

**Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Unfallchirurgie
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. H.-D. Röher**

**Die Ausstattung der menschlichen Schilddrüse
mit Activin-Rezeptoren
und die Activin A-vermittelte Hemmung des
Wachstums humaner Follikelepithelzellen der
Schilddrüse *in vitro***

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Claudia Jonas

2002

An meine Eltern, die mir mein Studium ermöglichten

Ich danke Herrn Universitätsprofessor Dr. med. H.-D. Röher für die freundliche Überlassung des Themas.

Herrn Dr. med. K.-M. Schulte danke ich für die Zeit, die er sich nahm, um mir die beste Betreuung, die ich mir bei einer Dissertation vorstellen kann, zukommen zu lassen. Die Gespräche mit ihm waren für mich eine große Motivation, Freude an wissenschaftlichem Arbeiten zu erlangen.

Weiterhin danke ich Frau B. Bosilj und Frau K. Alemzkour für ihre stets freundliche und hilfsbereite Unterstützung im Labor.

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Dekan
Referent: Univ.-Prof. Dr. Röher
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. Meckenstock

1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	4
2.1 Primärkulturen und Zelllinien	4
2.1.1 Herstellung von Primärkulturen	4
2.1.2 Herkunft der Primärkulturen	4
2.1.3 Herkunft der Zelllinien	5
2.1.4 Herkunft der Gewebeschnitte	6
2.2 Rekonstitution der Wachstumsfaktoren	9
2.2.1 Human rekombinantes Aktivin A (hr-Aktivin A)	9
2.2.2 Human rekombinantes Inhibin (rh-Inhibin A)	10
2.2.3 Human rekombinanter Transforming Growth Factor-beta 1 (hr-TGF- β 1)	10
2.3 Zellzählungs- und Proliferationsversuche	10
2.3.1 Indirekte Zellzählung kultivierter Thyreozyten mit der MTT-Methode	10
2.3.2 Indirekte Zellzählung kultivierter Schilddrüsenzellen mittels WST-1-Methode	11
2.3.3 Proliferationsmessung mit dem Bromodesoxyuridin-ELISA (BrdU-ELISA)	11
2.3.4 Prüfung der Zytotoxizität auf Thyreozyten in vitro	12
2.4 RNA-Isolation	12
2.4.1 Isolation von RNA aus Geweben	12
2.5 Reverse Transkription	13
2.5.1 Probenansatz für die cDNA-Synthese	13
2.5.2 Durchführung der cDNA-Synthese	13
2.6 Differentiell-quantitative RT-PCR unter Verwendung von Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz-mRNA	14
2.6.1 Oligonukleotid-Primer	14
2.6.2 PCR-Ansätze	17
2.6.3 Ansatz für die Duplex-PCR	17
2.6.4 Amplifikationsbedingungen	18
2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf 8x8 cm-Polyacrylamidgelen	19
2.7.1 Herstellung der Polyacrylamidgele	19
2.7.2 Elektrophoresezubehör und Laufbedingungen	20
2.7.3 Färbung der Gele	20

2.8	Quantifikation der Amplifikationsprodukte	21
2.8.1	Photodokumentation	21
2.8.2	Densitometrie	21
2.9	Semi-quantitative PCR mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) als Referenzgen	22
2.9.1	Cybergreen-markierte Oligonukleotidprimer	22
2.9.2	PCR-Ansätze	22
2.9.3	Amplifikationsbedingungen	23
2.10	Sequenzierung der PCR-Produkte	23
2.10.1	Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung	23
2.10.2	Identifikation der Amplimere durch Direkt-Sequenzierung	24
2.10.3	Elektrophoretische Trennung der Amplimere auf Sequenziergelen	25
2.11	Trennung und Quantifikation fluoreszenzmarkierter DNA-Amplimere	27
2.11.1	Herstellung der PAA-Gele	27
2.11.2	Elektrophoretische Trennung	27
2.11.3	Quantifikation der Fluoreszenzaddukte und Auswertung mittels rechnergestützter Datenverarbeitung	28
3.	ERGEBNISSE	29
3.1	Proliferationsversuche	29
3.1.1	Die Wirkung von Activin A, Inhibin A und TGF β -1 in Primärkulturen menschlicher Follikel­epithelzellen der Schilddrüse	29
3.1.2	Maximale Hemmbarkeit und Konzentration halbmaximaler Proliferationsinhibition nach Zugabe von hr-Activin A (0,5-50 ng/ml) zu Primärkulturen menschlicher Schilddrüsen­Zellen	45
3.1.3	Maximale Wachstumsstimulation und Konzentration mit halbmaximaler Proliferationsstimulation nach Zugabe von hr-Inhibin A (2,5-50 ng/ml) zu Primärkulturen menschlicher Schilddrüsen-Zellen	46
3.1.4	Zytotoxizität von Activin A, Inhibin und TGF- β 1	47
3.2	Charakterisierung der qualitativen und quantitativen RT-PCR zur Amplifikation von ALK4-1bis 4-4, ALK5 sowie ActRII und ActRIIB	48
3.2.1	Reproduzierbarkeit der semi-quantitativen RT-PCR-Ergebnisse	48
3.2.2	Linearitätskriterien der Duplex-PCR	49
3.2.3	Identifikation der RT-PCR-Produkte	51
3.3	Qualitative mRNA-Expression in benignen und malignen Schilddrüsengeweben bezogen auf GAPDH	54

3.4	Semi-quantitative m-RNA-Expression von ALK4-1 und ALK4-4 bezogen auf Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	60
3.4.1	Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der RT-PCR mit Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz-Gen	61
3.5	Semi-quantitative m-RNA-Expression von ALK4-1 und ActRII bezogen auf Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)	61
3.5.1	Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der RT-PCR mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) als Referenz-Gen	62
3.5.2	Darstellung der RT-PCR-Amplifikate auf Polyacrylamid-Gelen (8%) im Laser-aktivierten Fluoreszenz-Sequenator	63
4.	DISKUSSION	66
4.1	Activin A beeinflusst das Proliferationsverhalten menschlicher Schilddrüsen-Zellen <i>in vitro</i>	66
4.2	Die Wirkung von Inhibin A auf Follikelepithelzellen der menschlichen Schilddrüse	68
4.3	Die Wirkung von TGFβ-1 auf Follikelepithelzellen der menschlichen Schilddrüse	69
4.4	Qualitative und quantitative RT-PCR-Analysen zur Ausstattung der menschlichen Schilddrüse mit Rezeptoren für Activin	69
5.	ZUSAMMENFASSUNG	73
6.	LITERATUR	74
7.	LEBENS LAUF	79

1. Einleitung

Activin A, Inhibin A und Inhibin B gehören zur Activin/Inhibin-Familie der dimeren Polypeptide, die Mitglieder der Transforming Growth Factor beta- (TGF β -) Superfamilie sind (Ying,1987, Yingling, Wang et al.,1995). Die drei Untereinheiten , Inhibin- β A, Inhibin- β B und Inhibin- α sind strukturell nah miteinander verwandt und bilden Homo- und Heterodimere durch Sulfidbrückenbindungen. Activin A ist das β A- β A-Homodimer, Inhibin A das β A- α -Heterodimer und Inhibin B das β B- α -Heterodimer (Hubner, Alzheimer et al.,1999).

Während für Activin A Einzelheiten zur Signal-Transduktion bekannt sind, konnte der Inhibin-Rezeptor noch nicht kloniert werden. Am Beginn des Signal-Weges von TGF β -1 und Activin A steht die Bindung der Liganden an Homodimere des Typ-II-Rezeptors, die Typ-I-Rezeptoren durch Phosphorylierung aktiviert, was wiederum die Phosphorylierung zytoplasmatischer SMAD-Proteine zur Folge hat (Massague,1996).

Das TGF β -1-Signal wird durch den TGF β -Rezeptor-Typ-II (TGF β -RII) und den TGF β -Rezeptor-Typ-I (TGF β -RI), identisch mit ALK5 (Takumi, Moustakas et al.,1995, ten Dijke, Yamashita et al.,1994), die Anteile der SMAD-Kaskade mit den Activin-Rezeptoren gemeinsam haben, weitergeleitet (Attisano, Cárcamo et al.,1993, Attisano und Wrana,1996). Bei Activin A erfolgt die Signal-Transduktion durch den Activin-Typ-Ib-Rezeptor ActRIb (ALK4) (Carcamo, Weis et al.,1994) und durch die Activin-Typ-II-Rezeptoren ActRII (Willis, Zimmerman et al.,1996) und ActRIIB (Attisano, Wrana et al.,1992). Der Activin-Typ-I-Rezeptor, auch ActRI oder ALK2 genannt, codiert die Serin-Threonin-Kinase SKR1 und leitet Signale des Knochenmark-Proteins BMP7 und nicht des Activins weiter (Matsuzaki, Xu et al.,1993), doch binden BMP7 und Activin A beide an dieselben Typ-II-Rezeptoren.

