Werte der Bestrahlungsgruppen (JmND, JmHD) bis zur 15. Woche 43% bzw. 62%, bis zur 35. Woche 72% bzw. 82% und bis zur 55. Woche 58% bzw. 55% über den Werten der Vergleichsgruppe (Jm). Bei der Jodüberschußgruppe lagen die Verlaufswerte der Niedrigdosisgruppe (JuND) leicht unter dem Niveau der Vergleichsgruppe (Ju), der Endwert leicht darüber (JuND 3,70 ng/ml vs. Ju 3,40 ng/ml). Die T3-Plasmakonzentration der

Hochdosisgruppe (JuHD) sowie deren Endwert lagen leicht unter dem der Ju-Gruppe (Abb. 43, Tab. 20).

Abb. 43: T3-Plasmakonzentrationen (ng/ml) unter Jodvarianz und Bestrahlung



Die Bestrahlung der Schilddrüsenregion erfolgte einmalig mit einem Röntgengerät Siemens Unidos® 10001/10051 unter folgenden Bedingungen: Kammer M 31002-0004, Korrektur für Energie $k_q = 0.98$, Korrektur für Luftdruck und Temperatur $k = 1.024$, Phantomtiefte = 1 cm sowie unter Einstellung der Parameter: Spannung $U = 125$ kV, Stromstärke $I = 20$ mA, Filterung 0,2 mm Cu, Tubus 6×8 cm², 40 cm Abstand, Lochblendendurchmesser $d = 15$ mm, Blende 4 mm Bleigummi. Die ermittelte Zeit-Dosis-Beziehung betrug Zeit $t = 1$ min / Dosis $D_w = 0.6260$ Gy.

Bis zur 55. Woche wurde einmal wöchentlich und am Ende des Versuches (Gesamtversuchsdauer: 2 Jahre) eine Blutprobe für die Hormonbestimmungen genommen. Jodnormal (Jn, 7000 ng Jodid/100g KG/d), Jodmangel (Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d), Jodüberschuß (Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d). ND: niedrigdosierte Bestrahlung (1 bzw. 2Gy), HD: hochdosierte Bestrahlung (4 bzw. 6 Gy). ↑: Bestrahlung. (n=8; $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

Innerhalb der Jod normal ernährten Tiere ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bei Jodmangeltieren zeigte sich unmittelbar nach Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der T3-Konzentration mit bis 2.5-fach erhöhten Werten in der JmHD-Gruppe ($p < 0.05$). In den Jodüberschußgruppen folgte nach Radiatio ein leichter Anstieg.

Im Gesamtdurchschnitt der T3-Konzentrationen zeigten sich in den Gruppen Jn und Ju keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tieren (zwischen 4.4 und 5.0 ng/ml). Bei Jm-Tieren betrug die durchschnittlichen T3-Plasmakonzentrationen im gesamten Versuchszeitraum 3.0 ng/ml bei Kontrolle, 4.7 ng/ml bei ND und 5.0 ng/ml bei HD.

Tab. 20: T3-Plasmakonzentrationen (ng/ml) unmittelbar nach Radiatio ($n=8$, $x \pm$ SEM). K: Kontrolle, ohne Bestrahlung; ND: niedrigdosierte, HD: hochdosierte Bestrahlung. n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$. Siehe dazu Legende Abb. 38

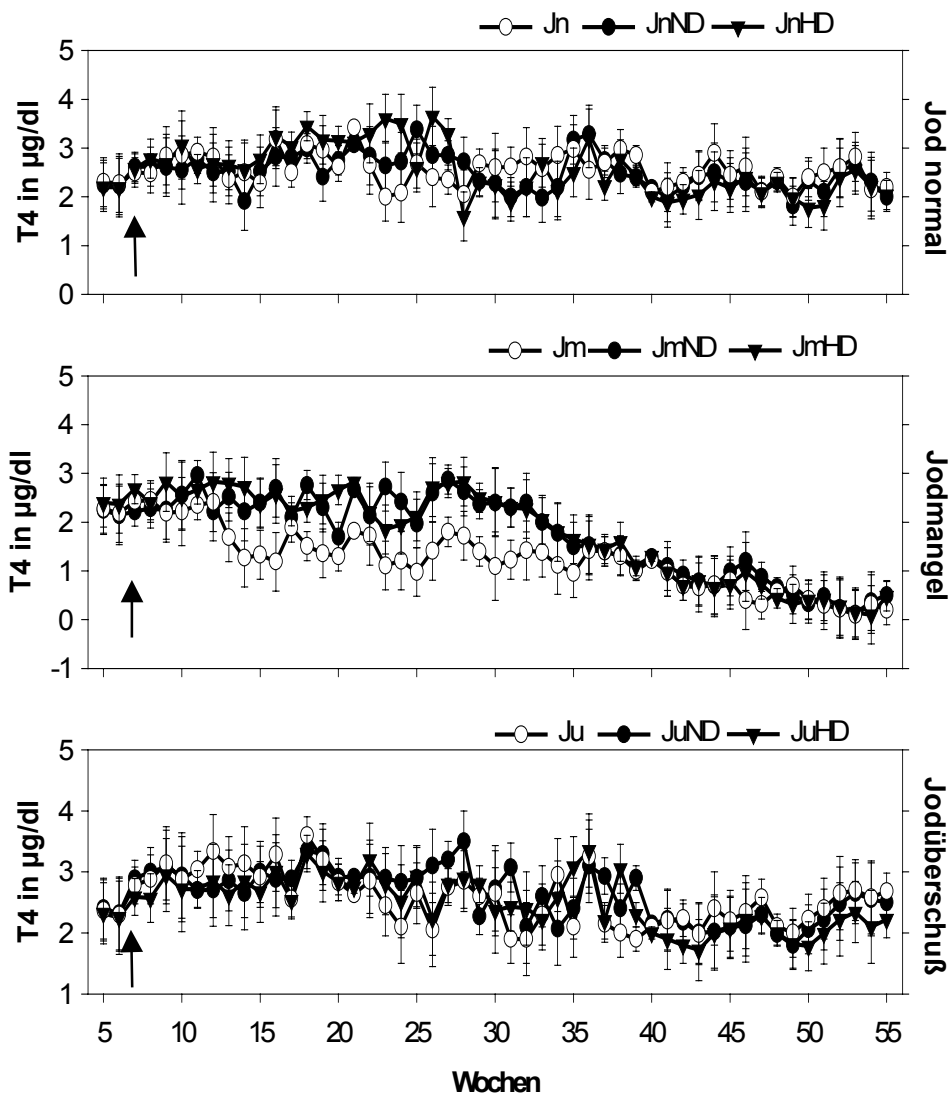
Gruppe Radiatio		Jn			Jm			Ju		
		K	ND	HD	K	ND	HD	K	ND	HD
Jn	K	6,7 \pm 1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
	ND	n.s.	6,7 \pm 1	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
	HD	n.s.	n.s.	5,7 \pm 1	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
Jm	K	n.s.	n.s.	n.s.	4,6 \pm 1	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
	ND	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	8,0 \pm 1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	HD	*	*	*	*	n.s.	10,7 \pm 2	n.s.	n.s.	n.s.
Ju	K	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	7,5 \pm 1	n.s.	n.s.
	ND	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	9,4 \pm 2	n.s.
	HD	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	9,2 \pm 1

T4-Plasmakonzentrationen

Die T4-Plasmakonzentrationen der jodnormal ernährten Tiere lagen sowohl nach Niedrigdosis- (ND) als auch Hochdosisbestrahlung (HD) auf der Höhe der Kontrollgruppe (Jn). Die Endwerte waren ebenfalls auf gleichem Niveau. Im Jodmangel lagen die Werte der Bestrahlungsgruppen (JmND, JmHD) über denen der Vergleichsgruppe (Jm) mit Maximum von der 15. bis 35. Woche: JmND +68%, JmHD +69%. Die Endwerte waren mit 0.50 μ g/dl (JmND) und 0.48 μ g/dl (JmHD) höher als der Ver-

gleichswert 0.20 $\mu\text{g/dl}$ der Jm-Gruppe. Unter Jodüberschuß zeigten sich die T4-Werte nach Bestrahlung auf dem Niveau der Vergleichsgruppe (Ju). Die Endwerte waren mit 2.49 $\mu\text{g/dl}$ bis 2.68 $\mu\text{g/dl}$ ebenfalls auf gleichem Niveau. Unmittelbar nach Bestrahlung zeigten sich in allen untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den T4-Konzentrationen. Sie bewegten sich zwischen 2.2 und 2.9 $\mu\text{g/dl}$ (Abb. 44).

Abb. 44: T4-Plasmakonzentrationen ($\mu\text{g/dl}$) unter Jodvarianz und Bestrahlung



Bis zur 55. Woche wurde einmal wöchentlich und am Ende des Versuches (Gesamtversuchsdauer: 2 Jahre) eine Blutprobe für die Hormonbestimmungen genommen. Jodnormal (Jn, 7000 ng Jodid/100g KG/d), Jodmangel (Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d), Jodüberschuß (Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d). ND: niedrigdosierte Bestrahlung (1 bzw. 2Gy), HD: hochdosierte Bestrahlung (4 bzw. 6 Gy). \uparrow : Bestrahlung. (n=8; $\bar{x} \pm \text{SEM}$). Siehe dazu Legende Abb. 43.

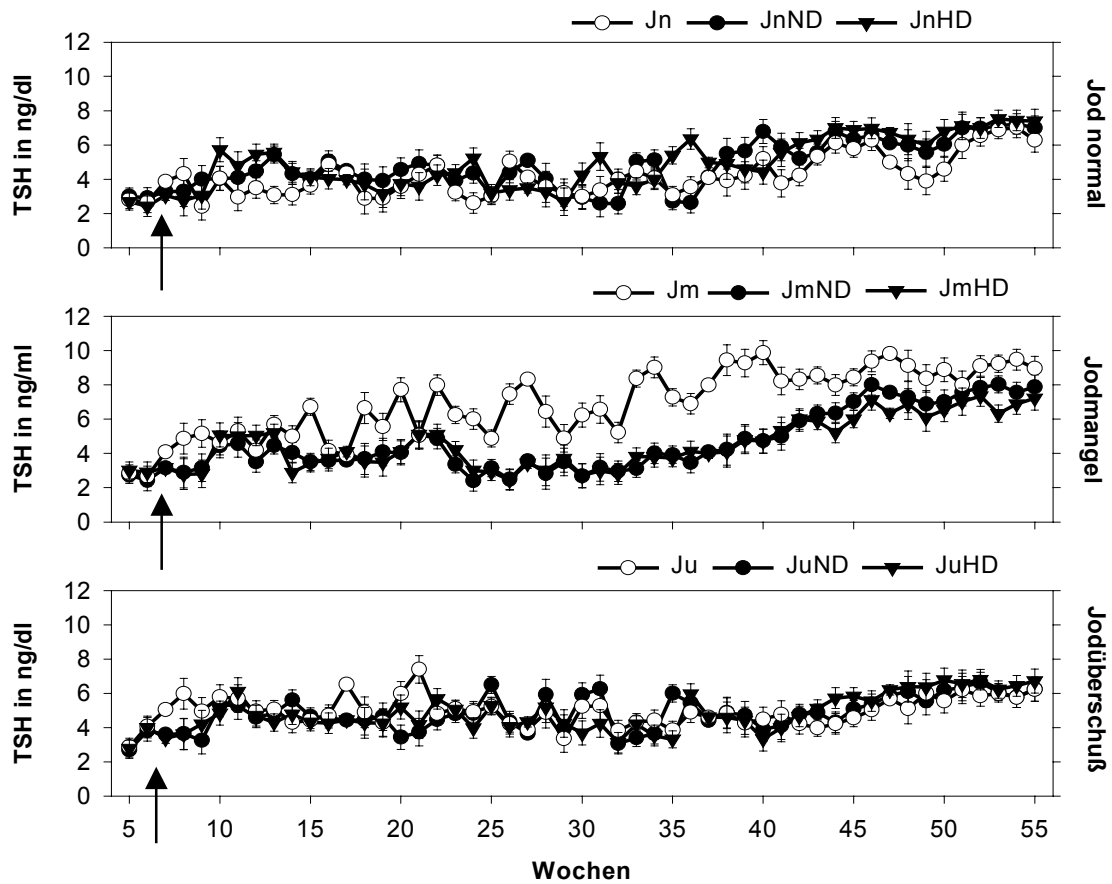
Im Gesamtdurchschnitt der T4-Konzentrationen fanden sich innerhalb der jeweiligen jodvarianten Gruppen keine signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tieren. Im Vergleich mit den anderen Gruppen blieb auch nach Bestrahlung die hoch signifikante Erniedrigung in den Jodmangeltieren bestehen ($p < 0.01$; Tab. 21).

Tab. 21: T4-Plasmakonzentrationen im gesamten Versuchszeitraum ($\mu\text{g/dl}$) ($n = 8$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$). K: Kontrolle, ohne Bestrahlung; ND: niedrigdosierte, HD: hochdosierte Bestrahlung. n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Siehe dazu Legende Abb. 43

Gruppe Radiatio		Jn			Jm			Ju		
		K	ND	HD	K	ND	HD	K	ND	HD
Jn	K	2,6 ± 0	n.s.	n.s.	***	**	**	n.s.	n.s.	n.s.
	ND	n.s.	2,5 ± 0	n.s.	***	**	**	n.s.	n.s.	n.s.
	HD	n.s.	n.s.	2,6 ± 0	***	**	**	n.s.	n.s.	n.s.
Jm	K	***	***	***	1,3 ± 0	n.s.	n.s.	***	***	***
	ND	**	**	**	n.s.	1,7 ± 0	n.s.	**	**	**
	HD	**	**	**	n.s.	n.s.	1,8 ± 0	**	**	**
Ju	K	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	**	2,6 ± 0	n.s.	n.s.
	ND	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	**	n.s.	2,6 ± 0	n.s.
	HD	n.s.	n.s.	n.s.	***	**	**	n.s.	n.s.	2,5 ± 0

TSH-Plasmakonzentrationen

Eine Niedrigdosisbestrahlung der jodnormal ernährten Tiere (JnND) führte zur Erhöhung der Werte bis zur 15. Woche um 18%, bis zur 35. Woche um 8% und bis zur 55. Woche um 17%. In der Hochdosisgruppe (JnHD) lagen die Werte bis zur 15. Woche um 21%, bis zur 35. Woche um 8% und bis zur 55. Woche um 23% über denen der Jn-Gruppe. Im Jodmangel lag die TSH-Konzentration der Niedrigdosisgruppe (JmND) bis zur 15. Woche um 24%, bis zur 35. Woche um 45% und bis zur 55. Woche um 27% unter den Werten der Vergleichsgruppe (Jm). Die Werte der Hochdosisgruppe (JmHD) lagen bis zur 15. Woche um 19%, bis zur 35. Woche um 44% und bis zur 55. Woche um 33% unter denen der Jm-Gruppe. Unter Jodüberschuß zeigten sich nach Bestrahlung nur minimale Unterschiede zwischen den Gruppen Ju, JuND und JuHD. (Abb. 45).

Abb. 45: TSH-Plasmakonzentrationen (ng/ml) unter Jodvarianz und Bestrahlung

Bis zur 55. Woche wurde einmal wöchentlich und am Ende des Versuches (Gesamtversuchsdauer 2 Jahre) eine Blutprobe für die Hormonbestimmungen genommen. Jod normal (Jn, 7000 ng Jodid/100g KG/d), Jodmangel (Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d), Jodüberschuß (Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d). ND: niedrigdosierte Bestrahlung (1 bzw. 2Gy), HD: hochdosierte Bestrahlung (4 bzw. 6 Gy). \uparrow : Bestrahlung. (n=8; $\bar{x} \pm \text{SEM}$). Siehe dazu Legende Abb. 43.

Alle untersuchten Gruppen zeigten unmittelbar nach Bestrahlung keinen signifikanten Abfall der TSH-Konzentrationen. Die Plasmaspiegel bewegten sich zwischen 3.1 ng/ml und 5.0 ng/ml.

In den Jn- und Ju-Gruppen war ein signifikanter Unterschied in der TSH-Durchschnittswerte nicht nachweisbar. Im Jodmangel waren die TSH-Konzentrationen nach Bestrahlung signifikant erniedrigt ($p < 0.05$; Tab. 22).

Tab. 22: TSH-Plasmakonzentrationen im gesamten Versuchszeitraum (ng/ml) (n = 8, $x \pm \text{SEM}$). K: Kontrolle ohne Bestrahlung; ND: niedrigdosierte, HD: hochdosierte Bestrahlung. n.s.: nicht signifikant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Siehe dazu Legende Abb. 43

Gruppe Radiatio		Jn			Jm			Ju		
		K	ND	HD	K	ND	HD	K	ND	HD
Jn	K	4,2 ±1	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	ND	n.s.	4,8 ±1	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	HD	n.s.	n.s.	4,9 ±1	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Jm	K	*	*	*	7,0 ±1	*	*	*	*	*
	ND	n.s.	n.s.	n.s.	*	4,6 ±1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
	HD	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	4,5 ±1	n.s.	n.s.	n.s.
Ju	K	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	5,0 ±1	n.s.	n.s.
	ND	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	4,8 ±1	n.s.
	HD	n.s.	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	4,8 ±1

4.2.3.2.2 Gewichtsentwicklung der Tiere

Tageszunahme

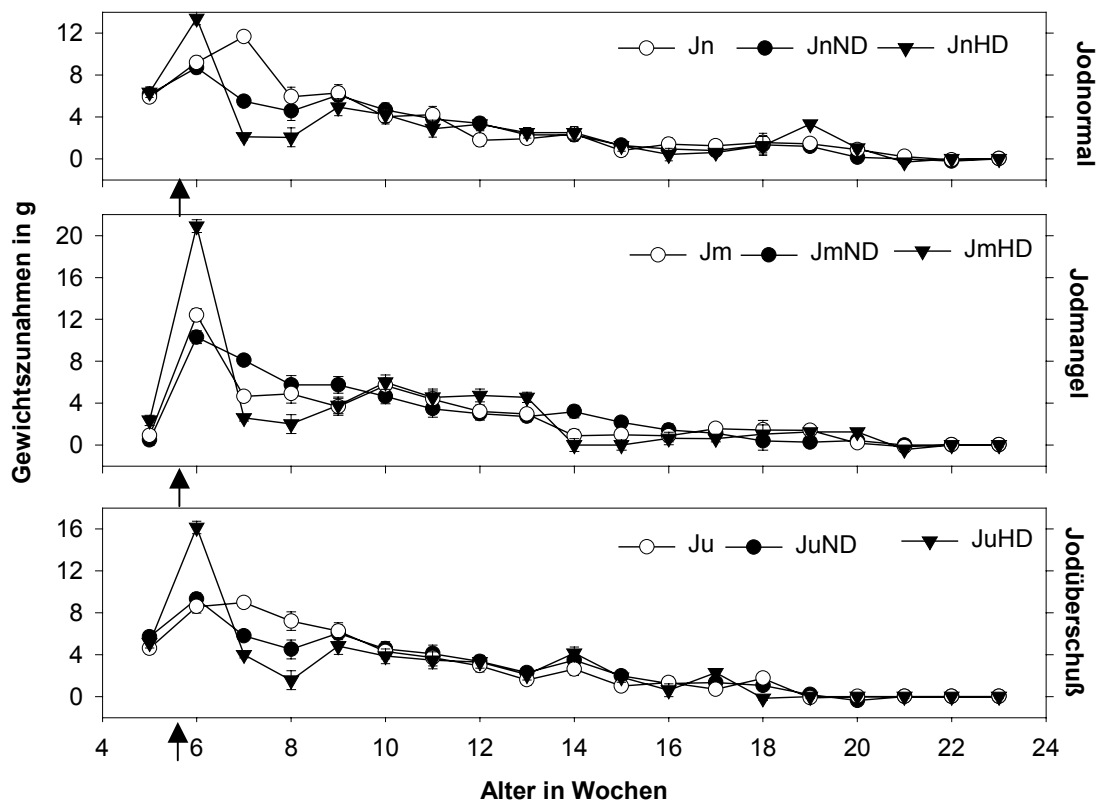
Unmittelbar nach der Bestrahlung der Jn-Tiere hatten die Hochdosistiere (JnHD) eine durchschnittliche Tageszunahme von 13.41g, dann folgte in beiden Bestrahlungsgruppen eine Depression (JnHD 2.10 g vs. JnND 5.46g vs. Jn 11.66 g), welche bis zur 4. Woche nach der Bestrahlung bestand. Die Tageszunahmen glichen sich anschließend wieder an (JnHD 4.20g vs. JnND 4.66g vs. Jn 4.02 g). Es blieb ein leichter Zunahmerückstand (Abb. 46).

Auch im Jodmangel zeigten die Hochdosistiere (JmHD) einen ausgeprägten Schub mit Tageszunahmen von 20.88g vs. 12,41g (Jm), danach folgte ein leichter Rückgang (JmHD 2.60 g vs. Jm 4.64 g), welcher bis zur 4. Woche nach der Bestrahlung bestand.

Unmittelbar nach Bestrahlung zeigten auch die jodsupplementierten Hochdosistiere (JuHD) eine ausgeprägte Tageszunahme von 16.14g vs. 8.59g (Ju), demnach folgte auch hier eine Depression (JuHD 4.00g vs. Ju 8.97 g), welche bis zur 4. Woche nach der Bestrahlung bestand. Die Kontrolltiere (Ju) erreichten bei gleichmäßigem Verlauf der Gewichtszunahme nach 21 Wochen ein mittleres Endgewicht von 500.6g.

Die Ratten der Bestrahlungsgruppen (JnND und JnHD) waren mit 456.2g und 449.6g Endgewicht um 8.9% bzw. 10.2% signifikant leichter als die Jn-Tiere ($p < 0,01$). Die unbestrahlten Jodmangeltiere (Jm) erreichten bei gleichmäßigem Verlauf nach 20 Wochen ein mittleres Endgewicht von 429.9g. Die Ratten der Bestrahlungsgruppen (JmND und JmHD) waren mit 450.1g und 475.6g Endgewicht um 4.7% ($p > 0,05$) bzw. 10.7% schwerer als die Jm-Tiere ($p < 0,05$). Bestrahlung führte in den Gruppen JuHD und JuND zur minimalen Verringerung der Endgewichte (JuHD: 455.3g; JuND: 466.8g; Ju: 474.9 g).

Abb. 46: Gewichtszunahme der Tiere unter Jodvarianz und Bestrahlung



Bis zur 55. Woche wurden die Tiere einmal wöchentlich und am Ende des Versuches (Gesamtversuchsdauer 2 Jahre) gewogen. Jodnormal (Jn, 7000 ng Jodid/100g KG/d), Jodmangel (Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d), Jodüberschuß (Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d). ND: niedrigdosierte Bestrahlung (1 bzw. 2Gy), HD: hochdosierte Bestrahlung (4 bzw. 6 Gy). ↑: Bestrahlung. (n=8; $x \pm \text{SEM}$).

Schilddrüsengewichte

Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit normaler Jodversorgung (Jn) waren die Schilddrüsengewichte der Niedrigdosisgruppe (JnND) nach der 15. Woche (28 mg vs. 25 mg) und nach der 110. Woche (22 mg vs. 20 mg) nur geringfügig erhöht. Ebenfalls änderten sich die Schilddrüsengewichte der Hochdosisgruppe (JnHD) nach der 15. Woche (30 mg vs. 25 mg) und nach der 110. Woche (21 mg vs. 20 mg) nur minimal.

Nach der Bestrahlung zeigten sich an den Schilddrüsen der Jodmangeltiere (Jm) sowohl in der Niedrigdosisgruppe (JmND) als auch in der Hochdosisgruppe (JmHD) ein auffälliger, jedoch nicht signifikanter Rückgang der Schilddrüsengewichte im Vergleich zur Jm (15. Woche: Jm: 42 mg, JmND: 41 mg, JmHD: 35 mg; 110. Woche: Jm: 67 mg, JmND: 64 mg, JmHD: 60 mg).