Signalweiterleitung durch TGF β -1, Activin und Inhibin spielt eine große Rolle in der Embryogenese von Amphibien und Säugetieren (Ying, Zhang et al.,1997). Sie hat einen signifikanten Einfluß auf die Funktion der Gonaden (Halvorson and DeCherney,1996) und der Hypophyse (Ling, Ying et al.,1986), auf die Bildung der Inselzellen des Pancreas (Yamaoka, Idehara et al.,1998) und auf die Differenzierung von Erythrozyten (Yu, Shao et al.,1987). Activin A ist ein potenter Wachstumshemmer in kultivierten menschlichen Zellen verschiedener Gewebe, wie Prostata- (Wang, Tilly et al.,1996), Leber- (Zauberman, Oren et al.,1997), Nebennieren-Zellen (Spencer, Rabinovici et al.,1990, Spencer, Rabinovici et al.,1992), normalen und transformierten Brustdrüsenzellen (Liu, Niranjana et al.,1996) und Lungen-Fibroblasten (Ohga, Matsuse et al.,1996). Es kann auch als wachstumsstimulierende Substanz auf Zellen von Hodentumoren in vitro (Di Simone, Hall et al.,1998) wirken. Veränderungen des ACTRIIB Rezeptor haben Konsequenzen in der menschlichen Organogenese und führen zum Beispiel zu komplexen Rechts-Links-Achsen-Störungen mit situs inversus (Lin, Kioussi et al.,1999, Kosaki, Gebbia et al.,1999). Inhibin A hat eine im

Vordergrund stehende endokrine Bedeutung (Hayes, Hall et al.,1998) und kann gleichzeitig das Zellwachstum durch eine partielle Blockade der Activin-Wirkung beeinflussen (Gonzalez-Manchon and Vale,1989). Splice-Varianten des ALK4-Rezeptors mit Trunkierung seiner Protein-Kinase-Domäne wurden beim Menschen beschrieben. Aus der genomischen Rezeptor-Sequenz wurden vier mRNA-Isoformen vorhergesagt (Xu, Matsuzaki et al.,1994), aber bisher nur in Hypophysen-Zellen nachgewiesen (Alexander, Bikkal et al.,1996).

Expressionsminderung und mutationelle Inaktivierung der TGF β -Rezeptoren Typ I und Typ II sind bekannte Mechanismen der menschlichen epithelialen Karzinogenese in verschiedenen Modellen und können durch Transfektion des defekten Rezeptors rückgängig gemacht werden (Chang, Park et al.,1997, Grady, Rajput et al.,1998, Iacopetta, Welch et al.,1998, MacKay, Auffenberg et al.,1998, Wagner, Kleeff et al.,1998, Goggins, Shekher et al.,1998). In Zellkulturen menschlicher Brustdrüsen-Tumoren wurden verminderte Activin-Rezeptor-Level für die Resistenz dieser Zellen gegenüber der wachstumsregulierenden Wirkung von Activin verantwortlich gemacht (Kalkhoven, Roelen et al.,1995). Über die Häufigkeit und Auswirkung der verminderten Activin-Rezeptor-Spiegel in menschlichen bösartigen Tumoren ist jedoch weitaus weniger bekannt als bei TGF β -1.

Die Karzinogenese in der menschlichen Schilddrüse umschließt mehrere Mechanismen wie die Inaktivierung des p53 in anaplastischen Schilddrüsen-Karzinomen (Fagin, Matsuo et al.,1993), seltene Mutationen der ras- und gsp-Onkogene in differenzierten Schilddrüsen-Karzinomen und die Aktivierung von ret-Protoonkogenen in medullären Schilddrüsen-Karzinomen. TGF β -1 ist der stärkste Wachstumshemmer menschlicher Schilddrüsenzellen in vitro (Grubeck-Loebenstein, Buchan et al.,1989, Taton, Lamy et al.,1993). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Abnahme des TGF β -Typ-II-Rezeptors ein Kennzeichen des papillären und follikulären Schilddrüsen-Karzinoms ist, das mit der Tumor-Größe korreliert (Lazzereschi, Ranieri et al.,1997, Matoba, Sugano et al.,1998). In einem Modell des Schilddrüsen-Karzinoms der Ratte wurde der maligne Phänotyp durch wieder hergestellte Expression des TGF β -Typ-II-Rezeptors rückgängig gemacht (Coppa, Mincione et al.,1997). Die Expression von Activin- und Inhibin-Proteinen in den Follikelepithelzellen der Schilddrüse wurde durch immunhistochemische Methoden deutlich dargestellt (La Rosa, Uccella et al.,1999); jedoch wurde eine Änderung des Proliferationsverhaltens in Schilddrüsen-Zellen nur im Schweine-Modell beschrieben. Während frühere Autoren berichteten, daß Activin das Wachstum steigert (Kotajima, Miyamoto et al.,1995), zeigten jüngste Untersuchungen an Primärkulturen der Follikelzellen der Schweine-Schilddrüse, daß Activin A Wachstum und Schilddrüsen-spezifische Funktionen dieses Zelltyps hemmt (Franzen, Piek et al.,1999).

Vor diesem Hintergrund stellten wir uns die Fragen, ob Activin A und Inhibin A einen Einfluß auf die Proliferation menschlicher Follikelepithelzellen der Schilddrüse in vitro haben und ob auf der mRNA-Expressionsebene Unterschiede zwischen verschiedenen bösartigen und gutartigen Schilddrüsen-Tumoren im Vergleich zu Schilddrüsen-Normalgewebe bezüglich der Ausstattung mit Activin-Rezeptoren und des quantitativen Vorkommens verschiedener Activin-Rezeptor-Typen bestehen.

Hierzu untersuchten wir in Primärkulturen aus menschlichem Schilddrüsengewebe die Wachstumseffekte von Activin, Inhibin und TGF β -1 auf menschliche Follikelepithelzellen in vitro. Weiterhin untersuchten wir die m-RNA-Expression des Activin-Typ-Ib-Rezeptors ALK4-1 und seiner Splice-Varianten, des Activin-Typ-I-Rezeptors ALK4-2 und der beiden Activin-Typ-II-Rezeptoren ActRII und ActRIIB.

2. Material und Methoden

2.1 Primärkulturen und Zelllinien

2.1.1 Herstellung von Primärkulturen

Frisches menschliches Schilddrüsengewebe wurde intraoperativ entnommen und unter sterilen Bedingungen in kaltem Phosphatpuffer ohne Kalzium und Magnesium (PBS; Fa. Gibco, Paisley, Großbritannien) in 1-2mm³ große Stücke geschnitten. Die Fragmente wurden in einem Waschvorgang von Erythrozyten und Leukozyten befreit. Dem Gewebe wurden 10 Volumen 0,05%-iger (w/v) Trypsin-EDTA-Lösung (Fa. Gibco) zugefügt und es wurde für 1-4 Stunden bei 37°C unter kontinuierlichem Schütteln inkubiert. Durch anschließende Zugabe von fetalem Kälberserum (FKS; Fa. Gibco) ad 10% (v/v) wurde das Trypsin inaktiviert. Die gewonnene Zellsuspension wurde zentrifugiert, das Sediment resuspendiert und im Medium (Fa. Gibco) kultiviert (Primärkultur). Als Medium kam eine 1:1 v/v Mischung von Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM/HAM F12 1:1; Fa. Gibco) zur Anwendung. Nach 24 Stunden erfolgte die mikroskopische Kontrolle auf Vitalität und Adhärenz der Zellen, ein Mediumwechsel und die weitere Inkubation. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Primärkulturen trypsinisiert, einer Vitalfärbung mit Trypanblau unterzogen, in der Neubauer-Kammer gezählt und nach erneuter Aussaat für weitere 24 Stunden unter Standardbedingungen (37°C, CO₂ 2,5% v/v, gesättigte Feuchtigkeit) inkubiert.

2.1.2 Herkunft der Primärkulturen

Die Schilddrüsengewebe für die Anlage der Primärkulturen stammen von Patienten, die im Zeitraum von 11/1998 bis 4/1999 in der Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Unfallchirurgie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf operiert wurden und nach Aufklärung zugestimmt hatten.