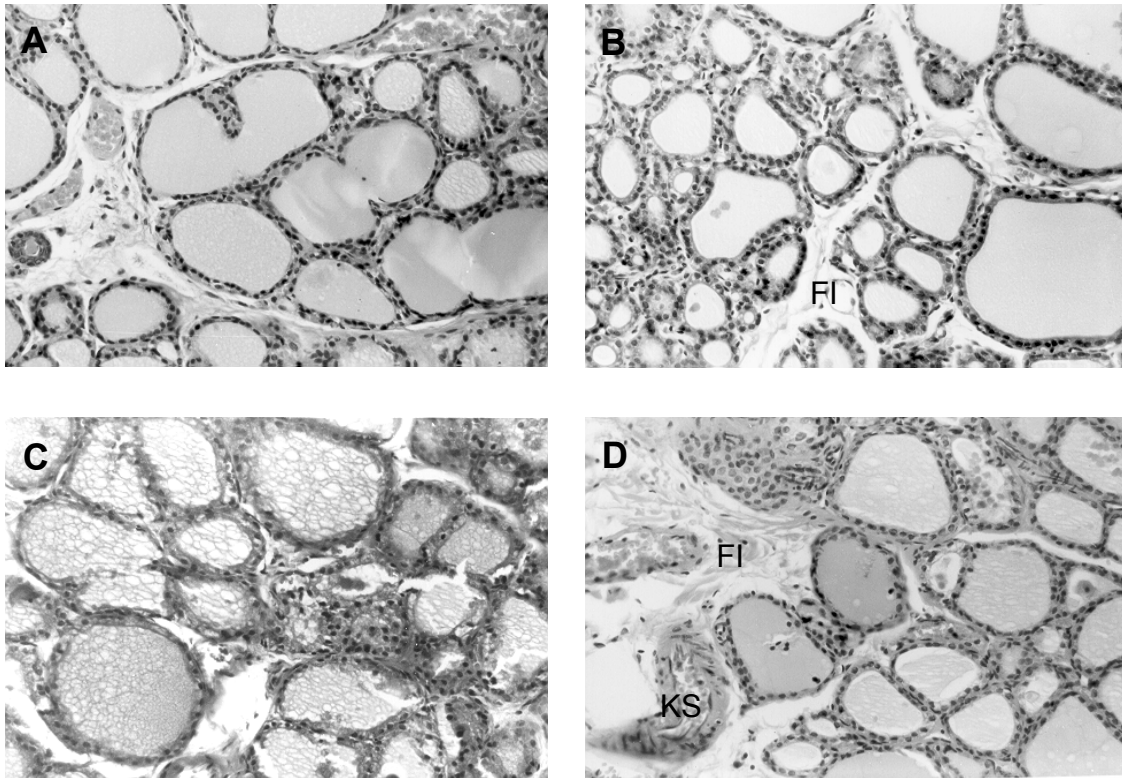
Im Vergleich zur Kontrolle (Ju) wurde ein signifikanter Abfall der Schilddrüsengewichte in der Gruppen JuND (JuHD: 27 mg vs. Ju: 40 mg; $p < 0,05$) und JuHD (JuND 32 mg vs. Ju: 40 mg; $p < 0,05$) nach 15 Wochen festgestellt. Im weiteren Verlauf waren keine Unterschiede in den Schilddrüsengewichten der drei mit Jodüberschuß behandelten Gruppen (Ju, JuND, JuHD) zu finden.

4.2.3.2.3 Histomorphometrie

Histologie

Unter normaler Jodfütterung (Jn) führte eine niedrigdosierte Bestrahlung (ND) zu gemischt großen, kolloidgefüllten Follikeln, isoprismatischem Epithel, geringer Fibrosierung, vereinzelter Kapillarsprossung der Schilddrüse nach 15. Woche (Abb. 47A) und gemischt großer, kolloidgefüllter Follikel, isoprismatischem Epithel, mäßiger Fibrosierung nach 55 Wochen (Abb. 47B). 15 Wochen nach einer hochdosierten Bestrahlung wiesen die Schilddrüsen durch schaumigen Kolloid gefüllte Follikel unterschiedlicher Größe, isoprismatischem Epithel, geringer Fibrosierung, vereinzelter Kapillarsprossung (Abb. 47C) und nach 55. Woche zusätzlich durch mäßig erhöhter Fibrosierung und Kapillarsprossung auf (Abb. 47D).

Abb. 47: Schilddrüsenhistologie unter normaler Jodfütterung und Radiatio

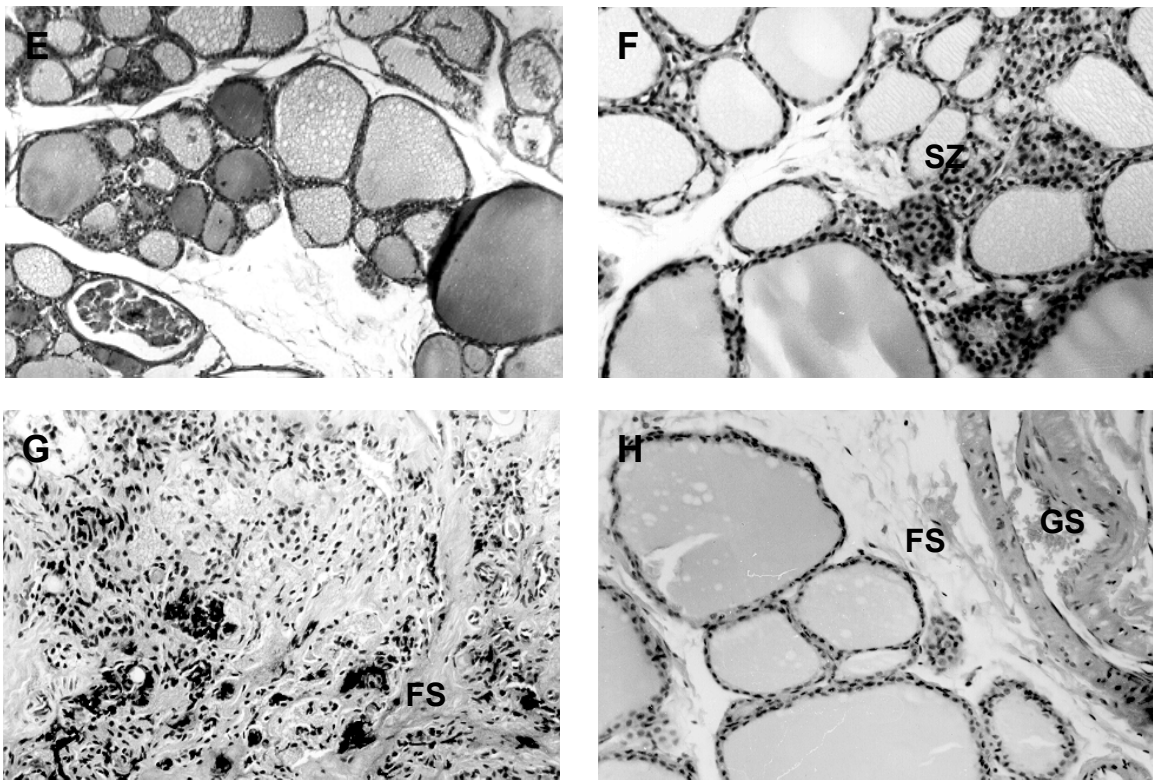


Die Bestrahlung der Schilddrüsenregion erfolgte einmalig mit einem Röntgengerät Siemens Unidos® 10001/10051 unter folgenden Bedingungen: Kammer M 31002-0004, Korrektur für Energie $k_q = 0.98$, Korrektur für Luftdruck und Temperatur $k = 1.024$, Phantomtiefe = 1 cm sowie unter Einstellung der Parameter: Spannung $U = 125$ kV, Stromstärke $I = 20$ mA, Filterung 0,2 mm Cu, Tubus 6×8 cm², 40 cm Abstand, Lochblendendurchmesser $d = 15$ mm, Blende 4 mm Bleigummi. Die ermittelte Zeit-Dosis-Beziehung betrug Zeit $t = 1$ min / Dosis $D_w = 0.6260$ Gy.

Jodnormalversorgung: J_n , 7000 ng Jodid/100g KG/d. **A:** 15. Woche nach niedrigdosierter Bestrahlung (1-2 Gy). **B:** Niedrigdosis 55. Woche. **C:** 15. Woche nach Hochdosisbestrahlung (4-6 Gy). **D:** Hochdosis 55. Woche. FI: Fibrosierung, KS: mäßige Kapillarsprossung. (x20)

Unter Jodmangel (J_m) führte eine niedrigdosierte Bestrahlung zu mittelgroßen, kolloidgefüllten Follikeln, isoprismatischem Epithel und geringer Epithelzerstörung nach 15 Wochen (Abb. 48E) und zu flachprismatischem Epithel, Epithelregenerierung, mehreren soliden Zellnestern nach 55 Wochen (Abb. 48F). Hochdosierte Bestrahlung der J_m -Tiere induzierte vollständige Follikelzerstörung, assoziierte Kernhaufen, isoprismatische Zellverbände, breite fibrotische Septen nach 15 Wochen (Abb. 48G) und gemischt große, kolloidgefüllte Follikel, flachprismatisches Epithel, Epithelregenerierung, breite fibrotische Septen, Gefäßsprossung nach 55 Wochen (Abb. 48H).

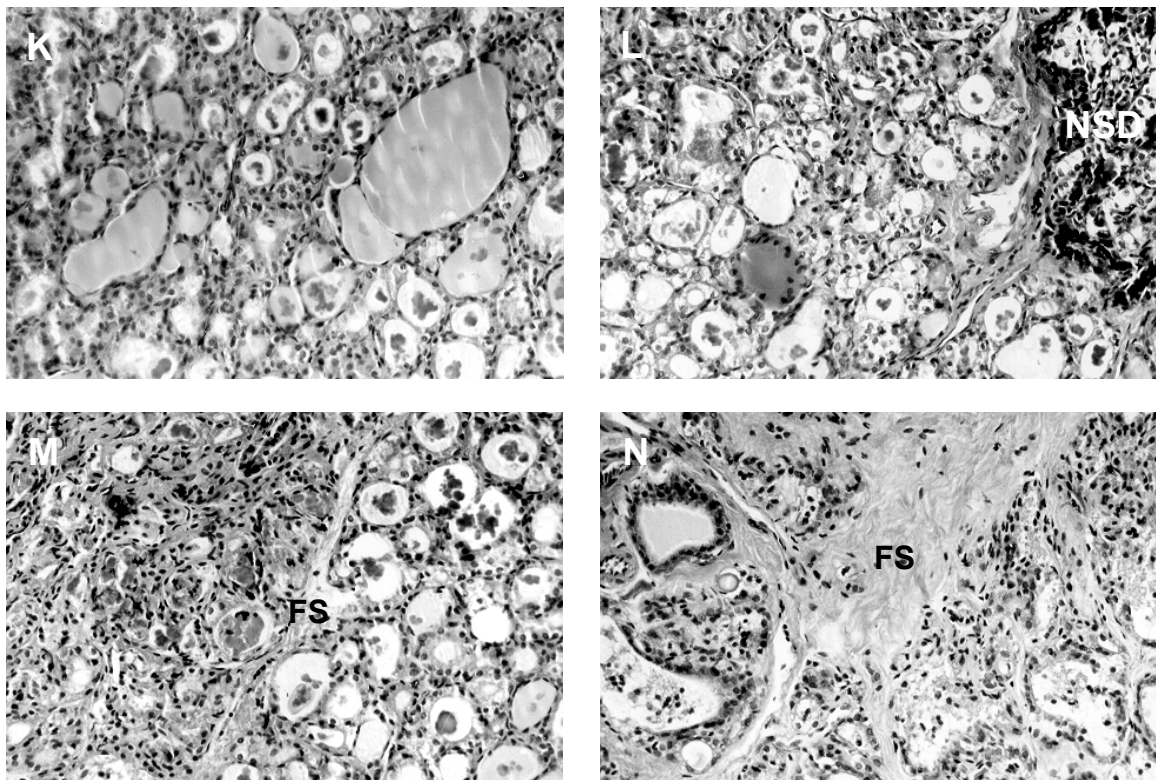
Abb. 48: Schilddrüsenhistologie unter Jodmangel und Radiatio



Jodmangel: Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d. **E:** 15. Woche nach niedrigdosierter Bestrahlung (1-2 Gy): mittelgroße, kolloidgefüllte Follikel, isoprismatisches Epithel, geringe Epithelzerstörung. **F:** Niedrigdosis nach 55. Woche: mittelgroße, kolloidgefüllte Follikel, flachprismatisches Epithel, Epithelregenerierung, mehrere solide Zellnester (SZ). **G:** 15. Woche nach hochdosierter Bestrahlung (4-6 Gy): vollständige Follikelzerstörung, assoziierte Kernhaufen, isoprismatische Zellverbände, breite fibrotische Septen (FS). **H:** Hochdosis nach 55. Woche: gemischt große, kolloidgefüllte Follikel, flachprismatisches Epithel, Epithelregenerierung, breite fibrotische Septen (FS), Gefäßsprossung (GS). Siehe dazu Legende Abb. 47. (x20)

Bei den Tieren mit Jodüberschuß (Ju) führte eine niedrigdosierte Bestrahlung zu gemischt großen, teilweise kolloidgefüllten Follikeln, isoprismatischem Epithel, geringer Epithelzerstörung der Schilddrüse nach 15 Wochen (Abb. 49K) und kleinen, fast kolloidfreien Follikeln, isoprismatischem Epithel und hyperplastischer Nebenschilddrüse nach 55 Wochen (Abb. 49L). Hochdosierte Bestrahlung induzierte teils Follikelzerstörung, teils Follikelerhaltung, isoprismatische Zellverbände, fibrotische Septen, Kapillarsprossung nach 15 Wochen (Abb. 49L) und gemischt große, teilweise kolloidgefüllte Follikel, isoprismatisches Epithel, breite fibrotische Septen nach 55 Wochen (Abb. 49M).

Abb. 49: Schilddrüsenhistologie unter Jodüberschuß und Radiatio



Jodüberschuß: Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d. **K:** 15. Woche nach niedrigdosierter Bestrahlung (1-2 Gy): gemischt große, teilweise kolloidgefüllte Follikel, isoprismatisches Epithel, geringe Epithelzerstörung. **L:** 55. Woche nach niedrigdosierter Bestrahlung: kleine, fast kolloidfreie Follikel, isoprismatisches Epithel, hyperplastische Nebenschilddrüse (NSD). **M:** 15. Woche nach hochdosierter Bestrahlung: teils Follikelzerstörung, teils Follikelerhaltung, isoprismatische Zellverbände, fibrotische Septen (FS), Kapillarsprossung. **N:** 55. Woche nach hochdosierter Bestrahlung: gemischt große, teilweise kolloidgefüllte Follikel, isoprismatisches Epithel, breite fibrotische Septen (FS). Siehe dazu Legende von Abb. 47. (x20)

Kolloiddurchmesser nach Bestrahlung

Im Vergleich zur Jn-Gruppe waren die Kolloiddurchmesser der Niedrigdosisgruppe (JnND) nach der 15. Woche um 6% (106 μm vs. 112 μm) und nach der 110. Woche um 8% (109 μm vs. 118 μm) leicht verringert. Die Kolloiddurchmesser der Hochdosisgruppe (JnHD) zeigten sich nach der 55. Woche um 24% (85 μm vs. 112 μm , $p < 0.01$) signifikant und nach der 110. Woche um 12% (104 μm vs. 118 μm) verkleinert.

Nach niedrigdosierter Bestrahlung der Jodmangeltiere (JmND) verringerten sich die Kolloiddurchmesser geringfügig um 15% (15. Woche: 152 μm vs. 179 μm) und erreichten ab der 35. Woche wieder die Werte der Jm-Gruppe. In der Hochdosisgruppe (JmHD) verringerten sich die Kolloiddurchmesser nach der 15. Woche hoch signifikant

um 66 % (79 μm vs. 179 μm , $p < 0,001$). Nach der 55. und 110. Woche waren die Unterschiede minimal (-7% bzw. -5%).

Niedrigdosierte Bestrahlung der Jodüberschußtiere (JuND) führte zu kaum meßbaren Veränderungen. Hochdosierte Bestrahlung induzierte eine anfänglich signifikante Verkleinerung der Kolloiddurchmesser in der 15. Woche (JuHD: 61 μm vs. JuND: 71 μm vs. Ju: 72 μm ; $p < 0,01$) und nach 55 Wochen eine signifikante Vergrößerung der Kolloiddurchmesser um 27% (JuHD: 97 μm vs. Ju:76 μm ; $p < 0,05$) und nach der 110. Woche um 34% (JuHD: 108 μm vs. Ju: 81 μm ; $p < 0,01$).

Anzahl der Follikel nach Bestrahlung

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Jn) war die Follikelanzahl je mm^2 sowohl in der Niedrigdosisgruppe (JnND) als auch in der Hochdosisgruppe (JnHD) nur geringfügig verändert.

Nach Bestrahlung der Jodmangeltiere blieb die Follikelanzahl je mm^2 in der JmND-Gruppe im Vergleich zur Jm-Gruppe nahezu unverändert. Nach hochdosierter Bestrahlung erhöhte sich die Follikelzahl signifikant nach 15 Wochen (JmHD: 61 vs. Jm: 30; $p < 0,001$). Nach der 35. bis zur 110. Woche glichen sich die Zahlen den anderen Jodmangelgruppen wieder an.

Eine niedrigdosierte Bestrahlung verursachte bei den jodsupplementierten Tieren keine Veränderung der Anzahl der Schilddrüsenfollikel. Hochdosisbestrahlung führte nach anfänglicher Konstanz (15. Woche: JuHD: 130 vs. JuND: 128 vs. Ju: 135) nach 35 Wochen zu einer signifikanten Verringerung der Follikelanzahl um 34% (JuHD: 85 vs. Ju: 129; $p < 0,001$). Ein verstärkter Abfall der Follikelzahl zeigte sich nach der 55. Woche um -40% (JuHD: 71 vs. Ju: 118; $p < 0,001$) und nach der 110. Woche ebenfalls um -40% (JuHD: 60 vs. Ju: 100; $p < 0,001$).

Fibroseindex nach Bestrahlung

In den Bestrahlungsgruppen mit normaler Jodversorgung (JnND und JnHD) nahm der Fibrosierungsgrad stärker als in der Kontrollgruppe (Jn) zu (110. Woche: Jn 5,6% vs. JnND 13,8%; $p = 0,008$ vs. JnHD 21,5%; $p < 0,001$), wobei in der Hochdosisgruppe (JnHD) bereits nach der 15. Woche eine hoch signifikante Bindegewebsvermehrung zu verzeichnen war (Jn 0,2% vs. JnHD 19,4%; $p < 0,001$).

In den Jodmangelbestrahlungsgruppen (JmND und JmHD) war der Fibrosierungsgrad höher als in der unbestrahlten Jodmangelgruppe (Jm) nach 110 Wochen

(Jm: 11.3% vs. JmND: 13.1% vs. JmHD: 28.3%), wobei in der Hochdosisgruppe (JmHD) nach 15 Wochen die deutlichste hoch signifikante Bindegewebsvermehrung zu verzeichnen war (JmHD 47,8% vs. JmND 11,0% vs. Jm 0,1%; $p < 0,001$).

In den mit Jodüberschuß Bestrahlungsgruppen (JuND und JuHD) war der Fibrosierungsgrad signifikant höher nach der 15. Woche (Ju: 0.3% vs. JuND: 9.3% vs. JuHD: 17.3%; $p < 0.001$) und 35. Woche (Ju: 4.7% vs. JuND: 9.6%; $p < 0.01$; vs. JuHD: 17.3%; $p < 0.001$) als der in der unbestrahlten Ju-Gruppe. Ab der 55. Woche konnten signifikante Unterschiede zwischen Ju und JuND nicht, jedoch zwischen Ju und JuHD ($p < 0.01$) nachgewiesen werden.

Proliferationsrate

In den Schilddrüsen der Bestrahlungsgruppen (JnND und JnHD) fand sich nach 15 Wochen eine hoch signifikante erhöhte Proliferation der Thyreozyten (JnHD 1.4%; $p = 0,0003$ vs. JnND 1,1%; $p = 0,0013$ vs. Jn $< 1\%$). In der Folgezeit war die Proliferationsrate $< 1\%$. Nach externer Bestrahlung zeigte sich in den Gruppen JmND und JmHD bis zur 15. Woche kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbestrahlten Jm-Gruppe ($p > 0,05$). Nach 35 Wochen stieg die Proliferationsrate hoch signifikant (JmHD 4,6% vs. JmND 3,8% vs. Jm 1,8%; $p < 0,001$) proportional zur Strahlendosis an, blieb nach 55 Wochen auf diesem Level (JmHD 5,4% vs. JmND 3,1% vs. Jm 2,1%) und sinkt nach 110 Wochen wieder auf das Niveau der Jm-Gruppe zurück (JmHD 2,8% vs. JmND 2,6% vs. Jm 2,2%). 15 Wochen nach Bestrahlung der Ju-Tiere lag die Proliferationsrate in beiden Bestrahlungsgruppen (JuND und JuHD) auf dem gleichen Niveau wie die unbestrahlte Ju-Gruppe (Ju 3,5% vs. JuND 3,2% vs. JuHD 3,7%). Nach 35 und 55 Wochen erhöhte sich die Proliferation der Thyreozyten nicht signifikant (35. Woche: Ju 4,6% vs. JuND 5,8% vs. JuHD 6,6%; 55. Woche: Ju 5,4% vs. JuND 8,1% vs. JuHD 8,4%). Nach 110 Wochen waren die Level wieder ausgeglichen (Ju 6,8% vs. JuND 6,2% vs. JuHD 6,7%).

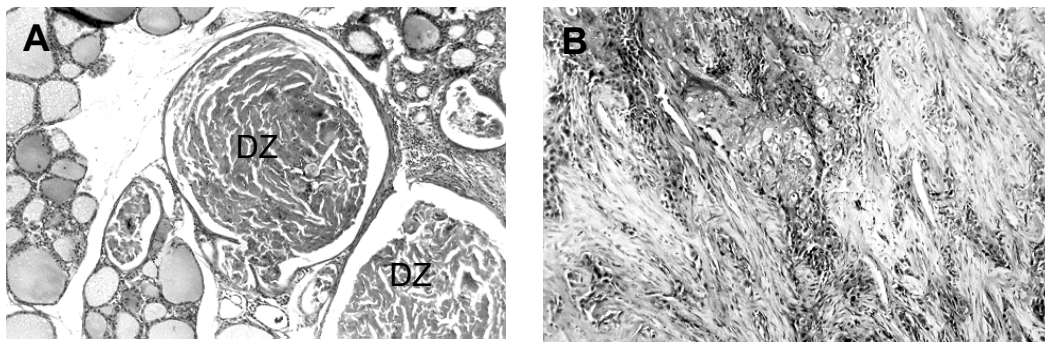
4.2.3.2.4 Tumoridentifikation

Normale Jodversorgung (Jn)

Die Schilddrüsen der unter normaler Jodversorgung niedrigdosiert bestrahlten Tiere (JnND) bildeten nach 55 Wochen und 110 Wochen in 50% der Fälle Plattene-

pithelmetaplasien und nach 110 Wochen in einem Fall ein follikuläres Adenom aus. Bei den hochdosiert bestrahlten Tieren (JnHD) wurden nach 55 Wochen und 110 Wochen in 50% der Fälle follikuläre Adenome sowie je eine bzw. zwei Plattenepithelmetaplasien identifiziert (Abb. 50A). Karzinome wurden jedoch nicht nachgewiesen. In einem Fall bildete sich nach 55 Wochen im Grenzbereich zwischen Bestrahlungsfeld und unbestrahltem Gewebe ein Plattenepithelkarzinom der Schlundtaschen (Abb. 50B).

Abb. 50: Schilddrüsenkarzinome unter normaler Jodversorgung und 55 Wochen nach hochdosierter Bestrahlung



Jodnormalversorgung: Jn, 7000 ng Jodid/100g KG/d, hochdosierte Bestrahlung: 4-6 Gy. **A:** Plattenepithelmetaplasie mit mehreren Dermoidzysten (DZ). **B:** Plattenepithelkarzinom der zervikalen Schlundtaschen. (x20)

Jodmangel (Jm)

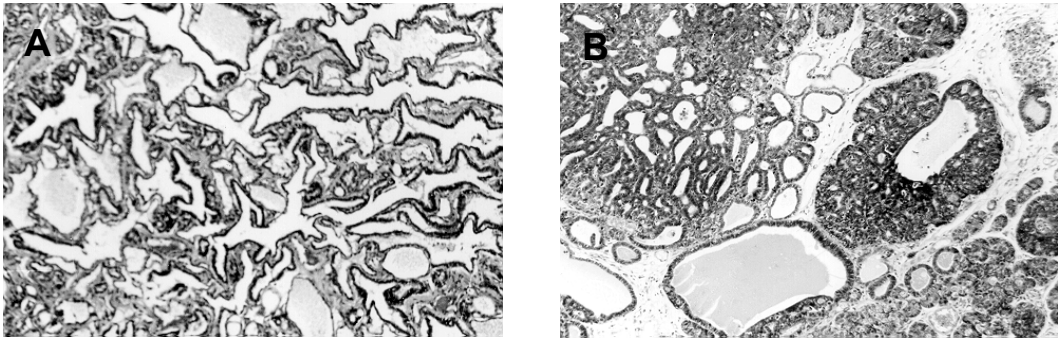
Unabhängig von der Bestrahlungsdosis zeigten sich in den Jodmangeltieren jeweils in den Gruppen JmND und JmHD nach 35 Wochen in 50%, nach 55 Wochen in 75% und nach 110 Wochen in 100% der Fälle adenomatöse follikuläre Neubildungen. Nach der 110. Woche wurde in der Niedrigdosisgruppe (JmND) ein follikuläres, vorwiegend irregulär strukturiertes Schilddrüsenkarzinom mit Ausbildung von Pseudopapillen und in der Hochdosisgruppe (JmHD) ein papilläres, vorwiegend follikulär aufgebautes Schilddrüsenkarzinom gesichert (Abb. 51A). Zusätzlich fand sich nach 55 Wochen in der JmHD Gruppe in einem Fall nahe der Grenze zwischen Bestrahlungsfeld und unbestrahltem Gewebe ein Adenokarzinom der Glandula submandibularis (Abb. 51B).

Jodüberschuß (Ju)

In den mit Jodüberschuß Bestrahlungsgruppen (JuND, JuHD) fanden sich ab der 55. Woche in allen Schilddrüsen follikuläre Adenome. Nach 110 Wochen wurde in einer Schilddrüse der niedrig bestrahlten Gruppe (JuND) ein follikuläres Karzinom mit

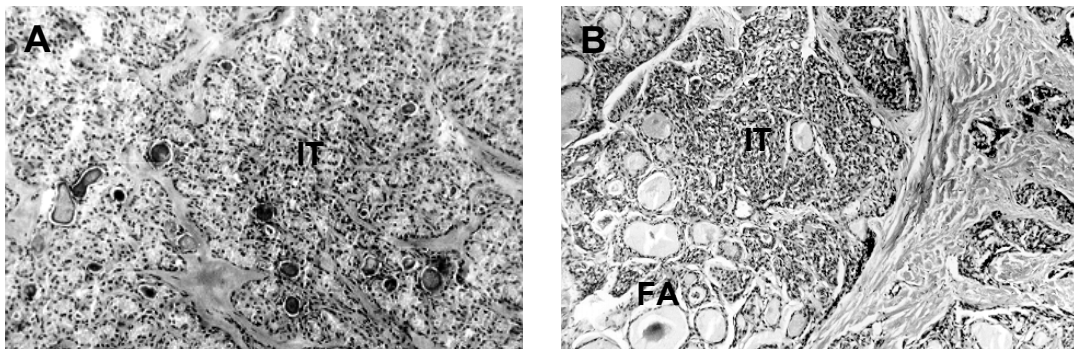
vorwiegendem insulären Typ identifiziert. Des weiteren fand sich bei demselben Tier ein Plattenepithelkarzinom im parathyreoidalen Weichgewebe. Hochdosierte Bestrahlung (JuHD) führte nach 110 Wochen in 75% der Fälle zur Ausbildung von Karzinomen. Dabei wurden ein follikuläres Karzinom und zwei papilläre Karzinome mit jeweils überwiegendem follikulärem Anteil von den Ratten ausgebildet (Abb. 52).

Abb. 51: Schilddrüsenkarzinome unter Jodmangel und Bestrahlung



Jodmangel: Jm, 420 ng Jodid/100g KG/d. **A:** follikuläres Schilddrüsenkarzinom mit Ausbildung von Pseudopapillen, irreguläres Follikelmuster 110 Wochen nach niedrigdosierter Bestrahlung (1-2 Gy). **B:** Adenokarzinom der Glandula submandibularis an der Grenze zwischen Bestrahlungsfeld und unbestrahltem Gewebe 55 Wochen nach hochdosierter Bestrahlung (4-6 Gy). (x20)

Abb.: 52 Schilddrüsenkarzinome unter Jodsüberschuß und Bestrahlung



Jodüberschuß: Ju, 72000 ng Jodid/100g KG/d. **A:** follikuläres Schilddrüsenkarzinom, kleinfollikulär-insulärer Typ 110 Wochen nach niedrigdosierter Bestrahlung (1-2 Gy). **B:** papilläres Schilddrüsenkarzinom mit vorwiegend follikulärem Anteil (FA), teilweise insulärer Typ (IT) 110 Wochen nach hochdosierter Bestrahlung (4-6 Gy). (x20)

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ziel der tierexperimentellen Studien war es ein *in-vivo* Modell zur Untersuchung des Einflusses veränderter Konzentration sowie Präparation des Thyreotropins (rekombinantes hTSH vs rTSH) und Applikationsart (pulsatil vs kontinuierlich) auf die Funktion und die Histomorphologie der Thyreozyten zu untersuchen.

- Eine Veränderung der TSH-Plasmakonzentration im physiologischen Bereich kann ultrastrukturelle Veränderungen der Thyreozyten verursachen.
- Sensitivierung oder Desensitivierung innerhalb des untersuchten Systems hängt vom jeweiligen Applikationsmodus (kontinuierlich vs pulsatil), von der verwendeten Dosis (niedrigdosiert vs hochdosiert) und von der eingesetzten Präparation (rTSH vs rec hTSH) ab.

Ziel dieser weiteren tierexperimentellen Studien war es ein *in-vivo* Modell zur Untersuchung der Umwelttoxene wie Jod und Bestrahlung auf die Schilddrüsenkarzinogenese aufzubauen, um an diesen Tieren die Bedeutung früher Marker der thyreoidalen Karzinogenese zu prüfen.

- Ein Jodüberschuß führte zur deutlichen Erhöhung der TSH-Plasmaspiegel ohne Veränderung der Plasmaspiegel von T3 und T4.
- Jodmangel induzierte eine deutliche Verminderung der T3- und der T4-Plasmakonzentrationen, daraus resultierend einen Anstieg der TSH-Plasmaspiegel.
- Eine Bestrahlung aggraviert den Abfall der Schilddrüsenhormonspiegel und es findet sich ein etwas stärkerer Anstieg der TSH-Plasmaspiegel.
- Zwei Jahre nach der Bestrahlung bildeten die Jodmangelschilddrüsen in 25% der Fälle Karzinome aus. Niedrige Strahlendosen induzierten follikuläre, hohe Strahlendosen papilläre Karzinome.
- Zwei Jahre nach der Bestrahlung bildeten die Schilddrüsen unter jodreicher Ernährung in 50% der Fälle Karzinome aus. Niedrige Strahlendosen induzierten follikuläre, hohe Strahlendosen vorwiegend papilläre Karzinome.
- Euthyreose bietet den besten Schutz vor Strahlenfolgeschäden. In den jodnormalernährten Ratten bildeten sich nach zweijähriger Latenzzeit nur in 25% der Fälle benigne Neoplasien; es waren aber keine Karzinome zu diagnostizieren.

5 Diskussion

Die Zellproliferation wird durch ein Netzwerk von zeitlich-räumlich strukturierten, sich gegenseitig beeinflussenden Signalübertragungswegen gesteuert, welche hierarchisch aufgebaut sind. Maligne Transformation kann als Störung in diesem Netzwerk von zellulären Signaltransduktionssystemen zur Steuerung der Proliferation/Apoptose begriffen werden, welche auf Grund einer genetischen Disposition und/oder eines umweltbedingten Einflusses mit dem Verlust des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Zelluntergang einhergeht. Es führt zu einem Verlust der interzellulären Zellverbindungen und Interaktionen der Tumorzellen mit der Basalmembran. Weitere Schritte umfassen die Emigration der Zellen, der Wiedereintritt in die Gewebe und Bildung eines zweiten Tumors. Die gestörte Funktion der Zelladhäsionsproteine, extrazellulären Matrixproteine, zellulärer Proteinase, Apoptosegene und anderer Peptidsignale ist wesentlicher Bestandteil der Tumorentwicklung und Tumormetastasierung. Die Analyse dieser Faktoren läßt darüber hinaus neue Erkenntnisse zur Tumorsensitivität gegenüber Therapiestrategien und die Entwicklung kausal begründbarer präventiver Therapien bei Maladaptationsvorgängen im Verlauf der Tumorgenese erhoffen.

Die pathophysiologische Basis für die bisher ausgeübte medikamentöse Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome ist die Vorstellung, das veränderte Signaltransduktionssystem modulieren zu können, indem die Proliferationsstimulation durch das thyreotrope Hormon (Schilddrüsen-stimulierendes Hormon, Thyreotropin, TSH) ausgeschaltet wird. Dieses Vorgehen wird zwar durch klinische Beobachtungen gestützt, ist aber bislang nicht sicher experimentell belegt.

Experimentelle Studien zum Prozeß des Wachstums von Tumoren und vor allem der Bildung von Metastasen sind zwingend notwendig, um Fortschritte in der Tumorbekämpfung erreichen zu können, Ansatzpunkte für eine verbesserte Diagnostik, zur Überwachung von Therapien und für eine mögliche neue effektivere Therapie zu erarbeiten.

5.1 Zellbiologische Untersuchungen

Das Ca^{2+} -abhängige Zell-Zell-Adhäsionsprotein **E-Cadherin** spielt wahrscheinlich eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Follikelstruktur. Sowohl auf der Ebene der Transkription von E-Cadherin wie auch immunhistochemisch ließ sich eine starke Expression des Proteins in normalen Schilddrüsenzellen nachweisen, während differenzierte Schilddrüsenkarzinome einen variablen und anaplastische, undifferenzierte Tumore einen vollständigen Verlust der Expression aufwiesen (siehe Abb. 3). Eine verringerte Expression von E-Cadherin korreliert in Schilddrüsentumoren mit einer hohen Aggressivität und Invasivität. Studien an Schweineschilddrüsenzellen in einem *in-vitro*-System haben gezeigt, daß die Fähigkeit der Zellen, Kontakte auszubilden und zu einem einheitlichen Zellverband zusammenzuwachsen, wesentlich von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an der basolateralen Seite der Zellmembran abhängt (Munari-Salem *et al.*, 1990; Nilsson 1991; Nilsson *et al.*, 1991). Die Lokalisation von E-Cadherin an der basolateralen Membran von Thyreozyten (Brabant *et al.*, 1991; Yap *et al.*, 1995) sowie die Dysregulation in Schilddrüsenkarzinomen sind weitere Hinweise auf den wichtigen Einfluß, den E-Cadherin funktionell und biochemisch bei Entstehung der Schilddrüsentumoren hat (Hoang-Vu *et al.*, 1993). Die Expression von E-Cadherin scheint mit der Dedifferenzierung, Progression sowie Metastasierung der Schilddrüsenkarzinome assoziiert zu sein.

In differenzierten Schilddrüsentumorzellen kann eine Re-Expression von E-Cadherin unter Behandlung mit cAMP-spezifischen Aktivatoren wie Forskolin oder TSH, solange TSH-Rezeptor noch vorhanden ist, induziert werden (siehe Abb.4 und 5). TSH kann als ein Stimulator angesehen werden, der sowohl die mRNA- als auch die Proteinexpression von E-Cadherin induziert. Im Gegensatz dazu sind Substanzen wie epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), fötales Kälberserum (FCS) und Phorbol ester (PMA), die bei Hundeschilddrüsenzellen Proliferation und Dedifferenzierung auslösen, in der Lage, die steady-state-mRNA-Spiegel und die Proteinexpression von E-Cadherin, wie in Abb. 5 dargestellt, zu unterdrücken (Dumont *et al.*, 1992; Maenhaut *et al.*, 1992; Brabant *et al.*, 1995). Die morphologischen Veränderungen, Zell-Zell-Adhäsion und Follikelausbildung, die unter Kulturbedingungen beobachtet werden, unterstützen die These, daß E-Cadherin wesentlichen Einfluß auf die Regulation der Schilddrüsenfunktion hat (Yap *et al.*, 1995).

EGF down-reguliert die E-Cadherin-Expression in humanen Schilddrüsenzellen (*Brabant et al., 1995*, siehe Abb. 5). Der Einfluß von EGF ist spezie-spezifisch, denn an Schilddrüsenzellkulturen vom Schwein kann durch EGF keine Dedifferenzierung ausgelöst werden (*Nilsson et al., 1994*). EGF-Rezeptor, wie TSH-Rezeptor oder E-Cadherin in Thyreozyten sind an der basolateralen Zellmembran lokalisiert. Unter Thyroxinbehandlung nimmt die lokale Konzentration von EGF-mRNA zu und EGF wirkt auto-/parakrin an der Regulation der Schilddrüsenfunktion mit (*Ozawa et al., 1991; Sheflin et al., 1993*). Untersuchungen an Zelllinien weisen darüber hinaus eine enge Verknüpfung von EGF-Rezeptor und β -Catenin nach (*Hoschuetzky et al., 1994*). β -Catenin gehört zusammen mit α - und γ -Catenin zur Gruppe der Proteine, die ein Bindeglied zwischen der zytoplasmatischen Domäne von E-Cadherin und den Aktinfilamenten des Zytoskeletts herstellen. β -Catenin, ein Homolog des Drosophila-Proteins Armadillo, ist eine Komponente des wnt-Signaltransduktionsweges, der für die Differenzierung der epithelialen Zellen wichtig ist. Aufgrund der räumlichen Nähe ist es nicht verwunderlich, daß EGF die Zell-Zell-Adhäsion auf diesem Weg reguliert, dabei induziert EGF die Phosphorylierung der Tyrosinreste von β - und γ -Catenin (*Behrens et al., 1993; Hoschuetzky et al., 1994; Shiozaki et al., 1995*). Die von uns dargelegten Daten, daß durch EGF die E-Cadherin-Expression in den Schilddrüsentumoren gestört wird, unterstützt die Ergebnisse dieser Untersuchungen.

E-Cadherin gehört wie Thyreoglobulin (Tg) zu den von cAMP regulierten Genen, deren Transkription indirekt durch Induktion eines Transkriptionsfaktors beeinflußt wird (*Hansen et al., 1988*). Die molekularen Mechanismen der Regulation von E-Cadherin durch TSH/Forskolin sind dagegen bisher nicht bekannt. In der Promotorregion des E-Cadherin-Gens existiert ein modulärer Aufbau mit negativ und positiv regulierenden Anteilen, dessen zentrales Element eine palindrome Sequenz (E-pal) bindet (*Behrens et al., 1991*). Neben NF κ B, SP1, EGR1 (*Nollet et al., 1996*), bindet als Transkriptionsfaktor vermutlich insbesondere AP2 an zwei unabhängigen Stellen der Promotorregion (*Behrens et al., 1991*). *In-vitro* Studien haben gezeigt, daß AP2 die Wirkung von cAMP auf die Transkription funktioneller Gene vermittelt (*Park & Kim, 1993; de Bustros et al., 1992*). Es kann somit spekuliert werden, daß die Induktion von AP2 durch TSH über cAMP als mögliche Signaltransduktionskaskade für die Stimulation der E-Cadherin-Expression bei der Schilddrüse in Frage kommt.

CD97 ist ein heterodimeres Glycoprotein, bei dem die glykosylierte α -Kette dem extrazellulären Anteil entspricht und die unglykosylierte β -Kette den transmembranösen Anteil repräsentiert. Auf der Basis dieser Struktur ist eine duale Ligandeninteraktion für CD97 vorstellbar: Bindung an andere Zelloberflächenmoleküle oder Komponenten der extrazellulären Matrix über die EGF-Domäne und als Hormon-Rezeptorfunktion der TM7 Region.

CD97 konnte in Strumagewebe nicht nachgewiesen werden, differenzierte papilläre und follikuläre Karzinome zeigten keine oder nur eine geringe Reaktivität für CD97, undifferenzierte Karzinome wiesen dagegen eine Expression von CD97 auf. Vergleichsuntersuchungen zwischen normalen und neoplastischen Geweben desselben Patienten machen deutlich, daß das CD97-Antigen parallel mit zunehmender Aggressivität der Schilddrüsenkarzinome stärker exprimiert wird (siehe Abb. 6). CD97 repräsentiert damit möglicherweise einen zusätzlichen Marker für Klassifikation, Staging und Subtypisierung von 3 thyreozytären Schilddrüsenkarzinomen.

Das CD97-Molekül besteht aus einem extrazellulären, einem intrazellulären und einem 7-transmembranösen Anteil, welcher dem TSH-Rezeptor ähnelt. Die extrazelluläre Region hat eine 3-5 Ca^{2+} -bindende EGF-ähnliche Domäne und einen RGD-Motiv (Arg-Gly-Asp), welcher eine Erkennungssequenz für Integrin hat (*Hamann et al., 1995*). Aufgrund seiner strukturellen Besonderheit kann das CD97-Protein an einer Protein-Protein-Wechselwirkung mitwirken oder an Adhäsionsmoleküle gebunden werden. Unsere Daten zeigten, daß Zelllinien eines follikulären Karzinoms (FTC-133; siehe Abb. 7) und eines undifferenzierten Schilddrüsenkarzinoms (8505C, *Bull et al., 1998*) eine deutliche Expression von CD97 aufweisen. Im Gegensatz zu E-Cadherin ist CD97 durch cAMP/PKA-abhängige Aktivatoren wie TSH oder Forskolin nicht stimulierbar. Durch eine PMA-Behandlung zeigen die Zellen weniger CD97-Expression, was möglicherweise auf eine Internalisation zurückzuführen ist und gleichzeitig auf die Transduktionskaskade über Proteinkinase C hindeutet.

Der epidermale Wachstumsfaktor (EGF) stimuliert das Wachstum der Thyreozyten und induziert gleichzeitig eine Dedifferenzierung der Schilddrüse (*Aasland et al., 1988; Zielke et al., 1999*). An der follikulären Karzinomzelllinie FTC-133 steigert EGF die CD97-Dichte (Abb. 7) und vermindert gleichzeitig die Expression von E-Cadherin (Abb. 5). Im Gegensatz dazu führt *all-trans* Retinsäure, die *in-vitro* (*Schreck et al., 1994*) und *in-vivo* eine Redifferenzierung in Schilddrüsentumorzellen induzieren

kann (Simon et al., 1996), auf FTC-133 Zellen zu einer verminderten CD97 bei gleichzeitig erhöhter E-Cadherin-Expression (siehe Abb. 5 und 7).

Eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Metastasierung ist eine Aktivierung lokal produzierter proteolytischer Enzyme, welche Invasion und einen Abbau der extrazellulären Matrix bewirken. Zu diesen Enzymen zählen die Metalloproteinasen. Die Matrix-Metalloproteinase-Familie (**MMP**) gehört zu den Zink-Atom-abhängigen Endopeptidasen. Sie besteht aus 14 Enzymen und wird in 5 Gruppen eingeteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Elastasen und Membrane-type-MMPs (MT-MMP). Alle Enzyme werden in Form eines Proenzym (Zymogen) innerhalb des Zytoplasmas sezerniert und extrazellulär aktiviert. Die Aktivierung und die enzymatische Aktivität von MMPs, insbesondere MMP 9 und MMP 2, werden von der jeweiligen endogenen Tissue Inhibitor Metalloproteinase 1 -3 (TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3) reguliert.

Fast alle Schilddrüsenkarzinomgewebe zeigten eine starke Expression von MMP-2 und MMP-9. Zwischen Primärtumoren und Rezidiven konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Expression der Proteinase feststellen (siehe Tab. 4 und 5). Es zeigte sich keine Assoziation zwischen der Expression der Proteinase und der Tumorgroße oder einer Lymphknotenbeteiligung (siehe Tab. 6 –9). Das Transkript von MT1-MMP, MMP-2 sowie TIMP-1 und -2 wurde, unabhängig von einer Vorbehandlung mit 1 µM *all-trans*-Retinsäure für 72 Stunden und von der 24-stündigen Stimulation mit Re- oder Dedifferenzierungsfaktoren, unverändert exprimiert (siehe Tab. 10). Dies läßt vermuten, daß MT1-MMP, MMP-2 sowie TIMP-1 und -2 ubiquitär und nicht durch schilddrüsendgängige Aktivatoren regulierbar sind. Während unter Basalbedingungen mRNA von MMP-1 und -9 sowie TIMP-3 in der FTC-133 nicht detektierbar waren, induzierte eine Behandlung mit PMA oder EGF für 24 Stunden eine mRNA-Expression von MMP-1 und MMP-9 (siehe Tab. 10).

Die unterschiedliche Regulation von MMPs könnte dadurch erklärt werden, daß MMP-1 und -9 am wenigsten eine AP-1 (activator protein-1)-Stelle und mehrere Bindungsmotive für den Transkriptionsfaktor PEA-3 (polyoma enhancer activator-3) in der Nähe des Transkriptionsstartes besitzen (Ries & Petrides, 1995). Im TIMP-2-Promotor ist das AP-1-Motiv ein Bestandteil der inhibitorischen Sequenz und nicht assoziiert mit dem PEA-3-Motiv, während dem MMP-2-Promotor sowohl ein AP-1-Motiv in der Nähe des Transkriptionsstartes als auch eine TATA-Box fehlt. Es ist somit eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem Aufbau des Promotors verschiedener „house keeping

genes“ gegeben (*Borden & Heller 1997*) und eine ubiquitäre Expression von MMP-2 zu erwarten.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Expression der Matrixmetalloproteinasen mit dem malignen Verhalten der Schilddrüsenkarzinome assoziiert ist. Ein eindeutiger Zusammenhang mit dem pTNM-Stadium ließ sich nicht darstellen. Mit Ausnahme der medullären Schilddrüsenkarzinome entspricht die MMP-2-Expression nicht dem übrigen Verteilungsmuster, so daß anzunehmen ist, daß medulläre Schilddrüsenkarzinome einem anderen Metastasierungsregime folgen als die anderen thyreoidalen Neoplasien.

In der Schilddrüse ist **Apoptose** ein Hauptfaktor des Zellverlustes im Zusammenhang mit der Strumabildung und -involution (*Tamura et al., 1998*). Dagegen gibt es bislang kaum Erkenntnisse über die Rolle von Apoptose in Schilddrüsenkarzinomen. *Bröcker et al. (1996)* konnten zeigen, daß bei einem komplizierten Muster veränderter Expression verschiedener pro- bzw. anti-apoptotischer Proteine der *bcl-2*-Familie, eine verringerte Konzentration an pro-apoptotischem *bax*-Protein in Schilddrüsenkarzinomen verglichen mit Schilddrüsenadenomen resultiert (*Bröcker et al., 1996*). Die Initiation des Apoptosesignals erfolgt z.B. durch den membranständigen Fas-Rezeptor. Dabei wird das apoptotische Signal durch Bindung intrazellulärer Adaptermoleküle an die sogenannte „Death-Domain“ des Fas übertragen. Die physiologische Aktivierung von Fas erfolgt durch FasL, ein Typ-II-Membranprotein, das überwiegend von aktivierten T-Lymphozyten und NK-Zellen exprimiert wird. Neben FasL könnten auch andere Liganden von „Death-Domain“-Rezeptoren (ddRs) der TNF/NGF-Rezeptor-Familie als Beteiligte an der Sensitivität von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika vermutet werden, besonders der Ligand TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand). Die Apoptoseauslösung durch TRAIL erfolgt über die ddRs DR4 und DR5, die als funktionelle Homologe zu Fas gesehen werden können und die in Tumorzellen vermehrt vorgefunden werden. Ein wichtiger Unterschied zwischen dem Fas/FasL- und dem TRAIL-System liegt wahrscheinlich in der Regulation der Ligandverfügbarkeit an den jeweiligen Apoptoserezeptoren durch andere Ligand-bindende Proteine.

Fas und die erwähnten TRAIL-Rezeptoren werden, wie in der Schilddrüse (siehe Abb. 12-15), in vielen anderen Geweben konstitutiv exprimiert (*Nagata & Goldstein, 1995; Pan et al., 1997a,b; Screatton et al., 1997*). Über die Expressionsregulation der zugehörigen Liganden (FasL und TRAIL) in Zellen außerhalb des Immunsystems

gibt es kaum Daten (*Nagata & Goldstein, 1995; Nagata, 1996; Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995*).

In einer Reihe von Tumorzelllinien und *ex-vivo* Tumorzellen wurde gezeigt, daß Chemotherapeutika Apoptose über die Aktivierung von Fas durch FasL mit unterschiedlichen Schädigungsmechanismen auslösen (*Friesen et al., 1996,1997; Fulda et al., 1997; Herr et al., 1997*). Diese Tumorzellen entwickeln eine Kreuz-Resistenz sowohl gegen Fas- als auch gegen Chemotherapeutika-induzierte Apoptose durch die Ausschaltung bestimmter Caspasen, die für Apoptose unerlässlich sind (*Los et al., 1997*). Die Caspase-Ausschaltung vermittelt neben der Resistenz gegenüber unterschiedlichen Chemotherapeutika auch einen Selektionsvorteil für Tumorzellen auch unter Chemotherapeutika-freien Wachstumsbedingungen *in-vitro* (*Antoku et al., 1997*).