Tabelle 1

Kultur-Nr.	Histologie	Alter (Jahre)	Geschlecht
720	PTC	38	m
740	Struma nodosa	44	m
742	Struma nodosa	47	m
744	Struma multinodosa	46	w
746	Struma multinodosa (Rezidiv)	48	w
748	kompens.autonomes Adenom (Rezidiv)	37	w
751	Struma nodosa	41	w
752	Struma nodosa	50	m
753	Struma multinodosa (Rezidiv)	48	m
754	Struma nodosa	32	w
755	Struma nodosa (Rezidiv)	69	w
756	Struma nodosa	52	m
757	Struma nodosa	29	w

Legende zu Tab.1:

Die Tabelle beinhaltet die Patientencharakteristika wie Alter und Geschlecht und den histologischen Befund des entnommenen Gewebes. Das Durchschnittsalter der Patienten war 45 ± 10 Jahre, das Verhältnis männlich zu weiblich war 6:7.

2.1.3 Herkunft der Zelllinien

2.1.3.1 Follikuläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

Bei dem Präparat handelt es sich um Lymphknotenmetastasen eines 42jährigen Patienten, der 1987 an der Heinrich-Heine-Universität an einem follikulären Schilddrüsenkarzinom (FTC 133) operiert wurde. Zwei Jahre später wurden mediastinale Lymphknotenmetastasen (FTC 238) dieses Tumors in Kultur genommen. Primäre Schilddrüsenzellen dieses Patienten wurden nach der fünften Passage subkloniert und sind bis heute in einem DMEM/HAM F12 1:1 Medium mit 10 % FKS über 40 Passagen gezüchtet worden.

2.1.3.2 Mamma- und Ovarial-Karzinom-Zelllinien

Tabelle 2:

Zelllinie	Tumortyp	Patient	ATTC-Nr.
MCF-7	Mammakarzinom, Pleurametastase	männlich 69 Jahre	HTB-22
OVCAR-3	Ovarialkarzinom	weiblich 60 Jahre	HTB-161

Legende zu Tabelle 2: Die weiteren Zelllinien wurden von der American Type Tissue Collection (ATTC) bezogen und sind in Tabelle 2 zusammengefaßt

2.1.4 Herkunft der Gewebeschnitte

Tabelle 3

Nr.	Gewebe-Nr.	Geschlecht	Alter	Histologie	TNM	Stadium nach UICC
1.	1	w	31 J.	PTC	T4NxMx	III
2.	2	w	31 J.	PTC	T4NxMx	III
3.	4	w	68 J.	FTC	T4NxMx	III
4.	9	w	49 J.	Struma nodosa		
5.	10	m	73 J.	PTC, foll. Typ	T4NxMx	III
6.	12	w	21 J.	PTC, foll. Typ	T2N1Mx	II
7.	18	w	37 J.	Struma nodosa		
8.	24	w	55 J.	Struma nodosa		
9.	25	w	64 J.	Struma nodosa		
10.	26	m	70 J.	Struma nodosa		
11.	27	m	52 J.	Struma nodosa		
12.	28	w	30 J.	M. Basedow		
13.	29	w	46 J.	PTC	T4N1aMx	III
14.	30	m	49 J.	M. Basedow		
15.	32	w	45 J.	M. Basedow		
16.	33	w	34 J.	PTC	T2bN1bMx	II
17.	34	m	66 J.	Struma nodosa		

18.	35	m	46 J.	Struma nodosa		
19.	38	m	33 J.	Struma nodosa		
20.	40	w	54 J.	Struma nodosa		
21.	43	w	55 J.	Struma nodosa		
22.	47	w	49 J.	Struma nodosa		
23.	48	w	38 J.	M. Basedow		
24.	50	m	47 J.	M. Basedow		
25.	54	w	40 J.	PTC, foll.Typ	T2NxMx	I
26.	56	w	35 J.	Struma nodosa		
27.	62	w	31 J.	FTC	T4NxMx	III
28.	63	m	55 J.	FTC	T4N2M0	IV
29.	64	w	70 J.	Struma nodosa		
30.	65	m	65 J.	FTC	T4N1M1	IV
31.	71	m	59 J.	FTC, onkoz. Typ	T2NxM1	IV
32.	72	w	71 J.	Struma nodosa		
33.	73	w	14 J.	PTC	T4N1M1	IV
34.	75	w	61 J.	FTC, hellzell. Typ	T4bN1M1	IV
35.	76	w	42 J.	Struma nodosa		
36.	78	m	84 J.	Rezidivstruma		
37.	79	m	3 J.	PTC	T4N1bM1	IV
38.	80	m	51 J.	PTC, foll.Typ	TxNxMx	
39.	88	w	63 J.	PTC, foll. Typ	T2NxMx	II
40.	89	w	72 J.	Rezidivstruma		
41.	90	m	54 J.	PTC	T4N1bMx	III
42.	91	m	51 J.	PTC	T2N1bMx	
43.	92	w	11 J.	FTC	T2N0Mx	II
44.	93	w	83 J.	Rezidivstruma		
45.	94	w	73 J.	PTC	T3N1Mx	III
46.	95	m	68 J.	PTC	TxNxMx	
47.	96	m	66 J.	PTC	T4N1bM1	IV
48.	97	m	54 J.	PTC, oxyphil. Typ	TxN0M1	
49.	98	w	37 J.	Struma nodosa		
50.	100	w	15 J.	PTC	T4N1Mx	III
51.	102	m	67 J.	PTC	T4aN1Mx	III
52.	104	w	22 J.	PTC	T4N1aMx	III
53.	105	w	58 J.	FTC	TxNxMx	

54.	108	w	13 J.	Schilddrüse normal		
55.	109	w	9 J.	Schilddrüse normal		
56.	111	m	61 J.	Rezidivstruma		
57.	112	w	78 J.	PTC	T3N0M0	II
58.	114	w	82 J.	PTC	T4N1Mx	III
59.	115	w	59 J.	PTC	T1N0M0	I
60.	116	m	62 J.	Struma		
61.	117	m	45 J.	Schilddrüse normal		
62.	124	w	57 J.	Schilddrüse normal		
63.	127	w	64 J.	FTC	T3NxMx	II
64.	132	w	27 J.	FTC-Rez.	T4N1Mx	III
65.	133	m	34 J.	Struma		
66.	136	w	76 J.	FTC-Rez.	T2NxMx	II
67.	138	w	39 J.	PTC	T2N1bM0	II
68.	140	w	36 J.	Struma		
69.	142	w	31 J.	PTC	T2N1aMx	II
70.	143	w	64 J.	Struma		
71.	144	w	64 J.	Struma		
72.	145	m	16 J.	PTC	T4N1bM0	III
73.	146	w	69 J.	Struma		
74.	147	m	51 J.	Struma		
75.	149	m	73 J.	Rezidivstruma		
76.	150	m	59 J.	Struma		
77.	151	w	58 J.	PTC	T4N0Mx	III
78.	152	w	60 J.	Rezidivstruma		
79.	153	w	76 J.	PTC, Rezidiv		
80.	155	w	39 J.	Struma		
81.	157	w	41 J.	Rezidivstruma		
82.	161	m	15 J.	PTC	T4N1Mx	III
83.	164	w	66 J.	Rezidivstruma		
84.	166	w	70 J.	Rezidivstruma		
85.	171	w	51 J.	Rezidivstruma		
86.	172	m	39 J.	PTC	T3N1aM0	III
87.	173	w	26 J.	PTC	T2NxM0	II
88.	174	w	64 J.	PTC	T3N1aMx	III
89.	176	w	22 J.	PTC, Rezidiv	T3NxM1	III

90.	177	m	71 J.	FTC, Rezidiv	T2N1bM0	II
91.	178	w	28 J.	PTC	T2N1M0	II
92.	179	w	41 J.	PTC	T4NxM0	III
93.	180	w	46 J.	PTC	T4NxMx	III
94.	205	w	69 J.	Struma		
95.	250	w	76 J.	FTC, Rezidiv		
96.	251	m	51 J.	Schilddrüse normal		
97.	252	m	77 J.	Schilddrüse normal		
98.	253	w	51 J.	Schilddrüse normal		
99.	254	m	49 J.	Schilddrüse normal		
100.	255	w	46 J.	Schilddrüse normal		
101.	256	w	29 J.	Schilddrüse normal		
102.	257	w	15 J.	Schilddrüse normal		
103.	258	w	40 J.	Schilddrüse normal		
104.	259	m		Schilddrüse normal		
105.	260	w	72 J.	Schilddrüse normal		

Legende zu Tab. 3:

Die Tabelle enthält die Patientendaten wie Alter und Geschlecht, das histologische Ergebnis des entnommenen Gewebes, Angaben zur TNM-Klassifikation sowie zum Tumorstadium nach UICC (Union Internationale Contre le Cancer). PTC = papilläres Schilddrüsen-Karzinom, FTC = follikuläres Schilddrüsen-Karzinom

2.2 Rekonstitution der Wachstumsfaktoren

2.2.1 Human rekombinantes Aktivin A (hr-Activin A)

Lyophilisiertes hr-Activin A wurde von der Firma R&D Systems, Wiesbaden bezogen. Als Rekonstitutionslösung benutzen wir 1:1 Medium mit 5% fetalem Kälberserum. 5 µg Lyophilisat wurden in 5 ml rekonstituiert, in sterilen Eppendorf-Gefäßen à 100 µl aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2 Human rekombinantes Inhibin (hr-Inhibin A)

Human rekombinantes Inhibin A wurde von Dr. A. F. Parlow, wissenschaftlicher Direktor des "National Hormone and Pituitary Program", Universität von Kalifornien, zur Verfügung gestellt. Geliefert wurden 10 µg hr-Inhibin in 50 µl Puffer (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7,4), Lot # NU1-3545. Die biologische Aktivität war in einem biologischen Versuch, FSH-Freisetzung aus dem Hypophysenvorderlappen, gesichert worden. Die protein-chemische Reinheit und Intaktheit wurde durch Polyacrylamidgelelektrophorese in Anwesenheit von Dodecyl-Sulfat belegt. Lagerung und Pipettierschritte erfolgten stets unter Anwendung von Polypropylen-Materialien. Die Lösung wurde bei +4°C gelagert.

2.2.3 Human rekombinanter Transforming Growth Factor beta-1 (hr-TGFβ-1)

1 µg des lyophilisierten hr-TGFβ-1 (Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland) wurde mit 1 ml Rekonstitutionslösung (HCl 4 mM in Rinderserumalbumin 1 mg/ml) versetzt. Die Zusammensetzung der Rekonstitutionslösung erfolgte durch Mischung von 9860 µl PBS-Puffer mit 4 µl 1 M HCl und 100 µl BSA 1 g/10 ml.

2.3 Zellzählungs- und Proliferationsversuche

2.3.1 Indirekte Zellzählung kultivierter Thyreozyten mit der MTT-Methode

In einer 96-Well-Platte wurden jeweils 3000-4000 Zellen einer Schilddrüsen-Primärkultur pro Vertiefung in 150 µl DMEM/HAM F12 mit 5% FKS (v/v) für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ v/v inkubiert. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle auf Adhärenz der Zellen wurde die jeweilige Testsubstanz in 50 µl Medium hinzugegeben und inkubiert. Am fünften Tag wurden pro Loch je 50 µl einer 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazolium-Bromid (MTT)Formazan-Stammlösung (Fa.Sigma) der Konzentration 2 mg/ml zu 200 µl Zellansatz zugesetzt, sodaß eine Endkonzentration von 400 µg/ml resultierte. Es folgte eine weitere Inkubation für 4 Stunden bei 37°C bei 3% CO₂, dann wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und die Formazankristalle am Boden der Platte in 150 µl Dimethylsulfoxid (DMSO; Fa. Serva, Heidelberg) gelöst. Anschließend erfolgte die Durchmischung für 90 Sekunden auf dem Plattenschüttler EAR 400 AT (Fa. SLT, Crailsheim). Die Absorption wurde bei einer Meßwellenlänge von 540 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm im Mikrotiterplattenleser gemessen.

Die Absorption wurde durch die Subtraktion der bei den beiden verschiedenen Wellenlängen erhaltenen Werte berechnet. Jedem Wert liegen sechs Meßpunkte zugrunde.

2.3.2 Indirekte Zellzählung kultivierter Schilddrüsenzellen mittels WST-1-Methode

Diesem Test zur indirekten Bestimmung der Zellzahl bei adhärennten kultivierten Zellen liegt das Prinzip der Umwandlung von 4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (Cell Proliferation Reagent WST-1, Fa. Boehringer, Mannheim) zu einem wasserlöslichen Formazan-Salz durch mitochondriale Dehydrogenasen zugrunde.

Die Stimulation der Zellen erfolgte analog zu der beim MTT-Test. Am fünften Tag wurden je 10 µl WST-Lösung zu jedem Ansatz zugesetzt und die Ansätze für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C, 3% v/v CO₂ inkubiert.

Die Absorptionsmessung erfolgte nach Durchmischung auf dem Plattenschüttler bei einer Meßwellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge von 690 nm. Der Meßwert wurde durch die Subtraktion des bei der Referenzwellenlänge erhaltenen Wertes von dem Wert bei Meßwellenlänge errechnet. Jedem Wert liegen sechs Meßpunkte zugrunde.

2.3.3 Proliferationsmessung mit dem Bromodesoxyuridin-ELISA (BrdU-ELISA) an kultivierten Schilddrüsenzellen

Zur Bestimmung der BrdU-Proliferationsaktivität adhärennter kultivierter Zellen wurde der BrdU-Proliferations-Kit der Firma Boehringer verwendet. 24 Stunden nach Stimulation der Zellen, die analog zu der beim MTT-Test erfolgte, wurden je 25 µl BrdU-Stammlösung pro Loch der Mikrotiterplatte hinzugegeben. Nach 72 Stunden Inkubation bei Standardbedingungen wurde das Medium dekantiert, die Zellen fixiert und ein Meerrettichperoxidase-gekoppelter BrdU-Antikörper zugesetzt. Ungebundene Antikörper wurden nach 90 Minuten durch drei Waschvorgänge entfernt. Nach Zugabe der Substratlösung Tetramethylbenzidin erfolgte der Farbumschlag unter Lichtabschluß. Die Absorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm und der Referenzwellenlänge 690 nm. Der Meßwert wurde durch Abziehen des bei Referenzwellenlänge erhaltenen Wertes vom Wert bei Meßwellenlänge berechnet. Jedem Wert liegen sechs Meßpunkte zugrunde.

2.3.4 Prüfung der Zytotoxizität auf Thyreozyten in vitro

Zur Bestimmung der induzierten Zytolyse in vitro wurde ein Test der Firma Boehringer Mannheim (Cytotoxicity Detectin Kit, LDH) verwendet. Die Bestückung der 96-Well-Platten mit 3000 Zellen pro Loch erfolgte wie beschrieben. Die Testsubstanz wurde in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt, danach wurden die Zellen für 24 Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. 100 µl des Überstandes wurden in eine neue Mikrotiterplatte pipettiert, mit 100 µl Reaktionsmedium versetzt und bei Raumtemperatur 30 Minuten unter Lichtabschluß inkubiert. Bei einer Meßwellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm wurde die Extinktion im Mikrotiterplattenleser gemessen. Die Aktivität der Laktatdehydrogenase (LDH) wurde durch einen enzymatischen Test bestimmt: In Abhängigkeit der Aktivität der LDH im Überstand wurde Lactat zu Pyruvat unter Reduktion von NAD^+ zu $\text{NADH}+\text{H}^+$ umgesetzt. Das Tetrazoliumsalz INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazoliumchlorid) wurde durch das im Überschuß zugesetzte Enzym Diaphorase unter Oxidation des $\text{NADH}+\text{H}^+$ zu NAD^+ zu Formazansalz umgesetzt. Die maximale zelluläre LDH-Aktivität wurde bestimmt, indem in sechs Vertiefungen anstatt Aktivin A das Detergenz Tritron[®] X-100 (Fa. Sigma) zu einer Endkonzentration von 2% v/v zugegeben wurde (entspricht der Maximalkontrolle, MAX.). Die Normalkontrolle (NKO) enthielt nur Medium und Zellen. Durch die Zugabe von Medium ohne Zellen in die Vertiefungen erhielt man die Hintergrundkontrolle (HIKO). Alle Werte wurden durch Abzug der Hintergrundkontrolle bereinigt.

Formel für die Berechnung der Zytotoxizität in Prozent:
$$\frac{x - NKO}{MAX. - NKO} \times 100$$

2.4 RNA-Isolation

2.4.1 Isolation von RNA aus Geweben

Die bei - 80 °C eingefrorenen Gewebe wurden mit einem Mikrotom (MTE, Firma SLEE Technik, Mainz, Deutschland) zu Scheiben von einem Durchmesser von 3-10 mm und einer Dicke von 10 µm geschnitten. Jeweils ein Schnitt wurde zur RNA-Isolation verwendet, die ebenfalls mit der oben beschriebenen Trizol[®]-Methode erfolgte.