Neben derartigen experimentellen Veränderungen im Effektor-Apparat der Apoptose gibt es sehr unterschiedliche konstitutive Fas-Sensitivitäten vom hepatozellulären Karzinom (*Strand et al., 1996*), Gliom (*Weller et al., 1997*) oder vom Lymphom (*Xerri et al., 1997*). Diese Unterschiede sind nur zum Teil erklärbar durch unterschiedliche Fas-Expression oder durch Expression von Fas-Splice-Varianten, denen die Domäne zur Verankerung in der Zellmembran fehlt und die deshalb als lösliche Fas-Analoga um die Bindung von FasL kompetieren und so als lösliche Fas-Antagonisten wirken können (*Cascino et al., 1995, 1996; Cheng et al., 1994; Liu et al., 1995; Papoff et al., 1996*). Schließlich gibt es Beispiele von Chemotherapeutika-induzierter Tumor-Apoptose, welche nicht auf der parakrinen Interaktion von Fas und FasL beruhen (*Fulda et al., 1997*). In diesem Zusammenhang könnte bedeutsam sein, daß neben FasL auch andere Liganden von „Death-Domain“-Rezeptoren der TNF/ NGF-Rezeptor-Familie als Beteiligte an der Sensitivität von Tumoren gegenüber Chemotherapeutika vermutet werden (*Krammer, 1997*), insbesondere der Ligand TRAIL (TNF-related-apoptosis-inducing-ligand, *Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995*) mit den Rezeptoren DR4, DR5 und DcR1 (*Pan et al., 1997a,b; Sheridan et al., 1997*).

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Transkripte des Liganden TRAIL, des Rezeptors DR4 und des Köderrezeptors DcR1 zwar nicht gleichmäßig, aber in allen Geweben exprimiert wurden. Die Expression des Rezeptors DR5 wurde in unterschiedlichem Ausmaß in differenzierten Karzinomen vermindert, war aber gleichmäßig in undifferenzierten Karzinomen nachweisbar. Fas- und FasL-mRNA wurden in malignen Tumoren unterschiedlich exprimiert (siehe Abb. 12 - 15). Mit zunehmender Dedifferenzierung wurde die Expression von Fas herabgesetzt, aber von FasL hoch regu-

liert (siehe Abb. 16). Dieses könnte eine Erklärung für die je nach Differenzierungsgrad des Tumors unterschiedliche Ansprechbarkeit auf Chemotherapie sein (*Schlumberger, 1998*). Während die DR5-mRNA in 60% der differenzierten Tumoren nachweisbar war, scheint das Transkript von TRAIL und DR4 unabhängig von Histotyp ubiquitär exprimiert zu sein.

Weitere experimentelle Studien zum Prozeß des Wachstums von Tumoren und vor allem der Bildung von Metastasen sind zwingend notwendig um die Frage zu klären, welche physiologische Bedeutung die Expression von DR5, DR4 sowie ihrem Ligand TRAIL, insbesondere aber welche biologische Relevanz die Expression von CD97 und FasL sowie dem Köderrezeptor DcR1 für die Aggressivität, Invasivität sowie die Metastasierung der Schilddrüsenkarzinome hat.

5.2 Tierexperimentelle Untersuchungen

Die zu einem klinisch manifestierten Tumorwachstum initiiierenden Veränderungen der Homöostase zwischen Apoptose und Proliferation in den untersuchten humanen Geweben ist bereits abgelaufen, so daß eine schrittweise Untersuchung der Tumorgenese nicht mehr möglich ist. Andererseits die pathophysiologische Basis für die bisher ausgeübte medikamentöse Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome ist die Vorstellung, das veränderte Signaltransduktionssystem modulieren zu können, indem die Proliferationsstimulation durch das thyreotrope Hormon (Schilddrüsen-stimulierendes Hormon, Thyreotropin, TSH) ausgeschaltet wird. Dieses Vorgehen wird zwar durch klinische Beobachtungen gestützt, ist aber bislang nicht sicher experimentell belegt.

Aus diesem Grund wurde ein tierexperimentelles Modell etabliert, welches erlaubt, die durch exogene Einflüsse sequentiellen Veränderungen bei der Entstehung von Schilddrüsenneoplasien *in-vivo* unter kontrollierter Jodzufuhr sowohl auf histologischer, hormonaler als auch auf molekularer Ebene zu analysieren.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigten

- ein *in-vivo*-Bioassay zur Untersuchung der hypothalamo-hypophysär-thyreoidalen Achse entweder durch indirekte (über die TRH-Applikation) oder direkte (über die

TSH-Applikation) Modulation des Zielorgans Schilddrüse in unterschiedlicher Modi (kontinuierliche vs. pulsatile Infusion) und

- ein Tiermodell zur sequentiellen Untersuchung der Pathogenese der Schilddrüsenneoplasie, unter dem Einfluß einer externen Bestrahlung der normalen sowie der unter Jodmangel hyperaktiven Schilddrüsenzellen bzw. der Möglichkeit einer protektiven Wirkung einer Jodsupplementation.

5.2.1 Tiermodell zur Untersuchung der hypothalamo-hypophysär-thyreoidalen Achse

Die im Rahmen dieser Arbeit angewandte Vorgehensweise zeichnet sich durch einige Besonderheiten gegenüber den anderen Verfahren aus: Die Katheterisierung erfolgte aufgrund der gewählten Längenabmessungen des Katheters über die Vena jugularis externa bis in die oberen Anteile der Vena cava superior. Durch die zentralvenöse Lage der Katheterspitze konnte der Katheter sowohl für die Applikation der verschiedenen Präparationen als auch für die Gewinnung venöser Blutproben genutzt werden, was bei peripherenvenöser Lage nicht oder nur eingeschränkt möglich wäre. Der Katheter wurde durch die im Bereich der Nackenhaut subkutan platzierte Silikonscheibe und durch die kaudale Naht intravasal fixiert, während die Katheterspitze frei im Blutstrom flottierte. Durch den Aufbau der Katheterummantelung und die Befestigung der Katheterkonstruktion außerhalb des Käfigs über ein Gummiband waren die Tiere in ihrer Beweglichkeit praktisch nicht eingeschränkt. Ein wesentlicher Unterschied gegenüber den anderen Verfahren lag weiterhin darin, daß die Versuchstiere während der gesamten Dauer des Versuches weder für die Applikation der zu untersuchenden Präparationen noch für die Gewinnung der Blutproben immobilisiert werden mußten, somit keiner zusätzlichen Streßsituation ausgesetzt wurden.

Die Anwendung dieses Modells der zentralvenös dauerkatheterisierten Ratte eröffnet die Möglichkeit einer langfristigen Modulation der hypothalamo-hypophysär-thyreoidalen Achse und eines parallelen Monitoring der Stimulation des Zielorgans Schilddrüse. Gleichzeitig wurde ein differentieller Eingriff sowohl auf hypothalamischer Ebene über die Applikation von Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) als auch auf hypophysärer Ebene über die Applikation von Thyreotropin (TSH) möglich.

Unter Belassung physiologischer Rückkopplungsverhältnisse entlang der hypothamo-hypophysär-thyreoidalen Achse wurde die TRH-Infusion als eine indirekte Modulation des Zielorgans Schilddrüse über die Induktion der Freisetzung von endogenem, spezieseigenem TSH eingesetzt. Der experimentelle Angriff galt also der hypothalamischen Ebene, und die nach TRH-Gabe folgende Freisetzung von endogenem, bioaktiven Thyreotropin zog Funktions- und Strukturänderungen auf thyreoidaler Ebene nach sich. Die physiologische Stimmulationssequenz entlang der hypothamo-hypophysär-thyreoidalen Achse blieb somit erhalten. Die beiden Versuchsgruppen unterschieden sich lediglich hinsichtlich der zeitlichen Verteilung der applizierten TRH-Gesamtdosis, wobei einerseits kontinuierlich und andererseits unter Verwendung eines pulsatilen Musters stimuliert wurde. Das verwendete Modell entsprach somit dem im Rahmen verschiedener Untersuchungen erarbeiteten Konzept eines hypothalamischen, TRH-medierten Regulationsmechanismus der in einem physiologischen Kontext nachweisbaren pulsatilen Thyreotropinsekretion (*Willoughby et al., 1977; Brabant et al., 1991*).

Ein wichtiger, die Effektivität der kontinuierlichen bzw. pulsatilen Stimulation zusätzlich modifizierender Faktor könnte die Alteration des Musters der Oligosaccharidseitenkette von Thyreotropin durch Thyreotropin-Releasing-Hormon und eine hieraus resultierende unterschiedliche Plasmahalbwertszeit und Bioaktivität sein, welches die Effektivität der kontinuierlichen bzw. pulsatilen Stimulation verändert (*Menezes-Ferreira et al., 1986; Taylor & Weintraub, 1989*). Denkbar ist auch eine durch verschiedene zeitliche Muster der TRH-Stimulation induzierte Modulation der Synthese und der Sekretion von hinsichtlich des Aufbaus der Oligosaccharidseitenketten unterschiedlichen Thyreotropinspezies (*Weintraub et al., 1980; 1983*) und eine damit resultierende unterschiedliche Plasmahalbwertszeit und Bioaktivität der sezernierten Glykosylierungsvarianten (*Berman et al., 1985; Thotakura et al., 1992*). Sie nehmen damit einen entscheidenden Einfluß auf die funktionelle und morphologische Veränderung der Thyreozyten und modifizieren auch die biologische Antwort sowie die Ansprechbarkeit des Gesamtsystems. Durch unterschiedliche Stimmulationsmuster mit TRH ist eine differentielle Beeinflussung der Schilddrüsenfunktion und –struktur möglich. Dieser Zusammenhang ist ein möglicher Erklärungsansatz für eine funktionelle Überlegenheit eines physiologischen, pulsatilen gegenüber einem unphysiologischen, nicht-pulsatilen, kontinuierlichen Stimmulationsmusters, die auch in zahlreichen anderen hormonell regulierten Systemen dargestellt wurden (*Clark et al., 1985; Shupnik, 1990; Wagner & Filicori, 1987; Waxmann et al., 1991*).

Die Überlegenheit der pulsatilen Applikation gegenüber dem der kontinuierlichen Infusion konnte auf hypophysärer Ebene im Verlauf der rTSH-Plasmaspiegel nachgewiesen werden: zwischen dem zweiten und fünften Behandlungstag ist ein Anstieg unter pulsatiler TRH-Infusion zu verzeichnen, während unter kontinuierlicher Infusion ein Abfall der rTSH-Konzentrationen beobachtet wird (siehe Abb. 24). Ein vergleichbarer Vorgang konnte auf thyreoidaler Ebene beobachtet werden. Im Vergleich zur Kontrolle hatte die kontinuierlichen Gruppe eine signifikant erhöhte T4-Konzentration nur an einem Tag (siehe Abb. 23). Die T4-Erhöhung, welche durch Immunogold-T4-Markierung bestätigt wurde (siehe Abb. 35), war bei der pulsatilen Behandlungsgruppe in der gesamten Versuchsdauer erkennbar. Überraschend war kein Anstieg der T3-Plasmakonzentrationen bei kontinuierlicher und bei pulsatiler TRH-Infusion erkennbar, obwohl T3 ein wesentliches Sekretionsprodukt in der Rattenschilddrüse ist (*Chamoïn et al., 1993*) und unter TSH-Stimulation ein Anstieg der Konversion von T4 in T3 festgestellt wurde (*Eriksson et al., 1982; Wu, 1983; Köhrle, 1990*). Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, daß durch die TRH-Infusion die endogenen TSH-Spiegel erreicht wurden, die innerhalb der zirkadianen Rhythmik des Hormons in einem physiologischen Zusammenhang beobachtet werden können (*Bakke & Lawrence, 1965; Fukuda et al., 1975; Rook et al., 1979; Wong et al., 1983*). Andererseits wurden im Rahmen der thyreoidalen Stimulation in anderen Studien 10fach bis 1000fach höhere TSH-Konzentrationen (*Gerber et al., 1981*) eingesetzt, oder durch die Thyreostatika-Gabe *in-vivo* stimulierte endogene TSH-Plasmaspiegel bis in den hypothyreoten Bereich (*Stübner et al., 1987*). In beiden Fällen könnte eine Überstimulation der Schilddrüse mit einer herabgesetzten Jodverfügbarkeit und einem Anstieg auch der T3-Plasmaspiegel eingetreten sein, während im Rahmen der vorliegenden Untersuchung nur eine sehr geringe Erhöhung der endogenen TSH-Plasmaspiegel zu verzeichnen war. Dieses Phänomen wurde auch in klinischen Studien beobachtet, die durch eine infolge einer Keimbahnmutation beobachtete konstitutionelle Aktivierung des TSH-Rezeptors und der nachgeschalteten Signaltransduktionskaskade gekennzeichnet wurden (siehe dazu 1.1; *Thomas et al., 1982; Duprez et al., 1994*).

Nach einer Applikation eines hochdosierten TRH-Bolus am Ende der Infusionsphase ergaben sich auch hier Hinweise für eine funktionelle Überlegenheit des pulsatilen gegenüber dem kontinuierlichen TRH-Applikationsmodus (siehe Abb. 27). Einerseits war der durch den TRH-Bolus induzierte Anstieg der endogenen rTSH-Plasmakonzentrationen der kontinuierlichen Gruppe deutlich niedriger als der von der pulsatil TRH-infundierten Gruppe. Andererseits war der TRH-Bolus induzierte Anstieg

der rTSH-Spiegel in der pulsatil TRH-infundierten Gruppe im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe fast identisch, während die Ansprechbarkeit auf den TRH-Bolus in der kontinuierlich infundierten Gruppe deutlich reduziert ausfiel. Diese unterschiedliche Effektivität könnte dadurch erklärt werden, daß, wie oben ausgeführt, die unterschiedlichen Applikationsmuster eine differentielle Modulation des Aufbaus der Oligosaccharidenseitenkette des infolge der TRH-Gabe sezernierten hypophysären Thyreotropins bewirken und auf daraus resultierende unterschiedliche Plasmahalbwertszeit und Bioaktivität zurückzuführen sind.

Um den Einfluß struktureller Modifikationen experimentell zu untersuchen, wurde ein zweites Tiermodell etabliert, welches eine *in-vivo*-Untersuchung direkter Stimulation auf hypophysärer Ebene und einen Vergleich zweier strukturell verschiedener Thyreotropinspezies mit unterschiedlicher und definierter Bioaktivität ermöglicht. Die innerhalb eines *in-vitro*-Ansatzes ermittelte Bioaktivität am Beispiel des rekombinanten humanen follikelstimulierenden Hormons oder des rekombinanten humanen Thyreotropins stimmte mit der in einem *in-vivo*-Ansatz nicht überein (*Galway et al., 1990; Szkudlinski et al., 1993*), da die beobachteten Unterschiede auf die nur im *in-vivo*-Ansatz innerhalb des Gesamtorganismus berücksichtigte Metabolisierungskinetik der untersuchten Hormone zurückzuführen waren, die ihrerseits wesentlich von der Struktur der komplexen Kohlenhydratseitenkette bestimmt wurde. Eine gültige Aussage bezüglich Bioaktivität einer untersuchten Glykoprotein-hormonpräparation kann somit nur bei der Testung *in-vivo* erzielt werden.

Zur Untersuchung der Bioaktivität von TSH wurde über viele Jahre der Bioassay nach McKenzie verwendet (*McKenzie, 1958*). Dabei wurde in einem Mausmodell die Aufnahme von radioaktiv markiertem Jod in die Schilddrüse und die folgende Freisetzung unter Stimulation mit Thyreotropin untersucht. Die arbeitsintensiven Vorbereitungen und die Verwendung von radioaktiven Isotopen limitierten die Anwendung dieses Verfahrens. Ein Bioassay, der sich bei ausreichender Sensitivität und Rentabilität des Verfahrens für die routinemäßige Testung von hypophysären und rekombinanten TSH-Präparationen geeignet ist, wurde erst von der Arbeitsgruppe um *B. Weintraub* modifiziert (*East-Palmer et al., 1995*). Das Protokoll zur Suppression der hypophysären Aktivität ist identisch mit dem in dieser Arbeit angewendeten Protokoll. Die Vorteile dieses Verfahrens sind die einfache Durchführbarkeit, die Vermeidung von radioaktivem Abfall und die Sensitivierung der Schilddrüse gegenüber einer exogenen Stimulation.

Eine hypophysäre speziesspezifische und eine rekombinante humane TSH-Präparation wurden jeweils in einer niedrigen und einer hohen Konzentration getestet. Das durch hohen Anteil an in N-Acetyl-Neuraminsäuregruppen terminierenden Oligosaccharidseitenketten charakterisierte, rekombinante hTSH (rec-hTSH) kann als Modell für das bei Vorliegen einer Hypothyreose sezernierte TSH angesehen werden (Gyves *et al.*, 1990), für das eine deutlich verlangsamte Metabolisierungskinetik relativ zum bei Euthyreose bereitgestellten TSH nachgewiesen wurde (Constant & Weintraub, 1986). Durch den Vergleich dieses rec-hTSH mit dem rasch metabolisierten rTSH, dessen Gehalt an in N-Acetyl-Neuraminsäuregruppen terminierenden Oligosaccharidseitenketten niedriger ist, konnte eine Gegenüberstellung eines verzögerten und eines raschen Abfalls der TSH-Plasmaspiegel nach pulsatilem Applikation erfolgen. Das Stimulationsmuster wurde durch Verwendung eines vierzigminütigen Zyklus dem für die Ratte nachgewiesenen Muster der LH-Freisetzung (Ellis & Desjardin, 1982) und der unter den Hypothyreose-Bedingungen untersuchten TSH-Freisetzung (Bruhn *et al.*, 1992) angenähert.

Unter niedrigdosierter rTSH-Infusion ist ein Vorteil eines der beiden Infusionsmodi gegenüber der Kontrolle nicht erkennbar. Ein rTSH-Bolus induzierte jedoch eine höhere Responsivität des zuvor pulsatilem stimulierten Systems. Eine Erhöhung der infundierten rTSH-Konzentration erbrachte weitere Hinweise auf höhere Effektivität der pulsatilem gegenüber der kontinuierlichen Gabe. Diese wurden zusätzlich durch die T₄-Antwort auf rTSH-Bolus bestätigt. Der Wechsel der TSH-Präparation verursachte eine Verschiebung des Zeitpunkts erreichter maximaler Unterschiede zwischen beiden Applikationsmodi, bei niedriger Dosierung am Tag 2 auf den Tag 4 bei hoher Dosierung. In diesem Zeitraum wurde ein Abfall bei der kontinuierlichen aber ein Anstieg der T₄-Plasmaspiegel bei der pulsatilem Infusionsgruppe festgestellt. Das bedeutet, daß kontinuierliche Infusion zu einer Desensitivierung und pulsatile Applikation zu einer weiteren Stimulation führte. Ein TSH-Bolus am Ende der Behandlungsphase konnte in beiden Gruppen keine weitere Erhöhung der T₄-Konzentrationen bewirken, sondern eine Desensitivierung, die wahrscheinlich durch die lange Plasmahalbwertszeit des rec-hTSH bedingt ist.

Die Beteiligung von TSH bei der Kontrolle des Schilddrüsenwachstums ist noch nicht eindeutig geklärt. Überwiegende Studien ergaben Hinweise für eine proliferationsfördernde Wirkung von TSH (Übersicht siehe Dumont *et al.*, 1992). In *in-vitro*-Zellsystemen verschiedener Spezies konnte ein solcher Proliferationseffekt (Nitsch &

Wollmann, 1980; Valente et al., 1983; Roger et al., 1983; 1988), oder ein Effekt auf das Expressionsniveau von wachstumsassoziierten Onkogenen (*Tramontano et al., 1986a, Reuse et al., 1986*) durch TSH allein, oder/und über verschiedene zelluläre Wachstumsfaktoren vermittelte synergistische Stimulation der thyreoidalen Proliferation nachweisen werden (*Tramontano et al., 1986b; Lamy et al., 1986; Dralle et al., 1985a; Dralle, 1989*). Unter Berücksichtigung des zeitlichen Musters konnten *Klugmann et al. (1992)* eine höhere Expression eines nukleären Proliferationsantigens unter pulsatiler als unter kontinuierlicher TSH-Stimulation nachweisen. Demgegenüber wurde in anderen Untersuchungen ein TSH-Einfluß auf die thyreoidale Proliferation in Frage gestellt (*Westermarck et al., 1979; Eggo et al., 1984; Gärtner et al., 1985; Kraiem et al., 1990*) und der intrathyreoidale Jodgehalt als der die Wachstumsregulation entscheidende Faktor postuliert (*Stübner et al., 1987*).

Die durch TRH-Infusion induzierte TSH-Erhöhung führte zu einem signifikanten Anstieg der Proliferationsrate, die anhand einer Erhöhung des 5-Bromo-2'-Desoxyuridin-Einbaus nachgewiesen wurde (siehe Abb. 31). Um einen möglichen Effekt von TRH auf die Thyreozyten zu kontrollieren, wurden zunächst Untersuchungen mit hohen T4-Dosen durchgeführt, die in der Lage sind, den Stimulationseffekt von TRH auf die TSH-Sekretion zu unterdrücken. Unter T4-Applikation, d.h. supprimierter TSH-Freisetzung und TSH-Wirkung sowie gleichzeitiger exogener TRH-Stimulation, fand sich gegenüber den nicht T4-behandelten Gruppen eine signifikant gesenkte Proliferationsrate der Thyreozyten. Dies zeigt zum einen, daß ein direkter, d.h. nicht TSH-vermittelter, proliferativer Effekt von TRH auf die Schilddrüsenzellen unwahrscheinlich ist; zum zweiten unterstreichen diese Befunde indirekt die Rolle von TSH in der Regulation des Thyreozytenwachstum. Andererseits wurden die Ergebnisse der Proliferationsrate durch das etablierte Modell der proliferativen Stimulation mit dem Thyreostatikum PTU bestätigt, das seine Wirkung ebenfalls durch Erhöhung der endogenen TSH-Spiegel erzielt (siehe Abb. 31). Damit stand eine Vergleichsgruppe zur Verfügung, die von der exogenen TSH-Stimulation durch TRH unabhängig war und daher nicht den mit TRH möglicherweise verbundenen Fehlerquellen unterlag.

Die nach pulsatiler und kontinuierlicher TRH-Gabe resultierenden histomorphologischen Veränderungen der Schilddrüse wurden durch licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen belegt. Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich das Bild eines funktionell hochaktiven Schilddrüsengewebes in der Phase der Sekretbildung und -ausschwemmung bei nur geringer follikulärer Sekretstapelung, was die oben darge-

stellten funktionellen Parameter bestätigt (siehe Abb. 32). Auch eine Hypertrophie der Follikelzellen war nachweisbar. Die ultrastrukturellen Veränderungen des Thyreozyten mit einer deutlichen Verdrängung des Zytoplasma zugunsten einer Zunahme der Zahl und der Größe des Endoplasmatischen Reticulum Cisternae und des Golgiapparates sowie einer höheren Dichte der Mitochondrien, der Lysosomen und der Sekretgranula sind vergleichbar mit den *in-vitro*-Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (siehe Abb. 34, Nève & Dumont 1970). Innerhalb der Zisterne des endoplasmatischen Retikulums konnte mittels Immunogoldmarkierung gezeigt werden, daß das Hauptprodukt innerhalb der Zisternen Thyreoglobulin ist und die *in-vitro*-Daten bestätigte (siehe Abb. 35, Nève & Dumont 1970; Black et al., 1984; Dralle et al., 1985b). Im Gegensatz zu diesen Studien demonstrierten unsere *in-vivo*-Daten, daß die Schilddrüsenzellen extrem sensitiv auf die Veränderungen der bioaktiven TSH-Plasmakonzentrationen reagieren, welche sich noch innerhalb der zirkadianen Freisetzung des TSH bewegten.

5.2.2 Tiermodell zur Untersuchung der Tumorinduktion

Die meisten Publikationen sehen als wichtigsten Faktor in der Pathogenese der experimentell induzierten und spontanen Schilddrüsentumoren die vermehrte Produktion und Ausschüttung von TSH an (Griesbach et al., 1965, Furth 1969, Nadler et al., 1969). TSH kommt eine nicht unerhebliche Rolle bei der Stimulation der Proliferation von Thyreozyten zu (Debelke et al., 1983, Lamy et al., 1986, 1990). Ein früh nachweisbarer Effekt einer Joddepletion auf die Zellmorphologie und die Syntheseaktivität der Schilddrüse konnte an unserem Tiermodell der Ratte nachgewiesen werden. Bereits nach wenigen Tagen im Jodmangel bei leicht erhöhtem TSH- und erniedrigtem Thyroxinplasmaspiegel zeigte sich eine extreme Hyperplasie der Zellen und eine maximal gesteigerte Thyreoglobulinsynthese (Hoang-Vu et al., 1995a, b). Es spricht viel für die These, daß sowohl TSH-Stimulation als auch Thyreostatika jeweils gleichzeitig als initiating und promoting factor bei der Tumorgenese in Schilddrüsen anzusehen sind, aber auch ohne TSH-Stimulation sich Tumoren der Schilddrüse entwickeln.

Die in der Literatur beschriebenen verschiedenen Versuchsansätze zur Tumorinduktion verwendeten radioaktives Jod¹³¹ und auch Röntgenstrahlung. Vom radiologischen Äquivalent entspricht die Strahlungsaktivität von 2.5 µCi Jod¹³¹ einer Ener-

giedosis von 1Gy Röntgenstrahlung. Die biologischen Folgen sind nur indirekt vergleichbar, da einmalig in dieser Dosis inkorporiertes Radiojod über mehrere Tage auf die Schilddrüse und den gesamten Organismus einwirkt, während Röntgenstrahlen nur innerhalb der begrenzten Applikationsdauer die Zellen unmittelbar schädigen können (*Doniach, 1957, 1958; Lindsay et al., 1961*). In der vorliegenden Studie lag der Schwerpunkt auf der Induktion der Tumorgenese in der Schilddrüse. Dazu war eine einmalige lokale Röntgenbestrahlung ein probates Mittel. So war es möglich die Größe der jeweils applizierten Strahlendosis zu erfassen, womit strahlungsbedingte Veränderungen an der Schilddrüse zuzuordnen waren. Bei einer inkorporierten Strahlung mittels J^{131} würde eine Zuordnung von Strahlungseffekt und Bestrahlungsdosis durch den Charakter der radioaktiven Substanz und die Stoffwechselaktivität des Organismus nahezu unmöglich.

Der von uns ausgewählte Jodüberschuß sollte sich an den natürlichen Gegebenheiten der Umwelt orientieren. Daher wurde der Jodmangel mit einem 14-tel des täglichen Jodbedarfes eingestellt, welches man als milden Jodmangel bezeichnen kann. Die Jodüberdosierung erfolgte mit einem 10-fachen des üblichen Jodtagesbedarfes, welches weit unter der Dosierung des in der Literatur beschriebenen Jodexzesses liegt. Diese Methoden sind in der Literatur zum Jodmangel (*Axelrad & Leblond, 1955; Bray, 1968; Fang et al., 1994; Schaller & Stevenson, 1966; Stübner et al., 1987; Williams et al., 1977*) bzw. bei Jodüberdosierung (*Correa & Welsh, 1960; Galton & Pitt-Rivers, 1959*) hinreichend beschrieben.

Während Thyroxin (T4) über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant blieb, nahm der Trijodthyroninspiegel (T3), unabhängig vom Jodanteil in der Nahrung, parallel zum Alterungsprozeß ab, was es erlaubte T3 als indirekten Wachstumsfaktor zu bezeichnen. Mit fortschreitendem Wachstums- und Reifeprozeß verringerte sich der periphere T3-Spiegel, gleichzeitig nahmen die in der Gewichtsstudie ermittelten Tageszunahmen ab. Im milden Jodmangel lagen die durchschnittlichen T3-Konzentrationen 40% unter den Werten der Kontrollgruppe. T4, ein T3-Prohormon, wurde von der jodverarmten Schilddrüse möglichst lange (anfänglich langsamer Rückgang um -19%) stabil gehalten. Zwischen 15. und 40. Woche waren die Hormonspiegel auf einem niedrigen Wert konstant, um dann im chronischen Jodmangel völlig zusammenzubrechen (siehe Abb. 37 & 38).

In Folge des negativen feed-back Mechanismus lag die durchschnittliche TSH-Plasmakonzentration der Jodmangelgruppe um 43% signifikant höher als der Vergleichswert der Kontrolle (siehe Abb. 39). *Mooij et al. (1993)* beobachteten bei 12 Wochen Versuchsdauer einen T4-Rückgang wie in unserem Experiment. *Riesco et al. (1977)* beschreiben nach sieben Wochen jodfreier Nahrung nicht meßbare T4-Konzentrationen. Trijodthyronin (T3) war um 50% vermindert. Bis zum Versuchsende nach 55 Wochen blieben diese Hormonwerte auf gleichem Niveau. TSH stieg äquivalent bis zur 12. Woche an und blieb dann auf diesem Niveau. Entgegen diesen Beobachtungen waren die T4-Konzentrationen unserer Versuchstiere auch nach sieben Wochen noch deutlich im meßbaren Bereich. Als Gründe hierfür sind einerseits der „milde“ Jodmangel (60 µg Jod/kg Nahrung) und andererseits eine Weiterentwicklung und zunehmende Sensibilität der Hormonmeßmethoden in den letzten 20 Jahren anzusehen. Aufgrund des noch vorhandenen minimalen Jodanteils in der Nahrung und des damit verbundenen langsamen T3/T4-Rückganges, war die Phase des TSH-Anstieges bis zur 35. Woche ausgedehnt, um dann in ein Kontinuum überzugehen (siehe Abb. 39).

Es zeigte sich in jodsupplementierten Ratten, daß Jodid seine eigene Organifizierung hemmt. Dies führte zu einer Verminderung der Schilddrüsenhormonsynthese und –sekretion und daraus folgernd erhöhten TSH-Spiegeln. Der Jodidtransport unterliegt einem Autoregulationssystem, welches über die Jodkonzentration im Plasma, intrazelluläres Jodid sowie organische Jodverbindungen, die Jodaufnahme in die Zellen beeinflusst (siehe dazu *Gärtner & Dugrillon, 1998*). So kann durch eine gezielte hochdosierte Jodgabe die limitierende Jodidkonzentration überschritten werden. Dies führt, wie hier gezeigt, zu einer Hemmung des Einbaus von Jodid in organische Verbindungen und damit zur Hemmung der Schilddrüsenhormonsynthese und –sekretion (Wolff-Chaikoff-Effekt) oder zur „Down-Regulation“ des Natrium-Jodid-Symporter wie kürzlich von der Arbeitsgruppe um *Braverman* publiziert wurde (*Eng et al., 1999*). *In-vitro* Untersuchungen haben gezeigt, daß Jodid die Schilddrüsenfunktion hemmt (*Beere et al., 1990; Clark et al., 1990; Davies & Franklyn 1991; Maenhaut et al., 1991*), was in Hypothyreosepatienten *Chabrolle & Rossier (1978)* sowie *Lauerberg et al. (1998)* beobachtet wurde. *Jeng et al. (1998)* konstatierten lediglich eine TSH-Erhöhung. Bei einer täglichen Jodsupplementation von 1500 mg kam es bei den Patienten einer Studie von *Paul et al. (1988)* zu einem leichten aber signifikanten T3- und T4-Abfall.

Eine Bestrahlung euthyreoter Tiere führte zu minimalem Rückgang der Schilddrüsenhormone. Dies läßt sich durch den histologisch erkennbaren Schwund von

Follikel­epithel bei gleichzeitigem Ersatz durch fibrotisches Gewebe erklären. Während der Fibroseindex bei Niedrigdosisbestrahlung nur minimal zunahm, ist der Verlust an aktivem Schilddrüsengewebe bei gleichbleibendem Schilddrüsengewicht nach Hochdosisbestrahlung erheblich größer. Mit sinkendem T3- und T4-Plasmaspiegel erhöhten sich die TSH-Spiegel im Sinne eines negativen feed-back Mechanismus. Die Erhöhung der TSH-Spiegel war entsprechend dem minimalen T3- und T4-Rückgang insgesamt als gering zu bezeichnen, scheint aber mit einer erhöhten Tumorrates zu korrelieren (*Domann et al., 1994; Hill et al., 1989; Hofmann et al., 1986; Liu et al., 1986*).

Eine Kombinationsbehandlung (Jodmangel + externe Bestrahlung) zeigte einen klaren synergistischen Effekt auf die hormonale Regulation der Tiere (siehe Abb. 43-45). Die Erhöhung der peripheren Hormonkonzentrationen mit Maximum unmittelbar nach der Bestrahlung unter Jodmangelsituation ist offenbar auf die Schädigung der Membran- und Follikelstruktur zurückzuführen. Den geschädigten Follikeln scheint es nicht mehr möglich zu sein, das Kolloid intrafollikulär zu halten. Diese These wird durch die histologisch erkennbare schaumige Konsistenz des Kolloids gestützt. Während T3-Plasmakonzentrationen nach 55 Wochen noch deutlich höher als die der Kontrolle lagen, sanken die T4-Spiegel rapide um 65%, was einerseits auf die Wirkung des Jodmangels zurückzuführen ist, andererseits wird durch die Strahlenwirkung weniger Kolloid gespeichert (geschädigte Membransysteme) und die Hormone direkt in die Peripherie abgegeben. Die Endwerte waren signifikant höher als der Vergleichswert der Jm-Gruppe. Dies spricht für ein größeres Ausmaß der Membranschädigung nach der Bestrahlung.

In der Kontrollgruppe mit Standardfutter (Jn) zeigte sich nach Umstellung der Ernährung von Muttermilch auf feste Kost in den ersten zwei Wochen eine Anpassungsstagnation. Ab der 7. Lebenswoche war die Gewichtszunahme niedriger und nach 21 Wochen war das Wachstum abgeschlossen bei einem rassetypischen Endgewicht von 500.6 g (*Guzy & Rapp, 1975*). Als morphologisches Korrelat zum Rückgang des Hormones T3, war im Jodmangel ein signifikantes Wachstumsdefizit von -14.1% gegenüber den Vergleichstieren anzusehen. Eine Verzögerung des Wachstumsprozesses ist auszuschließen, da in beiden Gruppen die Ratten nach 21 Wochen ihr Endgewicht erreichten. Es kann postuliert werden, daß T3 ein wichtiger Faktor für die Gewichtszunahmen ist. Bei Rückgang dieses Hormons in euthyreoten Tieren war ein niedrigeres Endgewicht in den Bestrahlungsgruppen (JnND, JnHD) zu erwarten. In Anlehnung an

eine minimale Hormondepression zeigten sich geringe Gewichtsrückgänge von -8.9% JnND bzw. -10.2% JnHD. Streß infolge der Bestrahlungsprozedur schied als Faktor aus, da der Gewichtsunterschied erst 4 Wochen nach der Bestrahlung relevant wurde. Bei Erhöhung von T3 war demzufolge ein höheres Endgewicht in den Jodmangelbestrahlungsgruppen (JmND, JmHD) zu erwarten. Dies bestätigte sich mit Gewichtszunahmen von $+4.7\%$ JmND bzw. $+10.7\%$ JmHD. Unmittelbar nach der Bestrahlung zeigten die Hochdosistiere (JmHD) parallel zum massiven T3-Anstieg einen ausgeprägten Schub mit Tageszunahmen von 20.9 g vs. 12.4 g in der Vergleichsgruppe (Jm), was den indirekten Effekt von Trijodthyronin auf die Gewichtszunahme unterstrich. Ob die Gewichtszunahme auf die Muskelaufbau oder aber auf die Ödeme beruht, bedarf weiterer Untersuchungen.

Nach einjähriger Versuchszeit verringerte sich das Schilddrüsengewicht der Kontrolltiere um 20%, wobei häufig bei Sektionsfällen eine Altershypotrophie bis –atrophie der humanen Schilddrüse nachgewiesen wurde (*Dhom, 1990*). Aufgrund des Nachlassens der Hormonproduktion, welche auch in diesem Experiment gezeigt werden konnte, wurde das nicht mehr zur Proteinbiosynthese benötigte Gewebe zurückgebildet. Im Jodmangel war nach 15 Wochen eine hoch signifikante Erhöhung der Schilddrüsengewichte um 68% zu verzeichnen. Im Verlauf wurde der Unterschied noch eklatanter: 35. Woche $+124\%$, 55. Woche $+225\%$, 110. Woche $+235\%$. Die Erhöhung des Schilddrüsengewichtes war Folge einer histologisch erkennbaren und in der Literatur beschriebenen Follikelhypertrophie und anschließender Follikelhyperplasie sowie einer zusätzlichen Bindegewebsvermehrung, was auf den proliferativen Effekt von erhöhtem TSH zurückzuführen sein soll (*Stübner et al., 1987*). Der geringe Gewichtsunterschied zwischen 55. Woche und 110. Woche läßt erkennen, daß das Organ entweder an die Grenze seiner Proliferations- und Wachstumskapazität, oder ein neues „Steady-State“ gelangt ist, wie die Ergebnisse von *Mooij et al. (1993)* und *Riesco et al. (1977)* gezeigt haben. Die Schilddrüsengewichte der Jodüberschußgruppe (Ju) zeigten sich gegenüber der Kontrollgruppe (Jn) nach der 15. und 110. Woche signifikant erhöht. Dieses Verhalten resultiert aus einer massiven Follikelzellvermehrung, welche wiederum als Ergebnis einer verstärkten TSH-Wirkung anzusehen ist. Jodsupplementation führt über eine erhöhte Proliferationsrate (*Stepanov & Tupikina, 1997*) und eine Follikelzellhyperplasie zur Erhöhung des Organgewichtes (*Mooij et al., 1993*).

Niedrigdosisbestrahlung im Jodmangel (JmND) führte zu minimalen Gewichtsrückgängen. Nach Hochdosisbestrahlung (JmHD) waren die Unterschiede gravierender jedoch nicht signifikant (15. Woche: -17%, 35. Woche: -23%, 55. Woche: -15%, 110. Woche: -10%). Diese Diskrepanz läßt sich durch die follikelzellzerstörende Potenz der Hochdosisbestrahlung erklären. Mit zunehmender Follikelreparation und –rekonstruktion glichen sich die Schilddrüsengewichte aller Jodmangelgruppen (Jm, JmND, JmHD) wieder an. Nach Bestrahlung waren die Schilddrüsengewichte der Gruppen JuND und JuHD im Vergleich zur unbestrahlten jodbehandelten Gruppe (Ju) nach 15 Wochen leicht aber nicht signifikant erniedrigt. Im Verlauf waren keine maßgeblichen Unterschiede in den Schilddrüsengewichten der drei jodbehandelten Gruppen (Ju, JuND, JuHD) zu verifizieren. Dieses Verhalten deutet, aufgrund der histomorphologischen Befunde, auf eine hohe Regerations- und Adaptationsfähigkeit der jodbehandelten Schilddrüse hin.

Die histologischen Parameter Follikel- und Kolloiddurchmesser sowie Follikelkelepitelhöhe blieben in der Kontrollgruppe (Jn) während des Versuchszeitraumes konstant. Eine minimale Verringerung der Follikelzahl je mm² ist als Folge einer leichten Erhöhung des Fibroseindex anzusehen, was durch den altersatrophischen Umbau von Follikelkelepitelgewebe in Bindegewebe zu erklären ist (*Dhom, 1990*). Eine massive Verringerung der Follikelzahl je mm² der Jodmangeltiere (Jm) gegenüber den Kontrolltieren (Jn) ist auf eine starke Vergrößerung der Kolloiddurchmesser zurückzuführen und als Follikelhypertrophie zu werten. Diese Vergrößerung ist nicht wachstumsassoziiert, sondern vielmehr Ergebnis einer gesteigerten Thyreoglobulinproduktion (*Brabant et al., 1992; Hoang-Vu et al., 1995b*). Gleichzeitig war als Ausdruck einer verstärkten Aktivierung des Follikelkelepitels eine signifikante Epithelerhöhung nachweisbar.

Jodüberschuß führte zu, in dieser Form nicht erwarteten, histologischen Veränderungen. Zwischen 15. und 110. Woche zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Follikelanzahl je mm² um 88% bzw. um 52% gegenüber der Kontrollgruppe (Jn). Gleichzeitig verkleinerten sich die Follikeldurchmesser signifikant (um 27% bzw. 24%). Analog dazu verkleinerten sich ebenfalls die Kolloiddurchmesser signifikant. Studien zu kurzfristigen Veränderungen nach Jodexzeß (*Galton & Pitt-Rivers, 1959*) zeigten, daß hohe Joddosen eine vorübergehende Thyreostase ausüben und Schilddrüsenhypertrophien infolge erhöhter Kolloidspeicherung erzeugen können. Längere Versuchszeiten führen, wie dieses Experiment zeigt, zur Verringerung der kolloidalen Speicherung. Es

ist denkbar, daß die Schilddrüse, die an die ständige Jodüberdosierung adaptiert ist, die Natrium/Jodid-Symporter herunter reguliert, da ständig ausreichend Jod zur Hormonsynthese zur Verfügung steht. Nach 15 Wochen war eine Epithelerhöhung um 21% feststellbar. Diese geringe Erhöhung setzte sich über den gesamten Versuchszeitraum fort, was wahrscheinlich auf die latent erhöhten TSH-Spiegel zurückzuführen ist.

13 Wochen nach der Bestrahlung zeigte sich eine minimale Erhöhung des Proliferationsindex in den euthyreoten Tieren, was als Ausdruck der strahleninduzierten Reparationsmechanismen zu werten ist (*Soifer, 1976*). Auch im Jodmangel war proportional zur Bestrahlungsdosis eine Erhöhung der Proliferationsrate zu verzeichnen. Das Bemerkenswerte hierbei ist, daß die Reparationsmechanismen erst mit einer Latenz von ca. 20-30 Wochen einsetzen. Die durch Jodmangel vorgeschädigte Schilddrüse scheint nach Einfluß des Kanzerogens Radiatio nicht in der Lage zu sein, adäquat zu antworten. Durch den Verlust der zellulären Matrix und von Membransystemen, welche durch den chronischen Jodmangel schon eine Vorschädigung erfahren hatten (*Hoang-Vu et al., 1995a*), tritt das Organ scheinbar erst in eine Neuorientierungsphase ein, um anschließend das zerstörte Follikelepithel zu ersetzen. Nach 110 Wochen bei Wiederherstellung der histologischen Kontinuität waren die Proliferationsraten aller Jodmangelgruppen auf gleichem Niveau. Nach Bestrahlung jodbehandelter Tiere erhöhte sich die Zellteilungsrate nochmals hoch signifikant mit Maximum nach 35 und 55 Wochen. Nach 110 Wochen waren die Werte wieder ausgeglichen und die Reparationsvorgänge abgeschlossen. Die erhöhte Proliferationsrate hatte unmittelbaren Einfluß auf die Tumorgenese. Mit steigender Teilungstendenz entwickelten sich zunehmend Neoplasien. Auch *Stepanov & Tupikina (1997)* berichteten in ihren Versuchen eine erhöhte Proliferationsrate in jodüberdosierten Schilddrüsen.

Es ist zu vermuten, daß durch die gesteigerte Proliferationsrate das Follikelepithel besonders empfindlich gegenüber hohen Dosen radioaktiver Strahlung ist. So spielt eine gesteigerte, aber nicht neoplastische Zellproliferation zum Beispiel in der Wachstumsphase oder während einer Schwangerschaft bei der Karzinogenese eine entscheidende Rolle, da während der mitotischen Zellteilung die Empfindlichkeit gegenüber einem Kanzerogen höher ist als in der Ruhephase (*Hennings & Boutwell, 1970; Rajewsky, 1967; Warwick, 1971*). So ist es durchaus denkbar, daß es während der gesteigerten Follikelepithelzellproliferation zu Fehlbildungen kommt, die einen engen Zellverband nicht mehr möglich erscheinen lassen.

Jodmangeldiät führt, wie 1928 erstmalig durch *Wegelin* und später durch *Axelrad & Leblond (1955)* und *Nadler et al. (1969)* beobachtet, zur Ausbildung von Strumen bei Ratten. In den Versuchen von *Ward & Ohshima (1986)* erzeugte chronischer Jodmangel nach 12 Monaten folliculäre Adenome, nach 18 Monaten folliculäre Karzinome. *Fang et al. (1994)* diagnostizierten in ihren insgesamt 122 Versuchstieren bei einer 195 µg Jod / kg Nahrung enthaltenden Jodmangeldiät nach 12 Monaten 14 papilläre und fünf folliculäre Karzinome. Obwohl die in der Studie von *Ward & Ohshima (1986)* gewählte Joddosierung 69% unter der Dosierung von *Fang et al. (1994)* lag, konnte sicherlich aufgrund der geringeren Tierzahl (nach 12 Monaten 8 Ratten vs. 122 Ratten) ein karzinogenes Wachstum nicht diagnostiziert werden. In Anbetracht der von *Hill et al. (1989)* entwickelten Theorie der Karzinogenese ausgehend von einer Follikelzellhypertrophie und -hyperplasie über die benigne Neoplasie zum Karzinom (siehe dazu Abb. 2), erscheint es wahrscheinlich, daß mit der Ausbildung von folliculären Adenomen innerhalb unserer Studie möglicherweise eine Zwischenstufe der Tumorgenese erreicht wurde, welche bei den Versuchsreihen von *Fang et al. (1994)*, *Ward & Ohshima (1986)* im Einzelfall überschritten wurde. Eine nach 55 Wochen gleichzeitig nachgewiesene erhöhte Proliferationsrate (Jn: 0% vs. Jm: 2,1%) unterstützt diesen Denkan-satz.

Nach Jodüberschuß fand sich in diesem Experiment bei bestehender Struma (Schilddrüsengewichte 60% über Kontrollgruppe Jn) nach 55 Wochen eine Verdoppelung und nach 110 Wochen eine vierfache Tumorrare im Vergleich zur Kontrollgruppe (Jn). In allen tumorpositiven Fällen wurden histologisch folliculäre Adenome, welche erhöhte TSH-Spiegel und erhöhte Proliferationsrate hatten, festgestellt. Die Studien von *Bigorie et al. (1976)* und *Chabrolle & Rossier (1978)* zeigten ebenfalls eine erhöhte Strumainzidenz vorwiegend mit begleitender Hypothyreose infolge Jodexzesses. Papilläre Schilddrüsenkarzinome (*Koutras, 1996*) oder Thyreoitiden mit obligater lymphozytärer Infiltration des Organes und Hypothyreosen (*Lauerberg et al., 1998*) konnten in unseren Experimenten, aufgrund relativ niedrigem Jodzusatz, welcher weit unter dem in der Literatur beschriebenen Jodexzess lag, nicht nachgewiesen werden.

Während in den euthyreoten jodnormalernährten Ratten sich jeweils nach der 55. und 110. Woche in einem von vier untersuchten Fällen Plattenepithelmetaplasien mit Ausbildung von Dermoidzysten fanden, welche als Normalbefund anzusehen sind, fanden sich in den Niedrigdosistieren (JnND) nach 55 Wochen in 2 von 4 bzw.

nach 110 Wochen in drei von vier Tieren benigne Neoplasien. Die hochdosiert bestrahlten Tiere (JnHD) bildeten nach 55 Wochen in 75% bzw. nach 110 Wochen in allen Tieren benigne Neoplasien aus. *Doniach (1957, 1958)* sowie *Hofmann et al. (1986)* konnten 40 bzw. 24 Monate nach Bestrahlung die Entstehung von follikulären Karzinomen feststellen. In unseren Experimenten fanden sich keine malignen Neoplasien, was durch die geringe Fallzahl einerseits und andererseits durch die stabile Situation innerhalb der Schilddrüse während der Euthyreose zu erklären ist.

Während in den bestrahlten Tieren oder in Tieren mit Jodmangelernährung nach 35 Wochen ein Inzidenz für eine Neoplasie nicht feststellbar ist, ist durch eine Kombinationsbehandlung von Radiatio und Jodmangel eine 50%-ige Tumorausbeute erreichbar. Nach 110 Wochen waren in allen Fällen benigne Neoplasien sowohl im Jodmangel, als auch nach Kombinationsbehandlung mit Radiatio nachweisbar. Jodmangel allein konnte kein malignes Wachstum induzieren. Zusätzliche Radiatio führte in Niedrigdosis- und Hochdosisbestrahlungsgruppe (JmND und JmHD) nach 110 Wochen zur Karzinombildung. Niedrigdosis erzeugte ein follikuläres, vorwiegend irreguläres Schilddrüsenkarzinom mit Ausbildung von Pseudopapillen und Hochdosisbestrahlung ein papilläres, vorwiegend follikulär aufgebautes Schilddrüsenkarzinom. Die durch den chronischen Jodmangel vorgeschädigte Schilddrüse (Rarefizierung der Membransysteme) ist gegenüber jeder Strahlungsdosis sehr empfindlich bzw. verletzbar. Dies wird beim Vergleich der Strahlungswirkungen der jodnormalernährten Ratte und chronisch jodverarmten Ratte deutlich. Niedrigdosisbestrahlung führte in den Jodmangeltieren (JmND) zu einer 25% höheren Tumorausbeute als in den Vergleichstieren (JnND). Nach Hochdosisbestrahlung ist bis zur 55. Woche kein Unterschied zu verzeichnen, weil das durch ionisierte Strahlung (4 bzw. 6 Gy) hervorgerufene Schädigungspotential stärker als das des Jodmangels zu sein scheint. Nach der 110. Woche waren im Jodmangel Karzinome zu beobachten, welche im euthyreoten Zustand nicht auftraten. Die Jodmangelschilddrüse besitzt nach Bestrahlung ein 25% höheres Neoplasierisiko sowie ein erhöhtes malignes Potential gegenüber der Schilddrüse mit euthyreoter Stoffwechselsituation, was durch die Ergebnisse von *Nadler et al. (1969)* untermauert wird.