2.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte durch Zufallspriming mit einem Oligo-Hexamer (pd(N)₆) unter Verwendung des "First-Strand cDNA Synthesis Kit" (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), das die reverse Transkriptase des Moloney-Mäuse-Leukämie-Virus (M-MuLV) enthält.

2.5.1 Probenansatz für die cDNA-Synthese

Für ein Zielvolumen von 15 µl cDNA wurden folgende Substanzen in den aufgeführten Mengen zur Reaktion gebracht:

RNA (0.4 µg/µl)	8.0 µl
Bulk First Strand	5.0 µl
Primer pd(N) ₆	1.0 µl
Dithiothreitol (DTT)	1.0 µl

2.5.2 Durchführung der cDNA-Synthese

Pro Probe wurden 8 µl RNA in ein steriles 500 µl-Eppendorf-Röhrchen pipettiert, 10 Minuten lang im Wasserbad bei 65°C denaturiert und dann sofort für drei Minuten auf Eis gekühlt. Der RNA wurden anschließend je 7 µl des in der Zwischenzeit angesetzten Reaktionsgemisches, entsprechend 5 µl Bulk First Strand und jeweils 1 µl pd(N)₆-Primer und 1 µl DTT, zugesetzt. Die Synthese des zweiten Stranges erfolgte für eine Stunde bei 37°C im Wasserbad. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die cDNA im -80°C-Kühlschrank gelagert.

2.6 Differentiell-quantitative RT-PCR unter Verwendung von Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz-mRNA

2.6.1 Oligonukleotid-Primer

Tabelle 4

	SEQUENZ	AMPLIMER	GENBANK-NR	BINDUNGSSTELLE
ALK4-1	gag atc gtg ggc acc caa ggg agc tgg gag agg gtc ttc ttg	530bp	Z22536	961-981 1490-1470
ALK4-2	gag atc gtg ggc acc caa ggg cgc agg agg cca gct tct tac	453bp	L31848	961-981 8186-8167
ALK4-3	gag atc gtg ggc acc caa ggg cat cct gga atg gga ggt agg	346bp	L31848	961-981 3024-3004
ALK4-4	gag atc gtg ggc acc caa ggg ata tgg gaa acg gca cag atg	248bp	L31848	82-101 1355-1335
ALK5	cgt gct gac atc tat gca at agc tgc tcc att ggc ata c	251bp	AF054590	1268-1287 1519-1501
ActRII	gca aaa atg aat acg aag tct a gca ccc tct aat acc tct gga	434bp	M93415	860-880 1294-1274
ActRIIB	caa ctt ctg caa gcg ctt gca ccc ccg agc ctt gat ctc	281bp	AB008681	35450-70 35981-64
GAPDH 306	cgg agt caa cgg att tgg tcg tat agc ctt ctc cat ggt ggt gaa gac	306bp	M17851	51-74 357-334

Legende zu Tab. 4:

Angegeben sind die Oligoprimer mit der Sequenz des Vorwärts- und Rückwärtsstranges (5'-3'), die erwartete Amplimerlänge, Genbank-Identifikations-Nummer und Bindungsstelle.

2.6.1.1 Activin Receptor-Like Kinase (ALK)-Rezeptor, Typ 4-1

Die Synthese der ALK4-1-Rezeptor-Primer wurde von der Firma Roth durchgeführt. Der Primer wurde in der Konzentration 1 μ M in die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Die Länge des erwarteten Produktes ergibt sich aus der cDNA-Sequenz des klonierten humanen ALK4-Rezeptors (GenBank Z22546) [ten Dijke et al., 1993] und beträgt 530 Basenpaare. ALK4-Anker bindet in Position 961-981, ALK4 -1 in Position 1490-1470. In der genomischen Sequenz (GenBank L31848) [Xu et al., 1994] ist der Primer ALK4-Anker in Position 82-101 lokalisiert. Der Primer ALK4-1 bindet in Position 10245-10228 distal der ersten Poly-A-Stelle. Somit überspannt das cDNA-Produkt vier Introne von insgesamt 9000 bp Länge.

2.6.1.2 Activin Receptor-Like Kinase (ALK)-Rezeptor, Typ 4-2.

Die Synthese der ALK4-2-Rezeptor-Primer wurde von der Firma Gibco durchgeführt. Der Primer wurde in der Konzentration 1 μ M in die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. In der genomischen Sequenz (GenBank L31848) [Xu et al., 1994] ist der Primer ALK4-Anker in Position 961-981 lokalisiert. Der Primer ALK4-2 bindet in Position 8186-8167.

2.6.1.3 Activin Receptor-Like Kinase (ALK)-Rezeptor, Typ 4-3

Die Synthese der ALK4-3-Rezeptor-Primer wurde von der Firma Gibco durchgeführt. Der Primer wurde in der Konzentration 1 μ M in die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. In der genomischen Sequenz (GenBank L31848) [Xu et al., 1994] ist der Primer ALK4-Anker in Position 961-981 lokalisiert. Der Primer ALK4-4 bindet in Position 3024-3004.

2.6.1.4 Activin Receptor-Like Kinase (ALK)-Rezeptor, Typ 4-4

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Gibco vorgenommen. Der Primer wurde in der Konzentration 1 μ M in der PCR eingesetzt. Die erwartete Produktlänge ist aus der DNA-Sequenz des klonierten ALK4-Rezeptors (GenBank Z22536) [ten Dijke et al., 1993] vorhergesagt worden und beträgt 256 bp. In der genomischen Sequenz (GenBank L31848) [Xu et al., 1994] ist der Primer ALK4-Anker in Position 82-101 lokalisiert. Der Primer ALK4-4 bindet in Position 1355-1335 proximal der ersten Poly-A-Stelle. Somit überspannt das hypothetische cDNA-Produkt ein Intron.

2.6.1.5 Activin Receptor-Like Kinase (ALK)-Rezeptor, Typ 5 (entspricht TGF β R-I)

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Gibco vorgenommen. Der Primer wurde in der Konzentration 1 μ M in die PCR eingesetzt.

2.6.1.6 Activin-Rezeptor Typ II (ACTRII)

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Gibco vorgenommen. Der Primer wurde in der Konzentration 1 μ M in die PCR eingesetzt. Die erwartete Produktlänge ergibt sich aus der cDNA-Sequenz des klonierten humanen ACTRII-Rezeptors (GenBank M93415) [Donaldson et al., 1992] und beträgt 434 bp.

2.6.1.7 Activin-Rezeptor Typ IIb (ACTRIIB)

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Gibco vorgenommen. Die erwartete Produktlänge ergibt sich aus der cDNA-Sequenz des klonierten humanen ACTRIIB-Rezeptors (GenBank AB008681) [Ishikawa et al., 1998] und beträgt 281 bp. Der Vorwärts-Primer ist in Position 35450-70 lokalisiert, der Rückwärts-Primer bindet in Position 35981-64. Das Konstrukt überspannt zwei Introne.

2.6.1.8 Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Die Oligonukleotidsynthese wurde von der Firma Roth vorgenommen. Der Primer wurde in der Konzentration 0,5 μ M in die PCR eingesetzt und ergibt ein Produkt von 306 bp Länge.

2.6.2 PCR-Ansätze

2.6.3 Ansatz für die Duplex-PCR

Jeder 50 µl - Ansatz enthielt folgende Reagentien:

10 x Buffer	(Fa. Perkin Elmer)	4.00 µl
dNTP 2 mM	(Fa. Boehringer)	5.00 µl
Vorwärtsprimer	[10 pmol/µl]	5.00 µl
Rückwärtsprimer	[10 pmol/µl]	5.00 µl
Taq-Polymerase [5U/µl]	(Fa. Perkin Elmer)	0.25 µl
nukleasefreies Wasser	(Fa. Promega)	10.75 µl
cDNA		10.00 µl
GAPDH-Mix *		10.00 µl
		<hr/>
		50.00 µl

* folgendes GAPDH-Gemisch wurde nach nach 10-12 Zyklen zugegeben (Primer-Zusatz-Methode):

10 x Buffer	(Fa. Perkin Elmer)	1.00 µl
GAPDH 306 S Primer	[10 pmol/µl]	2.50 µl
GAPDH 306 AS Primer	[10 pmol/µl]	2.50 µl
nukleasefreies Wasser	(Fa. Promega)	4.00 µl
		<hr/>
		10.00 µl

2.6.4 Amplifikationsbedingungen

2.6.4.1 PCR-Bedingungen für ALK 4-1, 4-2, 4-3 und 4-4

Tabelle 5

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung	95°C	2 min.	1
Denaturierung	95°C	30 sek.	35
Annealing	57°C	30 sek.	
Synthese	72°C	30 sek.	
Extension	72°C	10 min.	1

2.6.4.2 PCR-Bedingungen für ALK 5

Tabelle 6

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung	94°C	5 min.	1
Denaturierung	94°C	30 sek.	35
Annealing	66°C	30 sek.	
Synthese	72°C	30 sek.	
Extension	72°C	10 min.	1

Legende zu Tabelle 5 und 6:

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde ein Thermal-Cycler der Firma Eppendorf im Stufenzyklusverfahren genutzt. Die Amplifikationsbedingungen für die verschiedenen Oligoprimer sind in den Tabellen angegeben. Die Amplifikationsbedingungen für ActRII und ActRIIB entsprechen denen für ALK4-1 mit Ausnahme der Annealing-Temperaturen. Diese liegen für ActRII bei 54°C und für ActRIIB bei 60°C.