Es zeigte sich bis zur 55. Woche kein Unterschied in der Tumorrates zwischen jodnormalernährten bestrahlten (JnND, JnHD) und jodüberschußernährten bestrahlten Tieren (JuND, JuHD). In allen Fällen konnte kein Tumorwachstum festgestellt werden. In den Jodmangelgruppen (JmND, JmHD) war bereits nach 35-wöchiger Kombinationsbehandlung eine 50%-ige Tumorausbeute festzustellen. Bis zu diesem Zeitpunkt ist si-

cherlich ein Jodzusatz zur Tumorprävention erfolgreich, jedoch im Vergleich nicht besser als eine euthyreote Stoffwechsellage. Nach 55 Wochen wendete sich das Bild: Jodüberschußtiere zeigten nach Bestrahlung eine 50%-ige (Niedrigdosis) bzw. 25%-ige (Hochdosis) Erhöhung der Tumorraten gegenüber den Vergleichstieren (JnND, JnHD). Alle Tumoren waren zu diesem Zeitpunkt benignen Natur. Nach 110 Wochen wurde in einer Schilddrüse der Niedrigdosisgruppe (JuND) ein follikuläres Karzinom mit vorherrschendem insulärem Typ identifiziert. Des Weiteren fand sich bei demselben Tier ein Plattenepithelkarzinom im parathyreoidalen Weichgewebe. Hochdosisbestrahlung (JuHD) führte nach 110 Wochen in 75% der Fälle zur Ausbildung von Karzinomen. Dabei wurden ein follikuläres Karzinom und zwei papilläre Karzinome mit jeweils überwiegendem follikulärem Anteil von den Ratten ausgebildet.

Die Kontrolltiere (JnND, JnHD) zeigten dagegen im gesamten Versuchszeitraum kein malignes Wachstum. Erstaunlicherweise war die Karzinomrate der Jodüberschußtiere (JuND, JuHD) auch höher als die der Jodmangeltiere (JmND, JmHD). Hier fand sich nach 110 Wochen jeweils nur ein Karzinom. Die Erklärung hierfür ist sicherlich in der durch Jodüberschuß induzierten Erhöhung der Proliferationsrate der Schilddrüse zu sehen. Untersuchungen an Haut (*Hecker, 1972*) und Leber (*Rajewsky, 1967; Warwick, 1971*) zeigten, daß die krebserzeugenden Eigenschaften einer Noxe verstärkt werden, wenn diese auf stark proliferierendes Gewebe trifft. Kanzerogene, die während der Fötalphase oder in der frühen postnatalen Periode verabreicht wurden, übten eine potenzierte onkogene Wirkung aus (*Della-Porta & Terracini, 1969; Thomas & Bollmann, 1968*). Experimentelle Ansätze zur Tumorinduktion durch Jodüberschuß und externe Radiatio sind in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es existieren Studien zur Blockierung inkorporierten radioaktiven Jods durch Kaliumjodid. So beschreiben *Meck et al. (1985)*, daß durch die Gabe von 130 mg Kaliumjodid eine Energiedosis von 25 rad (= 0.25 Gy) aus dem Körper eliminiert werden kann, ohne Folgeschäden für den Organismus. Jede höhere Dosis ist nicht beherrschbar und führt zu Schädigungen.

Unsere Daten zeigen, daß eine euthyreote Stoffwechsellage der beste Schutz für die Schilddrüse gegen Umweltnoxen ist.

6 Zusammenfassung

6.1 TSH-Rezeptor und E-Cadherin in der Schilddrüse

Thyreozyten sind stark polarisierte epitheliale Zellen, welche Follikelstrukturen aufbauen, die es den Zellen erlauben als Zellverband zu reagieren. Unsere Arbeitsgruppe hat die Expression von E-Cadherin und TSH-Rezeptor in normalen Thyreozyten wie in benignen und malignen Schilddrüsentumoren untersucht.

Northern-Blot-Analysen haben gezeigt, daß TSH-R mit zunehmendem Dedifferenzierungsgrad verloren geht, wobei TSH-R in dem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom nicht nachweisbar ist.

Sowohl auf der Ebene der Transkription von E-Cadherin wie auch immunhistochemisch ließ sich eine starke Expression des Proteins in normalen Schilddrüsenzellen nachweisen, während differenzierte Schilddrüsenkarzinome einen variablen und anaplastische, undifferenzierte Tumore einen vollständigen Verlust der Expression aufwiesen. Eine verringerte Expression von E-Cadherin korreliert in Schilddrüsentumoren mit einer hohen Aggressivität und Invasivität.

In differenzierten Schilddrüsentumorzellen kann Re-Expression von E-Cadherin unter Behandlung mit cAMP-spezifischen Aktivatoren wie Forskolin oder TSH, solange TSH-R noch vorhanden ist, induziert werden. Eine Vorbehandlung mit *all-trans* Retinsäure für 72 Stunden verursacht eine höhere Proteinexpression bei den E-Cadherin schwach exprimierten Tumorzellen und verstärkt die Wirkung von cAMP-abhängigen Aktivatoren.

6.2 CD97 in der Schilddrüse

CD97 wird im hämatopoetischen System auf Monozyten und Granulozyten permanent und auf Lymphozyten unmittelbar nach Aktivierung exprimiert. Aufgrund des hybridähnlichen strukturellen Aufbaus kann eine duale Interaktion von CD97 vermutet werden und das Molekül sowohl in Adhäsions- als auch Regulationsprozesse von Tumorzellen einbezogen sein: a) Über seine extrazellulären EGF-ähnlichen Domänen und das RGD-Motiv könnte das Molekül an Ca^{2+} -abhängigen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sein oder an Adhäsionsmoleküle gebunden werden. b) CD97 könnte über seinen „Sieben-Transmembranären“ Anteil als Hormonrezeptor fungieren.

In normalem Schilddrüsengewebe fehlte CD97. Differenzierte papilläre und follikuläre Karzinome zeigten keine oder nur eine geringe Reaktivität für CD97. Mit Ausnahme von einem Gewebe, exprimierten alle anaplastischen undifferenzierten Karzinome und Lymphknotenmetastasen CD97 sehr stark.

In-vitro wurde der Einfluß von EGF, TSH, Forskolin, PMA und Insulin auf die Expression von CD97 in der follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 untersucht. TSH, Forskolin, PMA und Insulin haben keinen Einfluß auf die CD97-Expression. EGF bewirkt in FTC-133 Zellen eine Steigerung der CD97 Expression bei gleichzeitigem Verlust der Expression von E-Cadherin. Im Gegensatz dazu führte *all-trans* Retinsäure, die *in-vitro* eine Redifferenzierung in Schilddrüsentumoren induzieren kann, zu einer verminderten CD97 Expression bei gleichzeitig erhöhter E-Cadherin Expression auf FTC-133 Zellen.

6.3 Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren in der Schilddrüse

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie sezernierter oder membrangebundener Enzyme, die extrazelluläre Matrix abbauen. Eine Änderung des Gleichgewichtes zwischen den MMPs und ihren spezifischen Inhibitoren kann zu pathologischen Bedingungen führen. Um Strukturbarrieren zu durchbrechen, müssen entweder Tumorzellen selbst oder die Stromazellen bzw. Tumor-infiltrierenden Leukozyten proteolytisch aktiv sein. Eine kontrollierte Sekretion und Aktivierung von MMPs ist für eine optimale proteolytische Balance erforderlich. Sie regelt sowohl das Lösen, die Migration als auch die Adhäsion metastasierender Tumorzellen an die extrazelluläre Matrix. Neueste Studien haben gezeigt, daß MMPs Schlüsselregulatoren der Angiogenese im Wachstum von Primär- und Sekundärtumoren sind.

Fast alle Schilddrüsenkarzinomgewebe zeigten eine starke Expression von MMP-2 und MMP-9. Zwischen Primärtumoren und Rezidiven konnten wir keinen signifikanten Unterschied in der Expression der Proteinase feststellen. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen der Expression der Proteinase und der Tumorgröße oder einer Lymphknotenbeteiligung. Auffällig war die fehlende Expression von MMP-2 in Lymphknotenrezidiven von sporadischen medullären Schilddrüsenkarzinomen, was die Annahme von MMPs als Marker von APUD (Amine Precursor Uptake Decarboxylation)-Zellen in Frage stellt. Die TIMP-1 und TIMP-2 Expression in allen untersuchten Tumorgeweben war signifikant höher als im Normalgewebe. Zwischen Primärtumoren und

Rezidiven konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression der Inhibitoren nachgewiesen werden. Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Expression der Inhibitoren und der Tumorgröße oder einer Lymphknotenbeteiligung. Die Ergebnisse zeigen, daß die Expression der Matrixmetalloproteinasen mit dem malignen Verhalten aller Typen von Schilddrüsentumoren stark assoziiert ist. Ein eindeutiger Zusammenhang mit dem pTNM-Stadium ließ sich nicht darstellen.

In den *in-vitro* Versuchen mit der Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 sind MT1-MMP, MMP-1, MMP-2 sowie TIMP-1 und -2 durch Differenzierungs- bzw. Dedifferenzierungsfaktoren nicht regulierbar. *all-trans*-Retinsäure induziert unter Basalbedingungen die MMP-9- und TIMP-3-Expression. EGF und PMA induzierten MMP-9-Expression. Eine weitere Verstärkung dieser Expression erfolgt durch 72-stündige RA-Vorbehandlung.

6.4 Apoptose-Gene in der Schilddrüse

Seit Beginn der 90er Jahre konnte gezeigt werden, daß zur Therapie eingesetzte Chemotherapeutika und Bestrahlung Apoptose oder programmierten Zelltod auslösen können, und daß diese induzierte Apoptose einen wesentlichen Mechanismus der onkologischen Therapie darstellt. Gleichzeitig wurde erkannt, daß Krebszellen eine sehr variable Anfälligkeit für die Induzierbarkeit von Apoptose haben und daß unter Chemotherapie die Apoptose-Anfälligkeit weiter vermindert werden kann. Die Mechanismen der Therapie-induzierten Apoptose-Auslösung in Tumorzellen und ihrer Modulation bei primärer oder erworbener Apoptose-Resistenz sind erst unvollständig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war, die mRNA-Expressionen von Apoptose-induzierendem Membranrezeptor Fas und seinem Liganden sowie von anderen Apoptose-auslösenden Rezeptoren DR4 und DR5, und ihrem Ligand TRAIL sowie von dem Köder-Rezeptor DcR1 in Schilddrüsenmalignomen zu untersuchen.

Das Transkript von TRAIL und von dem „Death-Domain“-Rezeptor DR4 wurde in allen Geweben nachgewiesen. Der „Death-Domain“-Rezeptor DR5 wurde in 60% von follikulären (FTC), in 70% von papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC), in allen benignen Strumen (S) und undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen (UTC) nachgewiesen. Fas-Transkript wurde in allen S, 90% von FTC, 80% von PTC und 80% von UTC festgestellt. FasL-mRNA wurde in 20% von S, 20% von FTC, 60% von PTC sowie

70% von UTC nachgewiesen. Immunhistochemisch zeigte sich, daß Fas-Protein in 80% von S, in 40% PTC, in 10% FTC bzw. in 10% UTC exprimiert wurde. Die Immunreaktivität von FasL konnte in etwa 20% der differenzierten Karzinome und in allen mRNA-exprimierten UTC-Geweben nachgewiesen werden.

Die undifferenzierte Schilddrüsentumorzelllinie 8505C stammte aus einem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom mit papillären Strukturen und hat noch einen intakten TSH-Rezeptor. Unabhängig von der Vorbehandlung wurde mRNA von Fas in allen Stimulationsmodi zu allen Untersuchungszeitpunkten exprimiert. Das FasL-Transkript war nur nach EGF-Stimulation für 24 Stunden nachweisbar, während es nach 72 Stunden Vorbehandlung mit Retinsäure nicht mehr exprimiert wurde. Die mRNA-Expression von DR4, DR5, TRAIL und TNF-R1 zeigte keine Veränderung. Die Expression von DcR1 nach Insulin, PMA, insbesondere nach Forskolin und TSH-Behandlung nach 72h herab reguliert, während EGF DcR1-Expression stimuliert. Eine RA-Vorbehandlung für 72h hebt diese Wirkung auf.

6.5 Einfluß von TSH auf Funktion und Morphologie der Schilddrüse *in-vivo*

Ziel der tierexperimentellen Studien war es ein *in-vivo* Modell zur Untersuchung des Einflusses veränderter Thyreotropin (TSH)-Konzentration auf die Histomorphologie der Thyreozyten zu untersuchen.

Sprague-Dawley-Ratten wurden kontinuierlich bzw. pulsatil entweder mit TRH (2µgTRH in 100µl 0.9% NaCl) oder mit NaCl alle 2 Stunden für 7 Tage infundiert. Als zusätzliche Kontrolle des TSH-Einflusses auf die Schilddrüsenproliferation und -morphologie wurden die Tiere entweder 2 Tage vor der Infusion mit 10µg Thyroxin/100 g Körpergewicht/Tag (negative Kontrolle) oder mit 0.1% PTU im Trinkwasser für 7 Wochen (positive Kontrolle) behandelt. Im Vergleich zur NaCl-Infusion sind TSH-Plasmakonzentrationen nach der 7 Tage TRH-Infusion fast verdoppelt ($p < 0.001$). In den TRH-Gruppen sind T4-Plasmakonzentrationen signifikant erhöht ($p < 0.001$), während Triiodothyronin (T3) keine Veränderung im Vergleich zu NaCl-Gruppen zeigte. Keine signifikante Veränderung im Schilddrüsengewicht und in der intrathyreoidalen Jodkonzentration ist feststellbar, die prozentuale Markierung von 5-Bromo-2'-desoxyuridin, welches die Proliferationsrate der Zellen indiziert, ist signifikant höher in den TRH- und PTU-Gruppen im Vergleich zu Kontrollen ($p < 0.001$). Ultrastrukturelle Untersuchungen

haben gezeigt, daß eine signifikante Erhöhung der Anzahl von Lysosomen und ein erhöhtes Verhältnis zwischen den Flächen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Zytoplasmas nach der 7-tägigen Behandlung von TRH im Vergleich zu NaCl feststellbar sind ($p < 0.001$). Mittels Immunogold-Markierung wurde Thyreoglobulin (Tg) als Hauptprodukt innerhalb ER cisternae nachgewiesen. Die Anzahl der Goldpartikel ist signifikant höher in der TRH-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0.001$). Zusammenfassend führte eine kurzfristige TRH-Infusion zu einer verdoppelten immunoreaktiven TSH-Plasmakonzentration, welche wiederum eine erhöhte Proliferationsrate, eine Hypertrophie der Thyreozyten durch eine ultrastrukturelle Veränderung, eine erhöhte periphere T4-Konzentrationen und eine erhöhte intrathyreoidale Tg-Produktion induzierte. Die Daten haben gezeigt, daß eine Veränderung der TSH-Plasmakonzentration im physiologischen Bereich ultrastrukturelle Veränderungen der Thyreozyten verursachen kann.

Ein weiterer Versuchsansatz war die Vergleiche zwischen einer hypophysären speziesspezifischen und einer rekombinanten humanen TSH-Präparation jeweils in einer niedrigen und einer hohen Konzentration. Durch den Vergleich der rekombinanten humanen Präparation mit der rasch metabolisierten TSH-Präparation erfolgt somit eine Gegenüberstellung eines verzögerten und eines raschen Abfalls der Thyreotropinplasmaspiegel nach pulsatilem Applikation.

Unsere Daten haben gezeigt, daß Sensitivierung oder Desensitivierung innerhalb des untersuchten Systems vom jeweiligen Applikationsmodus (kontinuierlich vs pulsatil), von der verwendeten Dosis (niedrigdosiert vs hochdosiert) und von der eingesetzten Präparation, Ratten-TSH (rTSH) vs rekombinantes humanes TSH (rec hTSH), abhängt. Unter niedrigdosierter Infusion des rTSH ergab sich kein Vorteil eines der beiden Infusionsmodi gegenüber der Kontrollsituation. Durch eine hochdosierte Infusion unter Beibehaltung der TSH-Präparation ließ sich eine Effektivität der pulsatilen gegenüber der kontinuierlichen Gabe erkennen, welche durch höhere T4-Plasmaspiegel und höhere T4-Antwort auf den rTSH-Bolus gekennzeichnet sind.

Unter rec-hTSH-Infusion verschiebt sich die thyreoidale Antwort von Tag 2 auf den Tag 4. Innerhalb dieser Zeitspanne führte eine kontinuierliche Infusion zu einem Abfall, während die pulsatile Infusion einen Anstieg der peripheren T4-Plasmakonzentrationen induziert. Durch den am Ende des Versuches verabreichten Bolus konnte keine weitere Erhöhung der T4-Werte erzielt werden, sondern ein Abfall der T4-

Konzentration. Diese Desensitivierung kann durch die lange Plasmahalbwertszeit der eingesetzten rekombinanten TSH-Präparation erklärt werden.

6.6 Einfluß von Jodzufuhr und Radiatio auf die Schilddrüse

Ziel der tierexperimentellen Studien war es ein *in-vivo* Modell zur Untersuchung der Schilddrüsenkarzinogenese aufzubauen, um an diesen Tieren die Bedeutung früher Marker der thyreoidalen Karzinogenese zu prüfen.

Die Untersuchungen wurden an männlichen SPRD-Ratten, (Stamm der Medizinischen Hochschule Hannover; Alter 30 Tage zu Beginn der Studien) durchgeführt, die mit einer Standarddiät von 7 µg I / 100g KG/d (Jn) oder jodarmer Kost von 420 ng I / 100g KG/d (Jm) bzw. jodreicher Nahrung (KJ Substitution im Trinkwasser 72 µg I / 100g KG/d, Ju) gefüttert wurden. Im Alter von 40 Tagen wurde extern mit 125 keV (Applikation mittels Lochblende 15 mm und aufgesetztem Tubus) in einer Dosis von 1.0 – 6.0 Gy bestrahlt.

Ein Jodüberschuß führt zu einer deutlichen Erhöhung der TSH-Plasmaspiegel im Vergleich zu Kontrolltieren. Plasmaspiegel von T3 und T4 waren in beiden Gruppen nicht signifikant verändert, während in der Gruppe der Jodmangeltiere eine deutliche Verminderung der T3 erfolgte aber auch in einem geringeren Ausmaß die T4-Plasmaspiegel abfielen. Parallel zum Abfall der Schilddrüsenhormone stiegen nach ca. 10 Wochen im Jodmangel die TSH-Plasmaspiegel an.

Nach der Bestrahlung und zweijähriger Latenzzeit bildeten die Jodmangelschilddrüsen in 25% der Fälle Karzinome aus. Hochdosisbestrahlung führte zur vollständigen Zerstörung der Follikelstruktur in der durch chronischen Jodmangel vorgeschädigten Schilddrüse. Nach der Bestrahlung und zweijähriger Latenzzeit bildeten die Schilddrüsen der jodbehandelten Tiere in 50% der Fälle Karzinome aus. Niedrige Strahlendosen induzierten follikuläre, hohe Strahlendosen vorwiegend papilläre Karzinome. Die histomorphologischen und funktionellen Parameter blieben nach Niedrigdosisbestrahlung stabil auf dem Niveau der nichtbestrahlten, jodbehandelten Gruppe.

Euthyreose bietet den besten Schutz vor Strahlenfolgeschäden. In den jodnormalernährten Ratten bildeten sich nach zweijähriger Latenzzeit nur in 25% der Fälle benigne Neoplasien, es waren aber keine Karzinome zu diagnostizieren.

7 Literatur

- Aasland R, Lillehaug JR, Male R, Josendal O, Varhaug JE, Kleppe K:** Expression of oncogenes in thyroid tumours: coexpression of c-erbB2/neu and c-erbB. *Br J Cancer* 57 (1988): 358-363
- Alkon DL, Rasmussen H:** A spatial-temporal model of cell activation. *Science* 239 (1988): 998-1005
- Antoku K, Liu Z, Johnson DE:** Inhibition of caspase proteases by CrmA enhances the resistance of human leukemic cells to multiple chemotherapeutic agents. *Leukemia* 11 (1997): 1665-1672
- Astwood EB:** Action of certain sulfonamides and of thiourea upon the function of the thyroid gland of the rat. *Endocrinology* 32 (1943) 210-221
- Axelrad AA, Leblond CP:** Induction of thyroid tumors in rats by a low iodine diet. *Cancer (Philad.)* 8 (1955): 339-367
- Bakke JL & Lawrence N:** Circadian periodicity in thyroid stimulating hormone titer in rat hypothyroidism and serum. *Metabolism* 14 (1965): 841-843
- Barsky SH, Toga S, Garbisa S, Liotta LA:** Type IV collagenase immunoreactivity in invasive breast carcinoma. *Lancet* 1 (1983): 296-297
- Beere HM, Tomlinson S, Bidey SP:** Iodide autoregulation of functional and morphological differentiation events in the FRTL-5 rat thyroid cell strain. *J Endocrinol* 124 (1990): 19-25
- Behrens J, Löwrick O, Klein-Hitpass L, Birchmeier W:** The E-cadherin promoter: functional analysis of a G-C-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991): 11495-99
- Behrens J; Vakaet ; Friis R; Winterhager E; Van-Roy F; Mareel MM; Birchmeier W:** Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell-Biol.* 120 (1993): 757-66
- Bielschowsky F:** Neoplasia and internal environment. *Brit J Cancer* 9 (1955) 80-116
- Berman MI, Thomas Jr CG, Manjunath P, Sairam MR, Nayfeh:** The role of the carbohydrate moiety in thyrotropin action. *Biochem Biophys Res Commun* 133 (1985): 680-687
- Bigorie B, Guillausseau P, Leger A, Guillausseau C, Guy-Grand B, Bour H:** Paradoxical effects of iodine overload on thyroid function. (Article in French) *Ann Med Interne (Paris)* 127 (1976)
- Birkedahl-Hansen H, Moore W, Bodden M, Winsor L, Birkedahl-Hansen B, DeCarlo A, Engler J:** Matrix metalloproteinases: A review. *Crit Rev Oral Biol Med* 4 (1993): 197-250
- Black EG, Sheppard MC, Hoffenberg R:** Control of thyroglobulin secretion from rat thyroid gland. *J. Endocrinol* 101 (1984): 107-111
- Boorman GA, Noord MJ van, Hollander CF:** Naturally occurring medullary thyroid carcinoma in the rat. *Arch Path* 94 (1972): 35-41
- Borden P, Heller RA:** Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 7 (1997):159-178
- Brabant G, Ocran K, Ranft U, von zur Mühlen A, Hesch RD:** Physiological Regulation of thyrotropin. *Biochimie* 71 (1989): 293-301
- Brabant G, Prank K, Ranft U, Schuermeyer T, Wagner TO, Hauser H, Kummer B, Feistner H, Hesch RD, von zur Mühlen A:** Physiological regulation of circadian and pulsatile thyrotropin secretion in normal man and woman. *J Clin Endocrinol Metab* 70 (1990): 403-409
- Brabant G, Maenhaut C, Köhrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, von zur Mühlen A, Vassart G, Dumont JE:** Human thyrotropin receptor gene: expression in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. *Mol Cell Endocrinol* 82 (1991): R7-12

- Brabant G, Bergmann P, Kirsch CM, Köhrle J, Hesch RD, Von zur Mühlen A:** Early adaptation of thyrotropin and thyroglobulin secretion to experimentally decreased iodine in man. *Metabolism* 41 (1992): 1093-1096
- Brabant G; Hoang-Vu C; Cetin Y; Dralle H; Scheumann G; Molne J; Hansson G; Jansson S; Ericson LE; Nilsson M:** E-cadherin: a differentiation marker in thyroid malignancies. *Cancer Res* 53 (1993): 4987-4993
- Brabant G; Hoang-Vu C; Behrends J; Cetin Y; Pötter E; Dumont JE; Maenhaut C** Regulation of the cell-cell adhesion protein, E-cadherin, in dog and human thyrocytes in vitro. *Endocrinology*. 136(1995):3113-3119
- Braunhut SJ, Moses MA:** Retinoids modulate endothelial cell production of matrix-degrading proteases and tissue inhibitors of Metalloproteinase (TIMP). *J Biol Chem*. 269 (1994): 13472-13479
- Bray GA:** Increased sensitivity of the thyroid in iodine-depleted rats to the goitrogenic effects of thyrotropin. *J Clin Invest* 47 (1968): 1640-1647
- Bröcker M, de Buhr I, Papageorgiou G, Schatz H, Derwahl M:** Expression of apoptosis-related proteins in thyroid tumors and thyroid carcinoma cell lines. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104 (1996): 20-23
- Bruhn TO, McFarlane MB, Deckey JE, Jackson IMD:** Analysis of pulsatile secretion of thyrotropin and growth hormone in the hypothyroid rats. *Endocrinology* 131 (1992): 2615-2621
- Bull K, Schwarz I, Krause G, Aust G, Sitka U, Dralle H, Hoang-Vu C:** CD97 expression in the human thyroid carcinoma cell line 8505C: An immunohistochemical study. *Exp Clin Endocrinol & Diabetes* 106, Suppl 1 (1998):83
- Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G:** Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 154 (1995): 2706-2713
- Casino I, Papoff G, De Maria R, Testi R, Ruberti G:** Fas/APO-1 (CD95) receptor lacking the intracytoplasmic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J Immunol* 156 (1996): 13-17
- Chabrolle JP, Rossier A:** Goitre and hypothyroidism in the newborn after cutaneous absorption of iodine. *Arch Dis Child* 53 (1978): 495-498
- Chamoin J-P, Braverman LE, Farwell AP, Safran M, Alex S, Dubord S, Leonard JL:** The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. *J Clin Invest* 91 (1993): 2079-2713
- Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD:** Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 263 (1994): 1759-1762
- Chirgwin J, Przybyla A, MacDonald R, Rutter W:** Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18 (1979): 5294-5300
- Christov K, Raichev R:** Experimental thyroid carcinogenesis. In: *Current topics in pathology*, Vol. 56, Springer-Verlag, Berlin, 1972
- Clark OH, Cavalieri RR, Moser C, Ingbar SH:** Iodide-induced hypothyroidism in patients after thyroid resection. *Eur J Clin Invest* 20 (1990): 573-580
- Clark RG, Jansson JO, Isaksson O, Robinson IC:** Intravenous growth hormone: growth responses to patterned infusions in hypophysectomized rats. *J Endocr* 104 (1985), 53-61
- Constant RB, Weintraub B:** Differences in the metabolic clearance of pituitary and serum thyrotropin (TSH) derived from euthyroid and hypothyroid rats: effects of chemical deglycosylation of pituitary TSH. *Endocrinology* 119 (1986): 2720-2727
- Correa P, Welsh RA:** The effect of excessive iodine intake on the thyroid gland of the rat. *Arch Path* 70 (1960): 247-251
- Davies PH, Franklyn JA:** The effects of drugs on tests of thyroid funktion. *Eur J Clin Pharmacol* 40 (1991): 439-451
- Debelke D, van Sande J, Cochaux P:** Effect of thyrotropin releasing hormone on dog thyroid in vitro. *Biochem Biophys Acta* 761 (1983): 262
- de Bustros A, Ball DW, Peters R, Compton D, Nelkin BD:** regulation of human gene transcription by cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 189 (1992): 1157-1164

- Della-Porta G, Terracini B:** Chemical carcinogenesis in infant animals. *Progr Exp Tumor Res* 11 (1969): 334-363
- Dhom G:** Drüsen mit innerer Sekretion: B. Schilddrüse. In: Eder M, Gedigk P (Eds.): *Allgemeine und pathologische Anatomie*. 33. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 1990, S.476-485
- Domann FE, Freitas MA, Gould MN, Clifton KH:** Quantifying the frequency of radiogenic thyroid cancer per clonogenic cell in vivo. *Rad Res* 137 (1994): 330-337
- Doniach I:** Comparison of the carcinogenetic effect of X-irradiation with radioactive iodine on the rats thyroid. *Br J Cancer* 11 (1957): 67-76
- Doniach I:** Experimental induction of tumors of the thyroid by irradiation. *Brit Med Bull* 14 (1958): 181-183
- Dralle H, Böcker W, Döhler KD, Schröder S, Haindl H, Geerlings H, Schwarzrock R, Pichmayr R:** Growth and function of 34 human benign and malignant thyroid xenografts in untreated nude mice. *Cancer Res* 45 (1985a): 1239-1245
- Dralle H, Schwarzrock R, Lang W, Böcker W, Ziegler H, Schröder S, Geerlings H:** Comparison of histology and immunohistochemistry with thyroglobulin serum levels and radioiodine uptake in recurrences and metastases of differentiated thyroid carcinomas. *Acta Endocrinol* 108 (1995b): 504-510
- Dralle H:** In vivo effect of thyroid stimulating hormone on human thyroid tissue in nude mice. *Front Horm Res* 18 (1989): 109-122
- Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C:** Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol Rev* 73 (1992): 667-697
- Duprez L, Parma J, van Sande J, Allgeier A, Leclère J, Schwartz C, Deslisle M-J, Decoulx M, Orgiarry J, Dumont J, Vassart G:** Germline mutations in the thyrotropin receptor gene cause non-autoimmune autosomal dominant hyperthyroidism. *Nature Genetics* 7 (1994): 396-401
- East-Palmer J, Szkulinski MW, Lee J, Thotakura NR, Weintraub BD:** A novel non-radioactive in vivo bioassay of thyrotropin (TSH). *Thyroid* 5 (1995): 55-59
- Eggo MC, Bachrach LR, Fayet G, Errick JE, Kudlow JE, Cohen MF, Burrow GN:** The effects of growth factors and serum on DNA synthesis and differentiation in thyroid cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 38 (1984): 141-150
- Ellis GB, Desjardin C:** Male rats secrete luteinizing hormone and testosterone episodically. *Endocrinology* 110 (1982): 1618-1627
- Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Bravermann LE:** Escape from acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodine symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 140 (1999): 3404-3410
- Erikson VJ, Cavalieri RR, Rosenberg LL:** Thyroxine-5'-deiodinase of rat thyroid but not that of liver, is dependent on thyrotropin. *Endocrinology* 111 (1982): 434-440
- Esmarch O:** Deposition of methylcholanthrene in some organs of the rat. *Acta Path Microbiol Scand* 19 (1942) 79-99
- Fang WT, Qao BS, Wang JB:** Iodine deficiency induces thyroid cancer in rats and mice. *Sci Sin* 37 (1994): 341-344
- Fayet G, Hovsepian S, Dickson JG, Lissitzky S:** Reorganization of porcine thyroid cells into functional follicles in a chemically defined serum- and thyrotropin-free medium. *J Cell Biol* 93 (1982): 479-488
- Fayet G, Hovsepian S:** Reconstruction of the thyroid follicle with long-term cultured cells. *Thyroidology* 3 (1991): 123-125
- Fidler IJ, Ellis LM:** The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79 (1994): 185-188
- Fidler IJ, Wilmanns C, Staroselsky A, Radinsky R, Dong Z, Fan D:** Modulation of tumor cell response to chemotherapy by the organ environment. *Cancer Metastasis Rev* 13 (1994): 209-222
- Fisher RP, Morgan DO:** A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* 78 (1994): 713-724

- Frick KK, Womer RB, Scher CD:** Platelet-derived growth factor-induced c-myc RNA expression. Analysis of an inducible pathway independent of protein kinase C. *J Biol Chem* 263 (1988) 2948-2952
- Frick KK, Scher CD:** Platelet-derived growth factor-stimulated c-myc RNA accumulation in MG-63 human osteosarcoma cells is independent of both protein kinase A and protein kinase C. *Mol Cell Biol* 10 (1990:) 184-192
- Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM:** Involvement of CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med* 2 (1996):574-577
- Friesen C, Fulda S, Debatin KM:** Deficient activation of the CD95 (APO-1/Fas) system in drug-resistant cells. *Leukemia* 11(1997): 1833-1841
- Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Lochner D, Birchmeier W:** E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113 (1991): 173-185
- Fukuda H, Greer MA, Roberts L, Allen CF, Critchlow V, Wilson M:** Nyctohemeral and sex-related variations in plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine. *Endocrinology* 97 (1975) 1424-1431
- Fulda S, Friesen C, Los M, Scaffidi C, Mier W, Benedict M, Nunez G, Krammer PH, Peter ME, Debatin KM:** Betulinic acid triggers CD95 (APO-1/Fas)- and p53-independent apoptosis via activation of caspases in neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 57 (1997): 4956-4964
- Furth J:** Concepts of thyroïdal carcinogenesis. Interpretation of events. Needed research. In: Hedinger C (Ed.): *Thyroid cancer. UICC Monograph series, Vol. 12*, Springer-Verlag, Berlin, 1969, S.171-174
- Gärtner R, Greil W, Demharter P, Horn K:** Involvement of cyclic AMP, iodine and metabolites of arachidonic acid in the regulation of cell proliferation of isolated porcine thyroid follicles. *Mol Cell Endocrinol* 42 (1985): 145-155
- Gärtner R, Dugrillon A:** Von Jodmangel zur Struma. *Internist* 39 (1998): 566-573
- Galton VA, Pitt-Rivers R:** The effect of excessive iodine on the thyroid gland of the rat. *Endocrinology* 64 (1959): 835
- Galway AB, Hsueh AJW, Keene JL, Yamoto M, Fauser BCJM, Boime I:** In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology* 127 (1990): 93-100
- Geneser F:** *Textbook of Histology*. Munksgaard, Kopenhagen, 1986
- Gilbert C, Gillman J:** Spontaneous neoplasms in the albino rat. *Sth Afr J Med Sci* 23 (1958): 257-272
- Gerard CM, Lefort A, Christophe D, Libert F, Van Sande J, Dumont JE, Vassart G:** Control of thyroperoxidase and thyroglobulin transcription by cAMP: evidence for distinct regulatory mechanisms. *Mol Endocrinol* 12 (1989): 2110-2118
- Gerber H, Studer H, Conti A, Engler H, Kohler H, Haeberli A:** reaccumulation of thyroglobulin and colloid in rat and mouse thyroid follicles during intense thyrotropin stimulation. A clue to the pathogenesis of colloid goiters. *J Clin Invest* 68 (1981): 1338-1347
- Goretzki P, Frilling A, Simon D, Rastegar M, Ohmann C:** Growth regulation of human thyrocytes by thyrotropin, cyclic adenosine monophosphate, epidermale growth factor and insulin-like growth factor. *Front Horm Res* 18 (1989): 56-80
- Gray JX, Haino M, Roth MJ:** CD97 is a processed, seven-transmembrane, heterodimeric receptor associated with inflammation. *J Immunol* 157 (1996): 5438-5447
- Gress TM, Müller-Pillasch F, Lerch MM, Friess H, Büchler M, Adler G:** Expression and in-situ localization of genes coding for extracellular matrix proteins and extracellular matrix degrading proteases in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 62 (1995): 407-413
- Griepentrog F:** Tumorartige Schilddrüsenveränderungen in chronisch-toxikologischen Tierversuchen mit Thiuramen. *Beitr Path Anat* 126 (1962) 243-255
- Griesbach WE, Chaikoff IL, Nichols W, Golberg RC:** Formation of adenomata in hypophyses of rats subjected to both subtotal thyroidectomy and administration of J^{131} and its prevention by feeding of disiccated thyroid. *Cancer Res* 25 (1965): 1804-1816

- Grigioni WF, Garbisa S, D'Errico A, Baccarini P, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Mancini AM:** Evaluation of hepatocellular carcinoma aggressiveness by a panel of extracellular matrix antigens. *Am J Pathol* 138 (1991): 647-654
- Gyves PW, Gesundheit N; Thotakura NR, Stannard BS, DeCherney GS, Weintraub BD:** Changes in the sialylation and sulfation of secreted thyrotropin in congenital hypothyroidism. *Proc Natl Acad Sci USA* 87 (1990): 3792-3796
- Guzy JK, Rapp K:** Zum Energie- und Rohproteinbedarf der Han: Sprague-Dawley-Ratte während der Aufzucht und Zucht. *Tierlaboratorium* 2 (1975): 44-57
- Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Yasin M, Matshall JC:** Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 130 (1992):2917-2923
- Hall P:** Radiation-induced thyroid cancer. *Med Oncol Tumor Pharmacother* 4 (1992): 183-189
- Hamann J, Eichler W, Hamann D, Kerstens HM, Poddighe PJ, Hoovers JM, Hartmann E, Strauss M, van Lier RA:** Expression cloning and chromosomal mapping of the leukocyte activation antigen CD97, a new seven-span transmembrane molecule of the secretion receptor superfamily with an unusual extracellular domain. *J Immunol* 155 (1995): 1942-1950
- Hamann J, Vogel B, van Schindel GM, van Lier RA:** The seven span transmembrane receptor CD97 has a cellular ligand (CD55, DAF). *J Exp Med* 184 (1996): 1185-1189
- Hansen C, Gerard C, Vassart G, Stordeur P, Christophe D:** Thyroid-specific and cAMP-dependent hypersensitive regions in thyroglobulin gene chromatin. *Eur J Biochem* 178 (1988): 387-393
- Hecker E:** Aktuelle Probleme der Krebsentstehung. *Z Krebsforsch* 78 (1972) 99-122
- Hennings H, Boutwell RK:** Studies on the mechanism of skin tumor promotion. *Cancer Res* 30 (1970): 312-320
- Herr I, Wilhelm D, Böhler T, Angel P, Debatin KM:** Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO J* 16 (1997): 6200-6208
- Hill RN, Erdreich LS, Panther OE, Roberts PA, Rosenthal SL, Wilkinson CF:** Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fund Appl Toxicol* 12 (1989): 629-697
- Hoang-Vu C, Dralle H, Schröder S, Oertel M, Köhrle J, Hesch R-D, von zur Mühlen A, Brabant G:** The nude rat is established as a model for endocrine studies: Regulation of thyroid function and xenotransplantation of a thyroid tumor cell line. *Lab Anim Sci* 42 (1992): 169-172
- Hoang-Vu C, Cetin Y, Scheumann GFW, Behrends J, Horn R, von zur Mühlen A, Dralle H, Brabant G:** Expression of the cellular adhesion molecule E-cadherin in normal human thyrocytes, and in differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *Exp Clin Endocrinol* 101 (1993): 78-82
- Hoang-Vu C, Brabant G, Leitolf A, Von zur Mühlen A, Dralle H, Sierralta WD:** Small increases of TSH or iodine deficiency lead to identical ultrastructural changes of the thyrocytes: A model for goitrogenesis. *Exp Clin Endocrinol* 103 (1995a): 28.
- Hoang-Vu C, Brabant G, Leitolf A, von zur Mühlen A, Dralle H, Schröder S, Sierralta WD:** Functional and morphological changes of the thyroid gland following 5 days of pulsatile TRH stimulation in male rats. *J Endocrinol* 146 (1995b): 339-348
- Hofmann A, Laue S, Rost AK, Scherbaum WA, Aust G:** mRNA levels of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), MMP-2, and MMP-9 and of their inhibitors TIMP-2 and TIMP-3 in normal thyrocytes and thyroid carcinoma cell lines. *Thyroid* 8 (1998): 203-214
- Hofmann C, Oslapas R, Nayyar R, McCall A, Paloyan E:** Testosterone enhancement of thyroid carcinoma in rats: the role of TSH. *Surgery* 100 (1986): 1078-1087
- Hoschuetzky H; Aberle H; Kemler R** Beta-catenin mediates the interaction of the cadherin-catenin complex with epidermal growth factor receptor. *J Cell Biol* 127 (1994): 1375-80
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S:** The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66 (1991): 233-243
- Jeng MJ, Lin CY, Soong WJ, Hsiao KJ, Hwang B, Chiang SH:** The effect of povidone-iodine on thyroid function of neonates with different birth sizes. *Sci Sin* 41 (1998): 371-375

- Katoh R, Muramatsu A, Kawaoi A, Komiyama A, Suzuki K, Hemmi A, Katayama S:** Alteration of basement membrane membrane in human thyroid diseases: an immunohistochemical study of type IV collagen, laminin and heparan sulphate proteoglycan. *Virchows Arch A Pathol Anat* 423 (1993): 417-424
- Kessler FH, Krüskemper HL:** Experimentelle Schilddrüsentumoren durch mehrjährige Zufuhr von Kaliumperchlorat. *Klin Wschr* 44 (1966) 1154-1156
- Klindt J, David SL, Ohlson DL:** Plasma concentration of thyrotropin releasing hormone, thyrotropin, prolactin and growth hormone during 5 days osmotic pump infusion of thyrotropin releasing hormone. *Endocrinology* 104 (1979): 45-49
- Klugmann T, Mons T, Wenzel BE:** Discontinuous and continuous stimulation of FRTL-5 thyroid cells with bTSH cause different cAMP and nuclear proliferation antigen responses. *Acta Endocrinol* 126 (1992) 535-540
- Köhrle J:** Thyrotropin (TSH) action on thyroid hormone deiodination and secretion: one aspect of thyrotropin regulation of thyroid cell biology. *Horm Metab Res (Suppl)* 23 (1990): 18-28
- Kraiem Z, Sadeh O, Sobel E:** Thyrotropin, acting at least partially via adenosine 3',5'-monophosphate, exerts both mitogenic and antimitogenic effects in cultured human thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab* 70 (1990): 497-502
- Krammer PH:** The tumor strikes back: new data on expression of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system may cause paradigm changes in our view on drug treatment and tumor immunology. *Cell Death Diff* 4 (1997): 362-364
- Koutras DA:** Control of efficiency and results, and adverse effects of excess iodine administration on thyroid function. *Ann Endocrinol (Paris)* 57 (1996): 463-469
- Lamy F, Lecocq R, Dumont JE:** Action of thyrotropin on phosphate incorporation into thyroid proteins in vitro. *Ann Endocrinol* 39 (1978): 129-130
- Lamy F, Roger PP, Lecocq R, Dumont JE:** Differential protein synthesis in the induction of thyroid cell proliferation by thyrotropin, epidermal growth factor or serum. *Eur J Biochem* 155 (1986): 265-272
- Lamy F, Taton M, Dumont JE, Roger PP:** Control of protein synthesis by thyrotropin and epidermal growth factor in human thyrocytes: role of morphological changes. *Mol Cell End* 73 (1990): 195-209
- Lauerberg P, Pedersen KM, Hreidarsson A, Sigfusson N, Iversen E, Knudsen PR:** Iodine intake and the pattern of thyroid disorders: a comparative epidemiological study of thyroid abnormalities in the elderly in Iceland and in Jutland, Denmark. *J Clin Endocrinol Metab* 83 (1998): 765-769
- Levy AT, Cioce V, Sobel ME, Spiridone G, Grigoioni VF, Liotta LA:** Increased expression of the Mr 72.000 type-IV collagenase in human colonic adenocarcinoma. *Cancer Res* 51 (1991): 439-444
- Lindsay S, Sheline GE, Potter GD, Chaikoff IL:** Induction of neoplasms in the thyroid gland of the rat by X-irradiation of the gland. *Cancer Res* 21 (1961): 9-16
- Lindsay S, Nichols CW, Chaikoff IL:** Naturally-occurring thyroid carcinoma in the rat. *Arch Path* 88 (1968): 353-364
- Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S:** Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284 (1980): 67-68
- Liotta LA, Stetler-Stevenson WG:** Metalloproteinases and cancer invasion. *Cancer Biol* 1 (1990): 99-106
- Liotta LA, Steeg P, Stetler-Stevenson WG:** Cancer metastasis and angiogenesis: An imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64 (1991): 327-336
- Liu ZH, Fu CS, Li ZK, Chi YC, Song YF, Gao FM, Liu XT, Wei LX:** Study on late effects of radioiodine on rats. *Sci Sin* 29 (1986): 1039-1053
- Liu C, Cheng J, Mountz JD:** Differential expression of human Fas mRNA species upon peripheral blood nonnuclear cell activation. *Biochem J* 310 (1995): 957-963
- Los M, Herr I, Friesen C, Fulda S, Schulze-Osthoff K, Debatin KM:** Cross-resistance of CD95- and drug-induced apoptosis as a consequence of deficient activation of caspases (ICE/Ced-3 proteases). *Blood* 90 (1997): 3118-3129

- Maenhaut C, Lefort A, Libert F, Parmentier M, Raspe E, Roger P, Corvilain B, Laurent E, Reuse S, Mockel J:** Function, proliferation and differentiation of the dog and human thyrocyte. *Horm Metab Res Suppl* 23 (1990): 51-61
- Maenhaut C, Roger PP, Reuse S, Dumont JE:** Activation of the cyclic AMP cascade as an oncogenic mechanism: The thyroid example. *Biochimie* 73 (1991): 29-36
- Maenhaut C, Brabant G, Vassart G, Dumont JE:** In vitro and in vivo regulation of thyrotropin receptor mRNA levels in dog and human thyroid cells. *J Biol Chem* 267 (1992): 3000-3007
- Matrisian LM:** Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet* 6 (1990): 121-125
- Matuoka K, Fukami K, Nakanishi O, Kawai S, Takenawa T:** Mitogenesis in response to PDGF and bombesin abolished by microinjection of antibody to PIP2. *Science* 239 (1988): 640-643
- McCoy GW:** A preliminary report on tumors found in wild rats. *J Med Res* 21 (1909): 285-296
- McKenzie JM:** The bioassay of thyrotropin in serum. *Endocrinology* 63 (1958): 372-382
- MacKenzie CG, MacKenzie IB:** Effect of sulfonamides and thioureas on the thyroid gland and basal metabolism. *Endocrinology* 32 (1943) 185-192
- McKnight AJ, Gordon S:** EGF-TM7: a novel subfamily of seven-transmembrane-region leucocyte cell-surface molecules. *Immunol Today* 17 (1996): 283-287
- Meck RA, Chen MS, Kenny PJ:** Criteria for the administration of KI for thyroid blocking of radioiodine. *Health Phys* 48 (1985): 141-157
- Menezes-Ferreira MM, Petrick PA, Weintraub BD:** Regulation of thyrotropin (TSH) bioactivity by TSH-releasing hormone and thyroid hormone. *Endocrinology* 118 (1986): 2125-2130
- Mignatti P, Rifkin DB:** Biology and biochemistry of proteinases in tumour invasion. *Physiol Rev* 73 (1993): 161-195
- Milcu SM, Petrea I:** Stress as an oncogenic factor in thyroid experimental carcinoma. *Acta Biol Med Germ* 3 (1959) 519
- Mooij P, de Wit HJ, Bloot AM, Wilders-Truschnig MM, Drexhage HA:** Iodine deficiency induces thyroid autoimmune reactivity in Wistar rats. *Endocrinology* 133 (1993): 1197-1204
- Muller D, Wolf C, Abecassis J, Millon R, Engelmann A, Bonner G, Rouyer N, Rio MC, Eber M, Methlin G, Chambon P, Basset P:** Increased stromelysin 3 gene expression is associated with increased local invasiveness in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 53 (1993): 165-169
- Munari-Silem Y; Mesnil M; Selmi S; Bernier-Valentin F; Rabilloud R; Rousset B:** Cell-cell interactions in the process of differentiation of thyroid epithelial cells into follicles: a study by microinjection and fluorescence microscopy on in vitro reconstituted thyroid follicles. *J Cell Physiol.* 145 (1990): 414-27
- Nadler NJ, Mandavia MG, Leblond CP:** Influence of preirradiation on thyroid tumorigenesis by low-iodine diet in the rat. In: Hedinger C (Ed.): *Thyroid cancer*. UICC Monograph series, Vol. 12, Springer-Verlag, Berlin, 1969, S.125-130
- Nagafuchi A, Takeichi M:** Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. *EMBO J* 12 (1988): 3679-3684
- Nagata S:** Fas ligand and immune evasion: expression of death factor by tumor cells may explain their escape from immune attack. *Nature Med* 2 (1996):1306-1307
- Nagata S, Golstein P:** The Fas death factor. *Science* 267 (1995):1449-1456
- Napalkov NP:** On blastogenic effect of antithyroid drugs. In: Truhaut R (Ed.): *Potential carcinogenesis hazards from drugs*. UICC Monograph series, Vol. 7, Springer-Verlag Berlin, 1967, S.172-179
- Napalkov NP:** Thyroid tumorigenesis in rats treated with 6-Methylthiouracil for several successive generation. In: Hedinger C (Ed.): *Thyroid cancer*. UICC Monograph series, Vol. 12, Springer-Verlag, Berlin, 1969, S.134-140
- Nève P, Dumont JE:** Time sequence of ultrastructural changes in the stimulated dog thyroid. *Z Zellforsch* 103 (1970): 61-74
- Nilsson M:** Integrity of the occluding barrier in high-resistant thyroid follicular epithelium in culture. I. Dependence of extracellular Ca²⁺ is polarized. *Eur J Cell Biol* 56 (1991): 295-307