2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf 8x8 cm-Polyacrylamidgelen

2.7.1 Herstellung der Polyacrylamidgele

2.7.1.1 Ansetzen einer Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösung 30:0,5 (v/v)

In einem Meßzylinder wurden 500ml destilliertes Wasser vorgelegt. 300 g Acrylamid (Fa. Sigma) und 5 g Bisacrylamid (Fa. Sigma) wurden eingewogen und die Lösung eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Magnetrührer durchmischt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter Lichtabschluß.

2.7.1.2 Ansetzen einer Polyacrylamid-Stammlösung 8% (v/v)

Für das Herstellen von 200 ml einer 8%-igen Polyacrylamid-Stammlösung wurden folgende Reagentien verwendet:

Acrylamid/Bisacrylamid 30:0.5 (v/v)	53.3 ml
5x Tris-Borate-EDTA (Fa. Sigma)	40.0 ml
Glycerol 40% (v/v; Fa. Sigma)	10.0 ml
Aqua ad iniectabiliam	96.7 ml

2.7.1.3 Vorbereitung der Glasplatten

Die Glasplatten, Kämme und Abstandhalter wurden vor Benutzung mit einer Silikonlösung (Fa. Serva) gereinigt.

2.7.1.4 Herstellung eines Polyacrylamidgelgemisches

Folgende Reagentien wurden für das Anfertigen eines Polyacrylamidgels verwandt:

PAA-Stammlösung 8% (w/v)	10 ml
Ammoniumpersulfat (APS; Fa. Sigma) 10% (w/v)	45 µl
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamid (TEMED; Fa. Sigma)	35 µl

Das Gemisch wurde in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach 15 Minuten war die Polymerisation abgeschlossen, der Kamm konnte gezogen und die Geltaschen beladen werden. Es wurden je Probe 5 µl des PCR-Produktes mit 3 µl Ladungspuffer aufgetragen.

2.7.2 Elektrophoresezubehör und Laufbedingungen

2.7.2.1 Elektrophoresegerät

Elektrophoresegerät	:	Biometra Minicell Powerpack P20
Pufferkammer	:	Bio Rad
Glasplatten	:	Bio Rad Mini Protean II Cell; Dicke 1 mm
Abstandhalter	:	Bio Rad Mini Protean II Abstandhalter; Dicke 1 mm
Kamm	:	Bio Rad Mini Protean II; Dicke 1 mm; 10 Zähne

Die Standard-Laufbedingungen wurden auf 45 Minuten bei 150 Volt festgelegt.

2.7.2.2 Verwendete Puffer

Es wurde ein 1 x Tris-Borat-EDTA (1xTBE)- Laufpuffer verwendet, der durch die Verdünnung von 200 ml 5 x TBE (Fa. Sigma) mit 800 ml destilliertem Wasser hergestellt wurde.

Zusammensetzung des 5 x TBE:

Tris-Borat	0.445 M
EDTA	0.010 M

Für den Probenauftrag wurde ein Ladungspuffer (Loading Buffer; Fa. Sigma) benutzt.

2.7.3 Färbung der Gele

2.7.3.1 Ansetzen der Ethidiumbromid-Lösung

Zur Färbung der Gele wurden 30 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml; Fa. Sigma) in 200 ml Aqua bidestillata gelöst.

2.7.3.2 Färbung

Nachdem die Glasplatten und die Abstandhalter entfernt worden waren, erfolgte das Schwenken des Polyacrylamidgels in einer Wanne mit Ethidiumbromid-Färbelösung für 5 Minuten und anschließend zwei Waschvorgänge mit destilliertem Wasser für je 5 Minuten.

2.8 Quantifikation der Amplifikationsprodukte

Ein Aliquot der Amplifikationsprodukte wurde auf Polyacrylamid-Gelen gegen einen Molekulargewichts-Standard (1Kb-Plus, Fa. Gibco) aufgetrennt und durch Ethidiumbromid gefärbt. Dabei wurde darauf geachtet, daß die aufgetragene Produktmenge unter dem Bereich der optischen Sättigung bei der nachfolgenden Photodokumentation und densitometrischen Analyse lag.

2.8.1 Photodokumentation

Die photographische Darstellung des gefärbten Polyacrylamidgels erfolgte unter UV-Licht ($8\text{mv}/\text{cm}^2$) mit einer Blendeneinstellung von 4,5 und einer Belichtungszeit von 1 Sekunde.

2.8.2 Densitometrie

Zur desitometrischen Ausmessung wurde ein Dokumentationssystem der Firma Biorad genutzt. Die Rohdaten wurden mit Hilfe des Computer-Programms Molecular Analyst der Firma Macintosh erzeugt, indem die sichtbaren Banden mittels eines Standardkästchens umfahren und die Leuchtdichte nach Abzug des Hintergrundes ermittelt wurden. Die Summe der beiden pro Spur untersuchten Banden wurde als einhundert Prozent definiert. Aus den Leuchtdichtewerten der Banden wurde ein Quotient gebildet.

2.9 Semi-quantitative PCR mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) als Referenzgen

2.9.1 Cybergreen-markierte Oligonukleotidprimer

Tabelle 7

	SEQUENZ	AMPLIMER	GENBANK-NR.	BINDUNGSSTELLE
Alk 4-1	Cy5-gag atc gtg ggc acc caa ggg	530 bp	Z22536	961-981
Cy5	agc tgg gag agg gtc ttc ttg			1490-1470
ActRII	Cy5-gca aaa tga ata cga agt cta	434 bp	M93415	860-880
Cy5	gca ccc tct aat acc tct gga			1294-1274
GPDR9	Cy5 gaa cct cat ggt gct gag		X55448	15148-65
GPDR9	ccc acc tct cat tct cc	416 bp	X55448	16558-42
GPDR10	ctc gtt cag ggc ctt gc	460 bp	X55448	15148-65

Legende zu Tab. 7:

Die Oligonukleotidprimer wurden von der Firma Pharmacia synthetisiert und in der Konzentration 1µM bzw. 0.5 µM (GPD9) in der PCR eingesetzt. GPDR9 war sowohl für GPDR9 als auch für GPDR10 Vorwärts-Primer in der PCR, Cy5: Cybergreen-markiert

2.9.2 PCR-Ansätze

Tabelle 8

Primer1	Primer2	Primer 1 [µl]	Primer 2 [µl]	cDNA [µl]	10xPuffer [µl]	dNTP 2 mM [µl]	H ₂ O [µl]	Taq [µl]
Alk 4-1	GPDR10	2,0	1,0	2,5	2,5	3,0	13,7	0,3
ActRII	GPDR9	2,0	2,0	2,5	2,5	3,0	12,7	0,3

Legende zu Tab. 8:

10 x Puffer, dNTP und Taq-Polymerase wurden von der Firma Quiagen bezogen. GPDR10 diente in der PCR mit ALK4-1 als Referenzgen, GPDR9 wurde mit ActRIIB kombiniert.

2.9.3 Amplifikationsbedingungen

Tabelle 9

Primer 1	Primer 2	Denat.	Denat.	Annealing	Synthese	Zyklen	Extension
Alk 4-1	GPD10	94°C, 3'	94°C,30"	62°C,30"	72°C, 1'	32	72°C, 10'
ActRII	GPD9	94°C, 3'	94°C,30"	57°C,30"	72°C, 1'	28	72°C, 10'

Legende zu Tab.9:

Angegeben sind Amplifikationstemperaturen und –zeiten für die beiden Duplex-Polymerasekettenreaktionen. Die PCR erfolgte in 96-Loch-PCR-Platten im Stufenzyklusverfahren mit dem Thermalcycler Whatman Biometra T Gradient (Fa. Biometra, Göttingen). Denat.: Denaturierung

2.10 Sequenzierung der PCR-Produkte

2.10.1 Vorbereitung der Proben zur Sequenzierung

Die Amplimere wurden auf 0,8% (w/v) Agarosegelen durch Elektrophorese bei 100 V, 1 h getrennt, durch Färbung in einer Ethidiumbromidlösung 1 µg/ml sichtbar gemacht und die Banden mit dem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde gewogen und mit einer Kollagenase-haltigen Pufferlösung für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur weiteren Aufarbeitung wurde eine säulenchromatographische Trennung auf Kieselgel durchgeführt (QIAquick Gel extraction kit, QIAGEN, Hilden). Ein Aliquot des aufgereinigten Produktes wurde auf ein 1% w/v Agarosegel aufgebracht und die Konzentration der DNA-Lösung nach Ethidiumbromidfärbung durch Vergleich gegen eine Verdünnungsreihe des Molekulargewichtsstandards 1kb plus (Fa. Gibco) geschätzt.

2.10.2 Identifikation der Amplimere durch Direkt-Sequenzierung

2.10.2.1 Ansatz der Sequenzierreaktion

Die Cyber-Green-markierten Primer wurden auf die Konzentration 1 pmol/ μ l verdünnt, die DNA wurde in der Konzentration 10 ng/ μ l in die PCR eingesetzt.

Die Proben wurden wie folgt angesetzt:

Primer (1pmol/ μ l)	1 μ l
DNA (10ng/ μ l)	5 μ l
A-,C-,G- oder T-Reagenz	2 μ l

Die Ansätze wurden in eine 96-Loch-Platte pipettiert.

2.10.2.2 PCR-Bedingungen

Tabelle 10

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklusanzahl
Denaturierung	95°C	45 Sek.	30
Annealing	55°C	45 Sek.	
Synthese	72°C	30 Sek.	

Legende zu Tab. 10:

Angegeben sind die Amplifikationsbedingungen für die Sequenzierreaktion. Die PCR erfolgte im Stufenzyklusverfahren mit dem Thermalcycler Whatman Biometra T Gradient (Fa. Biometra, Göttingen). Jede PCR-Probe wurde nach Ablauf der Reaktion mit 5 μ l Formamid-Ladungspuffer versetzt.

2.10.2.3 Herstellung des Ladungspuffers

100 ml Formamid (Fa. Sigma, St. Louis, USA) wurden mit 5 g Amberlite (Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) gemischt und für 30 Minuten auf einem Magnetrührer belassen. Die Lösung wurde dann durch einen Filter (Fa. Nalgene Filtrationsgeräte Rochester, New York, USA) mit einer Porengröße von 0.2 µm filtriert. 5 g Dextranblau (Fa. Roth, Karlsruhe) wurden in 100 ml einer 20 mM EDTA-Lösung mit einem pH-Wert von 8,3 (Fa. Sigma) eingewogen. Danach wurde ein Teil der EDTA-Lösung mit fünf Teilen der Formamid-Lösung gemischt und bis zum weiteren Gebrauch bei -30°C eingefroren.

2.10.3 Elektrophoretische Trennung der Amplimere auf Sequenziergelen

2.10.3.1 Vorbereitung der Gelkammer

Zunächst wurden die Glasplatten und die Gelkassette unter fließendem Wasser mit einer Bürste und dem oberflächenaktiven Reinigungsmittel Decon 90 5% (Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt) von Gel-Resten befreit.

Darauf erfolgte die Reinigung der dem Gel zugewandten Seiten der Glasplatten zuerst mit absolutem Alkohol (Fa. Riedel-de Haen, Seelze), dann mit Aqua bidest. (Fa. Braun, Melsungen) und erneut mit absolutem Ethanol. Zum Abreiben der Platten wurden die fusselreifen Präzisionswischtücher Kimwipes Lite (Fa. Kimberly-Clark) benutzt. Kamm und Abstandshalter wurden mit absolutem Ethanol abgerieben.

2.10.3.2 Herstellung von Sequenziergelen

Für die elektrophoretische Auftrennung der ALK-Rezeptor-Amplifikate wurden 8%-ige Polyacrylamid-Sequenziergele in einer Dicke von 0.3 mm gegossen, deren Grundlage das vorgemischte A.L.F-ReproGel High Resolution™ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) darstellte. Zur Polymerisierung wurde das Gel für 10 Minuten unter dem UV-Licht-Schirm ReproSet™ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) belassen.

2.10.3.3 Verdünnung des Laufpuffers

10x TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer für die Gelelektrophorese, 10x Konzentrat, 0,2 µm filtriert, 0,89M Trisborat, pH ca. 8,3, mit 0,02 EDTA, Firma Sigma) wurde mit Ecotainer Wasser (Fa. Braun) verdünnt, damit ein 0,5 x TBE-Puffer als Laufpuffer verwendet werden konnte.

2.10.3.4 Elektrophoresegerät

Zur Sequenzanalyse wurde ein computergestütztes Elektrophoresegerät (Automatic Liquid Fluorescencesequencer A.L.F.express II, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) verwendet.

2.10.3.5 Laufbedingungen

Die Laufbedingungen wurden auf folgende Werte festgelegt:

Spannung	1500	V
Stromstärke	60	mA
Leistung	25	W
Temperatur	55	°C
Laserleistung	2	mW
Probenintervall	2	s
Laufzeit	400	min

2.10.3.6 Probenauftrag auf das Gel

Zunächst wurde die Gelkassette in das Elektrophoresegerät Alf Express II (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) gehängt, dann die beiden Pufferkammern mit Laufpuffer gefüllt, der Kamm gezogen und die entstandenen 40 Spuren mit Laufpuffer gespült. Die mit je 5 µl Ladungspuffer gemischten PCR-Proben wurden in die Geltaschen gefüllt. Dabei war die Reihenfolge der Basen stets A,C,G,T, ein Klon hatte 4 Spuren.

2.11 Trennung und Quantifikation fluoreszenzmarkierter DNA-Amplimere

2.11.1 Herstellung der PAA-Gele

Die Vorbereitung der Glasplatten und das Zusammenbauen der Gelkassetten erfolgte analog zu den Arbeitsschritten bei der Vorbereitung von Sequenziergelen (s. 2.9.3.2). Zur Grundlage der 8% (v/v)-Polyacrylamidgele diente das vorgemischte A.L.F.-ReproGel Long Read™ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech), zu dem Harnstoff (98%, Fa. Sigma) in entsprechender Menge hinzugefügt wurde. Für 4 M Gele wurden 18 g Harnstoff in 75 ml der Vormischung eingewogen. Die Gele der Dicke 0.3 mm wurden zum Polymerisieren für 15 Minuten unter den UV-Schirm ReproSet™ (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) gestellt.

2.11.2 Elektrophoretische Trennung

2.11.2.1 Verwendete Puffer

Sowohl der Lauf- als auch der Ladungspuffer entsprechen in Material und Zusammensetzung den bei der Sequenzierreaktion verwendeten Substanzen.

2.11.2.2 Vorbereitung der PCR-Proben zur gelelektrophoretischen Auftrennung

Es wurden jeweils 4 µl eines Amplifikates mit je 3 µl Loading Buffer auf einer Mikrotiterplatte (Fa. Greiner, Frickenhausen) gemischt, dann auf einer Heizplatte bei ca. 97°C 5 Minuten lang denaturiert und dann für 3 Minuten auf Eis gestellt.

2.11.2.3 Elektrophoresegerät

Die Quantifikation der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte erfolgte in einem computergestützten Elektrophoresegerät, dem Automatic Liquid Fluorescensequencer, A.L.F. express II der Firma Amersham Pharmacia Biotech.

2.11.2.4 Probenauftrag

Die Gekassette wurde mit dem polymerisierten Gel in das Elektrophoresegerät eingehängt, die beiden Pufferkammern mit TBE-Laufpuffer gefüllt, der Kamm gezogen und die entstandenen 40 Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Je 7 µl des Proben-Laufpuffer-Gemisches wurden pro Geltasche aufgebracht.

2.11.2.5 Längenbestimmung der Amplimere durch Standards

Zur Identifikation der Amplimere wurde pro Lauf eine Mischung von 50-500 Basenpaare langen Farbstoff-Amidit-Standards (Alf Express Standard 50-500 in TE-Puffer, Fa. Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in eine Geltasche aufgetragen. Es wurden 1,5 fmol des Längen-Standard-Gemisches aufgebracht.