- Nilsson M, Mölne J, Ericson LE:** Integrity of the occluding barrier in high-resistant thyroid follicular epithelium in culture. II. Immediate protective effect of TSH on paracellular leakage induced by Ca²⁺ removal and cytochalasin b. *Eur J Cell Biol* 56 (1991): 308-18
- Nilsson M, Ericson LE:** Effects of epidermal growth factor on basolateral iodide uptake and apical iodide permeability in filter-cultured thyroid epithelium. *Endocrinology* 135 (1994): 1428-36
- Nitsch L, Wollmann SH:** Thyrotropin preparation are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (1980): 2743-2747
- Nollet F, Berx G, Molemans F, van Roy F:** Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics* 32 (1996): 413-424
- Ozawa S, Sheflin LG, Spaulding SW:** Thyroxine increases epidermal growth factor levels in the mouse thyroid in vivo. *Endocrinology* 128 (1991): 1396-1403
- Pan G, O'Rourke K, Chinnaiyan AM, Gentz R, Ebner R, Ni J, Dixit VM:** The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science* 276 (1997a): 111-113
- Pan G, Ni J, Wie YF, Yu QL, Gentz R, Dixit VM:** An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277 (1997b): 815-818
- Papoff G, Cascino I, Eramo A, Starace G, Lynch DH, Ruberti G:** An N-terminal domain shared by Fas/APO-1 (CD95) soluble variants prevents cell death in vitro. *J Immunol* 156 (1996): 4622-4639
- Park K, Kim K:** The site of cAMP action in the insulin induction of gene expression of acetyl-CoA carboxylase is AP-2. *J Biol Chem* 268 (1993): 17811-17819
- Paul T, Meyers B, Witorsch RJ, Pino S, Chipkin S, Ingbar SH, Braverman LE:** The effect of small increases in dietary iodine on thyroid function in euthyroid subjects. *Metabolism* 37 (1988): 121-124
- Pavasuthipaisit K, Norman RL, Ellinwood WE, Oyama TT, Baughman WL, Spies HH:** Different prolactin, thyrotropin, and thyroxine response after prolonged intermittent or continuous infusion of thyrotropin releasing hormone in rhesus monkey. *J Clin Endocrinol Metab* 56 (1983): 541-546
- Peifer M:** Beta-catenin as oncogene: the smoking gun. *Science* 275 (1997): 1752-1753
- Peter ME, Kischkel FC, Hellbardt S, Chinnaiyan AM, Krammer PH, Dixit VM:** CD95 (APO-1/Fas)-associating signalling proteins. *Cell Death Diff* 3 (1996): 161-170
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A:** Induction of apoptosis by APO-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokin family. *J Biol Chem* 271 (1996): 12687-12690
- Pötter E, Schoenermark M, Bock O, Hoang-Vu C, Munari-Silem Y, Rousset B, Brabant G:** Cell adhesion receptors and gap junctions in normal and neoplastic transformed thyrocytes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104(Suppl 4) (1996): 24-28
- Rajewsky MF:** Changes in DNA-Synthesis and cell proliferation during hepato-carcinogenesis by diethylnitrosamine. *Europ J Cancer* 3 (1967): 335-344
- Raspe E, Laurent E, Andry G, Dumont JE:** ATP, bradykinin, TRH and TSH activate the Ca(2+)-phosphatidylinositol cascade of human thyrocytes in primary culture. *Mol Cell Endocrinol* 81 (1991): 175-183
- Ray JM, Stetler-Stevenson WG:** The role of matrix metalloproteases and their inhibitors in tumour invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 7 (1994): 2062-2072
- Reuse S, Roger PP, Vassart G, Dumont JE:** Enhancement of c-myc mRNA concentration in dog thyrocytes initiating DNA synthesis in response to thyrotropin, forskolin, epidermal growth factor and phorbol myristate ester. *Biochem Biophys Res Commun* 141 (1986): 1066-1076
- Reuse S, Maenhaut C, Dumont JE:** Regulation of protooncogenes c-fos and c-myc expressions by protein tyrosine kinase, protein kinase C, and cyclic AMP mitogenic pathways in dog primary thyrocytes: a positive and negative control by cyclic AMP on c-myc expression. *Exp Cell Res* 189 (1990): 33-40
- Ries C, Petrides PE:** Cytokine regulation of matrix metalloproteinase activity and its regulatory dysfunction in disease. *Biol Chem Hoppe Seyler*. 376 (1995): 345-355

- Riesco G, Taurog A, Larsen R, Krulich L:** Acute and chronic responses to iodine deficiency in rats. *Endocrinology* 100 (1977): 303-313
- Roger PP, Dumont JE:** Thyrotrophin and the differential expression of proliferation and differentiation in dog thyroid cells in primary culture. *J Endocrinol* 96 (1983): 241-249
- Roger PP, Servais P, Dumont JE:** Stimulation by thyrotropin and cyclic AMP of the proliferation of quiescent canine thyroid cells cultured in a defined medium containing insulin. *FEBS Lett* 157 (1983): 323-329
- Roger PP, Dumont JE:** Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum concentration: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* 36 (1984): 79-93
- Roger PP, Van Heuverswyn B, Lambert C, Reuse S, Vassart G, Dumont JE:** Antagonistic effects of thyrotropin and epidermal growth factor on thyroglobulin mRNA level in cultured thyroid cells. *Eur J Biochem* 152 (1985): 239-245
- Roger PP, Reuse S, Servais P, van Heuverswyn B, Dumont JE:** Stimulation of cell proliferation and inhibition of differentiation expression by tumor-promoting phorbol esters in dog thyroid cells in primary culture. *Cancer Res* 46 (1986): 898-906
- Roger PP, Servais P, Dumont JE:** Regulation of dog thyroid epithelial cell cycle by forskolin, an adenylate cyclase activator. *Exp Cell Res* 172 (1987a): 282-292
- Roger PP, Servais P, Dumont JE:** Induction of DNA synthesis in dog thyrocytes in primary culture: synergistic effects of thyrotropin and cyclic AMP with epidermal growth factor and insulin. *J Cell Physiol* 130 (1987b): 58-67
- Roger PP, Taton M, van Sande J, Dumont JE:** Mitogenic effects of thyrotropin and adenosine 3',5'-monophosphate in differentiated normal human thyroid cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 66 (1988): 1158-1165
- Rookh HV, Azukizawa M, DiStefano III JJ, Ogihara T, Hershman JM:** Pituitary-thyroid hormone periodicities in serially sampled plasma of unanesthetized rats. *Endocrinology* 104 (1979): 851-856
- Rozengurt E:** Early signals in the mitogenic response. *Science* 234 (1986): 161-166
- Rucklidge GJ, Edwardsen K, Bock E:** Cell-adhesion molecules and metalloproteinases: a linked role in tumour cell invasiveness. *Bioch Soc Trans* 22 (1994): 63-68
- Sairam MR, Li CH:** Human pituitary thyrotropin. Isolation and characterization of the hormone at its subunits. *Can J Biochem* 55 (1977): 747-754
- Schaller RT, Stevenson JK:** Development of carcinoma of the thyroid in iodine-deficient rats. *Cancer* 19 (1966): 1063-1080
- Schlumberger MJ:** Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med* 338 (1998): 297-306
- Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MHG, Key G, Flad HD, Gerdes J:** The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: A very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle maintaining protein. *J Cell Biol* 123 (1993): 513-522
- Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J:** Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* 79 (1994): 791-798
- Sheflin LG, Fucile NW, Ozawa S, Spaulding SW:** Thyroxine increases the levels of epidermal growth factor messenger ribonucleic acid (EGF mRNA) in the thyroid in vivo, as revealed by quantitative reverse transcription polymerase chain reaction with an internal control EGF mRNA. *Endocrinology* 132 (1993): 2319-2324
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A:** Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signalling and decoy receptors. *Science* 277 (1997): 818-821
- Shi Y, Parhar RS, Zou M, Hammami MM, Akhtar M, Lum ZP, Farid NR, Al-Sedairy ST, Paterson MC:** Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) mRNA is elevated in advanced stages of thyroid carcinoma. *Br J Cancer*. 79 (1999): 1234-1239

- Shiozaki H, Kadowaki T, Doki Y, Inoue M, Tamura S, Oka H, Iwazawa T, Matsui S, Shimaya K, Takeichi M, Mori T:** Effect of epidermal growth factor on cadherin-mediated adhesion in a human oesophageal cancer cell line. *Br J Cancer*: 71 (1995): 250-258
- Shupnik MA:** Effects of gonadotropin-releasing hormone on rat gonadotropin gene transcription in vitro: requirement for pulsatile administration for luteinizing hormone- β gene stimulation. *Mol Endocrinol* 4 (1990):1444-1450.
- Simon D, Köhrle J, Schmutzler C, Mainz K, Reiners C, Röher HD:** Redifferentiation therapy of differentiated thyroid carcinoma with retinoic acid: basics and first clinical results. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104 (Suppl 4,1996): 13-5
- Smith MR, Liu YL, Kim H, Rhee SG, Kung HF:** Inhibition of serum- and ras-stimulated DNA synthesis by antibodies to phospholipase C. *Science* 247 (1990): 1074-1077
- Soifer WN:** Molekulare Mechanismen der Wirkung ionisierender Strahlung auf lebende Organismen. In: Soifer WN (Ed.): *Molekulare Mechanismen der Mutagenese und Reparatur*. Akademie-Verlag, Berlin, 1976, S.105-125
- Screaton GR, Monkolsapaya J, Xu XN, Cowper AE, McMichael AJ, Bell JL:** TRICKS2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Curr Biol* 7 (1997): 693-696
- Stepanov SA, Tupikina EB:** Histofunctional state of the thyroid gland in pregnancy and in progeny under experimental regime of iodine intake. *Arkh Patol* 59 (1997): 39-44
- Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Liotta LA:** Tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-2). A new member of the metalloproteinase inhibitor family. *J Biol Chem* 264 (1989a): 17374-17378
- Stetler-Stevenson WG, Kruttsch HC, Wacher MP, Margulie IMK, Liotta LA:** The activation of human type IV collagenase proenzyme. *J Biol Chem* 264 (1989b): 1353-1356
- Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA:** Tumour cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9 (1993): 541-573
- Stoll R, Marand R:** Sur L-inuction de tumeurs thyroïdiennes chez le rat traite´ par le propylthiouracil. *Bull Du Cancer* 50 (1963) 389-398
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Müller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR:** Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells: a mechanism of immune evasion?. *Nature Med* 2 (1996): 1361-1366
- Stübner D, Gärtner R, Bechtner G, Greil W, Gropper G, Brabant G, Permanetter W, Horn K, Pickart CR:** Hypertrophy and hyperplasia during goitre growth and involution in rats—Seperate bioeffects of TSH and iodine. *Acta Endocrinol (Copenh.)* 116 (1987): 537-548
- Suda T, Takahashi T, Goldstein P, Nagata S:** Molecular cloning and expression of the Fas Ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 75 (1993): 1169-1178
- Szkudlinski MW, Thotakura NR, Bucci I, Joshi LR, Tsai A, East-Palmer J, Shiloach J, Weintraub BD:** Purification and characterization of recombinant human thyrotropin (TSH) isoforms produced by Chinese hamster ovary cells: The role of sialylation and sulfation in TSH bioactivity. *Endocrinology* 133 (1993): 1490-1503
- Takeichi M:** Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem* 59 (1990): 237-252
- Takeichi M:** Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251 (1991): 1451-1455
- Taylor T, Weintraub BD:** Altered thyrotropin (TSH) carbohydrate structures in hypothalamic hypothyroidism created by paraventricular nuclear lesions are corrected by in vivo TSH-releasing hormone administration. *Endocrinology* 125 (1989): 2198-2203
- Tamura M, Kimura H, Koji T, Tominaga T, Ashizawa K, Kiriyaama T, Yokoyama N, Yoshimura T, Eguchi K, Nakane PK, Nagataki S:** Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goiter. A possible involvement of Fas system. *Endocrinology* 139 (1998) 3646-3653
- Thomas C, Bollmann R:** Untersuchungen zur diaplazentaren krebserzeugenden Wirkung des Diäthylnitrosamins an Ratten. *Z Krebsforschung* 71 (1968): 129-134
- Thomas JL, Leclere J, Hartemann P, Duheille J, Orgiazzi J, Petersen M, Janot C, Guedenet JC:** Familial hyperthyroidism without evidence of autoimmunity. *Acta Endocrinol* 100 (1982): 512-518

- Thotakura NR, Desai RK, Szkulinski MW, Weintraub BD:** The role of oligosaccharide chains of thyrotropin α - and β -subunits in hormone action. *Endocrinology* 128 (1992): 82-88
- Toda S, Sugihara H:** Reconstruction of thyroid follicles from isolated porcine follicle cells in three-dimensional collagen gel culture. *Endocrinology* 126 (1990): 2027-2034
- Tomita T:** Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in thyroid C-cells and medullary thyroid carcinomas. *Histopathology* 31 (1997): 150-156
- Tramontano D, Chi WW, Moses AC, Ingbar SH:** Thyrotropin and dibutyl cyclic AMP increase levels of c-myc and c-fos mRNAs in cultured rat thyroid cells. *J Biol Chem* 261 (1986a): 3919-3922
- Tramontano D, Cushing GW, Moses AC, Ingbar SH:** Insulin-like growth factor I stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves' IgG. *Endocrinology* 119 (1986b): 940-942
- Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH:** Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 245 (1989): 301-305
- Valente WA, Vitti P, Kohn LD, Brandi ML, Rotella CM, Toccafondi R, Tramotano D, Aloj SM, Ambesi-Impiombato FS:** The relationship of growth and adenylate cyclase activity in cultured thyroid cells: Separate bioeffects of thyrotropin. *Endocrinology* 112 (1983): 71-79
- Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F:** Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66 (1991): 107-119
- Wagner TOF, Filicori:** Episodic hormone secretion: From basic science to clinical application. TM Verlag, Hameln, 1987
- Ward JM, Ohshima M:** The role of iodine in carcinogenesis. *Adv Exp Med Biol* 206 (1986): 529-542
- Warwick GP:** Effect of the cell cycle on carcinogenesis. *Fed Proc* 30 (1971): 1760-1765
- Waxman DJ, Pamori NA, Ram PA, Agrawal AK, Shapiro BH:** Interpuls interval in circulating growth hormone patterns regulates sexually dimorphic expression of hepatic cytochrome P450. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1991): 6868-6872
- Wegelin C:** Malignant disease of the thyroid gland and its relation to goitre in man and animals. *Cancer Res* 3 (1928): 297-313
- Wehman RE, Nisula BC:** Radioimmunoassay of human thyrotropin: Analytical and clinical developments. *Clin Rev Clin Lab Science* 20 (1984): 243-283
- Weintraub BD, Stannard BS, Linnekin D, Marshall M:** Relationship of glycosylation to de novo thyroid-stimulating hormone biosynthesis and secretion by mouse pituitary tumor cells. *J Biol Chem* 255 (1980): 5715-5723
- Weintraub BD, Stannard BS, Meyers L:** Glycosylation of thyroid-stimulating hormone in pituitary tumor cells: Influence of high mannose oligosaccharide units on subunit aggregation, combination and intracellular degradation. *Endocrinology* 112 (1983): 1331-1345
- Weintraub BD, Wondisford FE, Farr EA, Steinfeldt HJ, Radovick S, Gesundheit N, Gyves PW, Taylor T, DeCherney GS:** Pre-translational and post-translational regulation of TSH: Relationship to bioactivity. *Horm Metab Res* 23 (Suppl) (1990): 9-11
- Westermark B, Karlsson FA, Walinder O:** Thyrotropin is not a growth factor for human cells in culture. *Proc natl Acad Sci USA* 76 (1979): 2022-2026
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA, Goodwin RG:** Identification and characterization of a new member of the TNF family that induced apoptosis. *Immunity* 3 (1995): 673-682
- Williams ED, Doniach I, Bjarnason O, Michie W:** Thyroid cancer in an iodide rich area. *Cancer* 39 (1977): 215-222
- Willoughby JO, Terry LC, Brazeau P, Martin JB:** Pulsatile growth hormone, prolactin, and thyrotropin secretion in rats with hypothalamic deafferentation. *Brain Res* 127 (1977): 137-152

- Weller M, Weinstock C, Wagenknecht B, Dichgans J, Lang F, Gulbins E:** CD95-dependent t-cell killing by glioma cells expressing CD95 ligand: more on tumor immune escape, the CD95 counterattack, and the immune privilege of the brain. *Cell Physiol Biochem* 7 (1997):282-288
- Wolff J:** Excess iodide inhibits the thyroid by multiple mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 261 (1990): 211-244
- Wolff J, Varrone S:** The methyl-xanthines. A new class of goitrogens. *Endocrinology* 85 (1969) 410-414
- Wong CC, Döhler K-D, Atkinson MJ, Geerlings H, Hesch RD, von zur Mühlen:** Influence of age, strain and season on diurnal periodicity of thyroid stimulating hormone, thyroxine, triiodothyronine and parathyroid hormone in the serum of male laboratory rats. *Acta Endocrinol* 102 (1983): 377-385
- Wooley PG, Wherry WB:** On twenty-two spontaneous tumors in wild rats (*M. norvegicus*). *J Med Res* 25 (1912): 205-216
- Wu SY:** Thyrotropin mediated induction of thyroidal iodothyronine monodeiodinases in the dogs. *Endocrinology* 112 (1983): 417-424
- Xerri L, Devilard E, Hassoun J, Haddad P, Birg F:** Malignant and reactive cells from human lymphomas frequently Fas ligand but display a different sensitivity to Fas-mediated apoptosis. *Leukemia* 11 (1997): 1868-1877
- Yap AS; Stevenson BR; Keast JR; Manley SW:** Cadherin-mediated adhesion and apical membrane assembly define distinct steps during thyroid epithelial polarization and lumen formation. *Endocrinology*. 136 (1995): 4672-4680
- Zielke A, Hoffmann S, Plaul U, Duh Q-Y, Clark OH, Rothmund M:** Pleiotropic effects of thyroid stimulating hormone in a differentiated thyroid cancer cell line. Studies on proliferation, thyroglobulin secretion, adhesion, migration and invasion. *Exp Clin Endocrinol & Diabetes* 107 (1999): 361-369

8 Thesen

Unsere Ziele waren es, in normalen und pathologisch veränderten menschlichen Schilddrüsengeweben die Expressionen von TSH-Rezeptor, E-Cadherin, CD 97, Matrixmetalloproteinasen und Apoptosegenen zu analysieren. An humanen Schilddrüsentumorzelllinien sollte untersucht werden, ob die Regulierbarkeit dieser Faktoren durch Behandlungen mit Regulatoren der Differenzierung sowie der Dedifferenzierung noch möglich ist.

- Northern-Blot-Analysen haben gezeigt, daß der Transkript von TSH-Rezeptor und E-Cadherin mit zunehmendem Dedifferenzierungsgrad verloren geht, wobei sowohl TSH-Rezeptor als auch E-Cadherin in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen nicht nachweisbar ist. Eine verringerte Expression von E-Cadherin-Protein korreliert in Schilddrüsentumoren mit einer hohen Aggressivität und Invasivität.
- In normalen Geweben fehlte CD97. Differenzierte papilläre und follikuläre Karzinome zeigten keine oder nur eine geringe Reaktivität für CD97, während undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome und Lymphknotenmetastasen CD97 sehr stark exprimierten.
- Die Expression der Matrixmetalloproteinasen und ihrer Inhibitoren wurde in allen Typen von Schilddrüsentumoren nachgewiesen. Ein eindeutiger Zusammenhang mit dem pTNM-Stadium ließ sich aber nicht darstellen.
- Mit zunehmender Malignität der Schilddrüsenkarzinome wurde das Fas-Protein down-reguliert, während das FasL-Protein verstärkt exprimiert wurde.
- *In-vitro* wurde der Einfluß von EGF, TSH, Forskolin, PMA und Insulin auf die mRNA-Expression von E-Cadherin, CD97, MMPs sowie TIMPs und von Apoptose-induzierenden Genen wie Fas, FasL, TNF-R1, DR4, DR5, TRAIL sowie dem Köderrezeptor DcR1 in Schilddrüsenkarzinomzelllinien untersucht. TSH, Forskolin, PMA und Insulin haben keinen Einfluß auf die CD97-, MMPs- sowie TIMPs-, DR4, DR5, TRAIL, TNF-R1, Fas- und FasL-Expression. EGF bewirkt eine Steigerung der CD97- und MMP-9-, FasL- und DcR-1-Expression bei gleichzeitigem Verlust der Expression von E-Cadherin. Im Gegensatz dazu führte *all-trans* Retinsäure, die *in-vitro* eine Redifferenzierung in Schilddrüsentumoren induzieren kann, zu einer verminderten CD97-, MMP-9- und TIMP-3- und DcR1-Expression bei gleichzeitig erhöhter E-Cadherin Expression auf Tumorzelllinien.

Ziel der tierexperimentellen Studien war es ein *in-vivo* Modell zur Untersuchung des Einflusses veränderter Konzentration sowie Präparation des Thyreotropins (rekombinantes hTSH vs rTSH) und Applikationsart (pulsatil vs kontinuierlich) auf die Funktion und die Histomorphologie der Thyreozyten zu untersuchen.

- Eine Veränderung der TSH-Plasmakonzentration im physiologischen Bereich kann ultrastrukturelle Veränderungen der Thyreozyten verursachen.
- Sensitivierung oder Desensitivierung innerhalb des untersuchten Systems hängt vom jeweiligen Applikationsmodus (kontinuierlich vs pulsatil), von der verwendeten Dosis (niedrigdosiert vs hochdosiert) und von der eingesetzten Präparation (rTSH vs rec hTSH) ab.

Ziel dieser weiteren tierexperimentellen Studien war es ein *in-vivo* Modell zur Untersuchung der Umwelttoxene wie Jod und Bestrahlung auf die Schilddrüsenkarzinogenese aufzubauen, um an diesen Tieren die Bedeutung früher Marker der thyreoidalen Karzinogenese zu prüfen.

- Ein Jodüberschuß führte zur deutlichen Erhöhung der TSH-Plasmaspiegel ohne Veränderung der Plasmaspiegel von T3 und T4.
- Jodmangel induzierte eine deutliche Verminderung der T3- und der T4-Plasmakonzentrationen, daraus resultierend einen Anstieg der TSH-Plasmaspiegel.
- Eine Bestrahlung aggraviert den Abfall der Schilddrüsenhormonspiegel und es findet sich ein etwas stärkerer Anstieg der TSH-Plasmaspiegel.
- Zwei Jahre nach der Bestrahlung bildeten die Jodmangelschilddrüsen in 25% der Fälle Karzinome aus. Niedrige Strahlendosen induzierten follikuläre, hohe Strahlendosen papilläre Karzinome.
- Zwei Jahre nach der Bestrahlung bildeten die Schilddrüsen unter jodreicher Ernährung in 50% der Fälle Karzinome aus. Niedrige Strahlendosen induzierten follikuläre, hohe Strahlendosen vorwiegend papilläre Karzinome.
- Euthyreose bietet den besten Schutz vor Strahlenfolgeschäden. In den jodnormalernährten Ratten bildeten sich nach zweijähriger Latenzzeit nur in 25% der Fälle benigne Neoplasien; es waren aber keine Karzinome zu diagnostizieren.

9 Danksagung

Nach der Fertigstellung der Arbeit ist es mir ein Bedürfnis, allen, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, zu danken.

Dem Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemeinchirurgie, Herrn Prof. Dr. H. Dralle möchte ich für seine großzügige Förderung, seine stete Unterstützung und seine zahlreiche Anregungen während dieser Arbeit herzlich danken.

Bei Herrn Prof. Dr. G. Brabant (Medizinische Hochschule Hannover), der in mir das Interesse an der Schilddrüse geweckt hat, möchte ich mich für seine vertrauensvolle Zusammenarbeit, seine jederzeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit ganz herzlich bedanken.

Dem Leiter der Abteilung Molekulare Innere Medizin der Universität Würzburg, Herrn Prof. Dr. J. Köhrle, danke ich für seine bereitwillige Unterstützung, wertvollen Hinweise und Korrekturen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F.-W. Rath, dem Direktor des Institutes für Pathologie und Herrn Prof. Dr. H. J. Holzhausen, Institut für Pathologie der Martin-Luther-Universität Halle danke ich für das entgegengebrachte Interesse und die gewährte Unterstützung zur Umsetzung des gesamten Projektes sowie für die pathologische Beurteilung und Auswertung der Gewebepräparaten.

Herrn Dr. W. Sierralta, Max-Planck-Institut für Experimentelle Endokrinologie, Hannover, danke ich für die Unterstützung bei den histologischen und elektronenmikroskopischen Studien, Herrn Prof. Dr. T. J. Visser, Rotterdam für TRH-Messungen sowie Dr. R. Gerlach und Prof. Dr. J. Dunst, Universitätsklinik und Poliklinik für Strahlentherapie, Halle für die dosimetrische Berechnung und die Bereitstellung des Röntgengerätes.

Ein besonderer Dank gebührt Frau K. Hammje, Frau C. Sauer, Frau H. Renftel-Heine (Hannover), Herrn C. Sekulla, Herrn O. Lotze, Frau I. Schwarz, insbesondere Frau Dr. K. Bull für die weitreichende Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Meinen Doktoranden, Herrn Dr. Peter Zimmermann, Herrn Dr. Holger Leitolf, Herrn Dr. Jens Behrend, Herrn Dr. Carsten Boltze, Frau Dr. Antje Spens, Frau cand. med. Berit Scholle sowie Frau cand. med. dent. Claudia Düren danke ich für die geleistete Arbeit.

Ferner möchte ich den Angehörigen der Universitätsklinik und Poliklinik für Allgemeinchirurgie und des Zentrums der medizinischen Grundlagenforschung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, sowie der Abteilung Klinische Endokrinologie und des Zentraltierlabors der Medizinischen Hochschule Hannover meine Anerkennung für die geleistete Hilfe aussprechen.

Die Untersuchungen wurden mit dankenswerter Unterstützung der Deutschen Krebshilfe, des Bundesministeriums für Forschung und Technologie, des Landes Sachsen-Anhalt und der „Pinguin“-Stiftung, Düsseldorf durchgeführt.