2.11.2.6 Laufbedingungen für die Elektrophorese

Die standardisierten Laufbedingungen lauteten:

Spannung	1500 V
Stromstärke	60 mA
Leistung	25 W
Temperatur	55 °C
Laserleistung	2 mW
Probenintervall	2 sek
Laufzeit	400 min

2.11.3 Quantifikation der Fluoreszenzaddukte und Auswertung mittels rechnergestützter Datenverarbeitung

Durch eine Photozelle wurde die Lichtemission der laseraktivierten Cybergreen-markierten Oligonukleotide automatisiert erfaßt. Die quantitative Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes Fragment Analyser der Firma Amersham Pharmacia Biotech. Das Integral der Emissionsintensität über der Zeit entsprach der Menge der Cybergreen-markierten Oligonukleotide und damit der Amplifikate, in die sie inkorporiert waren. Der Rechner bestimmte die Bandenfläche anhand der definierten Nulllinie als Integral.

3. Ergebnisse

3.1 Proliferationsversuche

3.1.1 Die Wirkung von Activin A, Inhibin A und TGF β -1 in Primärkulturen menschlicher Follikelepithelzellen der Schilddrüse

Die Zellproliferationsversuche wurden in DMEM/HAM F12 Medium (1:1) in Anwesenheit von 1% oder 5% FKS durchgeführt. Die de novo-DNA-Synthese wurde nach 72 Stunden durch den BrdU-Elisa erfaßt. Nach 120 Stunden wurden mit dem MTT-oder WST-1-Test die Zellzahlen indirekt durch den Metabolismus der Testreagenzien bestimmt. In jeder einzelnen Primärkultur und bei jeder Konzentration wurden die Werte als Mittelwert \pm SD aus 6 Meßwerten -bei den Kontrollen aus 12 Meßwerten- bestimmt. Der Mittelwert aus 12 unbehandelten Kontrollen auf derselben Mikrotiterplatte wurde als 100% festgelegt. Die Standardabweichungen der Meßwert-Mittel in den Kontrollgruppen lagen zwischen 4 und 15%. Der Mittelwert aus 6 Einzelbestimmungen bei einer Testkonzentration wurde für jedes individuelle Gewebe durch den Mittelwert der Kontrollen geteilt und der erhaltene Wert mit 100 multipliziert. Aus diesen Mittelwerten wurden für die jeweilige Gewebeart bei der definierten Konzentration der Testsubstanz ein Mittelwert mit Standardabweichung gebildet. Die statistische Signifikanz der Differenz der Mittelwerte bei Anwesenheit der Testsubstanz im Vergleich zu den Kontrollen wurde mit dem Student-T-Test für unverbundene Stichproben nach vorheriger Analyse der Varianzgleichheit vorgenommen.

Tabelle 11

KULTUR	KONTROLLE	ACTIVIN 0.5NG/ML	ACTIVIN 2.5NG/ML	ACTIVIN 10 NG/ML	ACTIVIN 50 NG/ML	INHIBIN 2,5NG/ML	INHIBIN 10NG/ML	INHIBIN 50NG/ML	TGFβ-1 10NG/ML
720 WST 18.2.99	1308±97	1498±78 **	1481±57 **	1494±84 **	1459±89 *	1386±57	1439±47 *	1502±49 ***	1524±124 ***
720 BrdU 18.2.99	433±26	425±18	457±35	487±26 *	484±38 *	448±30	405±34	405±46	432±25
740 MTT 29.1.99	113±5	116±4	112±6	108±5	109±7	110±4	104±6 *	112±4	
740 BrdU 29.1.99	500±54	418±40 *	431±61	452±54	569±62	496±42	450±60	482±44	
742 MTT 29.1.99	171±16	175±10	168±9	154±9	144±8 *	170±10	158±14	163±9	
742 BrdU 29.1.99	561±33	431±39 ***	463±28 ***	487±50 **	454±29 ***	580±57	570±39	530±29	
744 MTT 29.1.99	254±13	247±10	254±12	249±10	240±16	247±9	241±5	244±6	
744 BrdU 29.1.99	614±68	564±21	600±46	565±18	548±37	572±26	577±16	552±19	
746 MTT 29.1.99	170±13	173±8	160±3	165±13	146±11 **	162±14	155±22	159±10	
746 BrdU 29.1.99	511±59	467±41	491±40	422±29 **	322±31 ***	459±39	634±49 ***	540±37	
748 WST 19.2.99	1031±118	1032±82	939±32	976±26	924±35 *	999±43	975±26	988±31	898±38 **
748 BrdU 19.2.99	591±70	518±70	513±13	467±49 **	532±38	529±35	522±24	544±40	502±87 *
751 WST 18.2.99	1489±122	1647±40 **	1583±31	1528±51	1383±60	1528±141	1593±22	1657±72 **	1531±59
751 BrdU 18.2.99	693±55	732±29	683±41	697±79	777±70	641±67	688±34	653±37	644±76
752 WST 18.2.99	2025±205	2183±90	2207±51	2113±90	1932±187	1997±121	2263±102 *	2310±48 **	2011±182

KULTUR	KONTROLLE	ACTIVIN 0.5NG/ML	ACTIVIN 2.5NG/ML	ACTIVIN 10 NG/ML	ACTIVIN 50 NG/ML	INHIBIN 2,5NG/ML	INHIBIN 10NG/ML	INHIBIN 50NG/ML	TGFβ-1 10NG/ML
752 WST 18.2.99	2025±205	2183±90	2207±51	2113±90	1932±187	1997±121	2263±102	2310±48	2011±182
752 BrdU 18.2.99	638±35	656±36	667±37	638±44	668±25	640±70	686±36	698±60	594±40
753 WST 19.2.99	1396±64	1349±71	1364±73	1305±32	1230±53	1394±40	1396±47	1470±51	991±52
753 BrdU 19.2.99	684±38	670±50	705±73	667±110	490±29	639±73	629±33	654±42	388±38
754 WST 18.2.99	1101±87	1132±29	1100±38	1034±50	1021±70	1135±33	1173±22	1181±43	1126±44
754 BrdU 18.2.99	484±20	488±25	466±22	469±24	420±28	486±28	474±22	490±33	339±33
755 WST 19.2.99	1653±63	1726±44	1659±47	1578±61	1475±57	1689±37	1724±31	1751±34	1394±31
755 BrdU 19.2.99	460±35	491±51	401±20	351±30	286±20	465±14	424±22	433±40	275±32
756 WST 19.2.99	1827±69	1883±32	1835±37	1778±46	1721±33	1898±42	1897±33	2001±39	1634±24
756 BrdU 19.2.99	420±31	558±145	447±53	406±35	338±19	416±47	423±67	512±42	308±40
757 WST 2.3.99	1764±112	1914±70	1888±65	1781±54	1758±103		1948±45	1924±29	1417±125
757 BrdU 2.3.99	681±86	811±105	809±95	758±144	669±66		650±64	715±69	599±89
133/7 WST 27.2.99	2598±116	2347±157	2541±91	2478±27	2523±23		2608±72	2460±135	1021±96
133/7BrdU 26.2.99	648±69	663±29	598±41	581±43	623±38		675±41	725±33	671±35
238/25 WST 27.2.99	2411±158	1389±137	2156±133	2395±94	2063±91		2343±350	1466±432	1598±126

KULTUR	KONTROLLE	ACTIVIN 0.5NG/ML	ACTIVIN 2.5NG/ML	ACTIVIN 10 NG/ML	ACTIVIN 50 NG/ML	INHIBIN 2,5NG/ML	INHIBIN 10NG/ML	INHIBIN 50NG/ML	TGFβ-1 10NG/ML
238/25 BrdU 26.2.99	966±121	1106±100	1052±184	1059±162	1000±64		1009±79	1114±100	959±97
MCF7 WST 2.3.99	2076±161	1788±136 **	1771±93 ***	1668±78 ***	1566±58 ***		1803±133 **	1710±48 ***	1768±133 ***
MCF7 BrdU 3.3.99	712±44	777±47 **	822±55	751±61	655±53		591±61 *	677±64	695±64
OVCAR WST 2.3.99	1170±97	1133±75	1037±126	869±12 ***	714±41 ***		1215±91	1086±23	563±39 ***
OVCAR BrdU 3.3.99	813±36	750±43	713±30 **	775±53	731±55 *		841±56	927±61 ***	518±30 ***

Legende zu Tabelle 11:

Die Tabelle zeigt Rohdaten, die durch Zellstimulationsversuche an Primärkulturen von 8 Strumen, 4 Rezidivstrumen, einem papillären Schilddrüsen-Karzinom und 4 Zelllinien erhalten wurden. Alle Versuche wurden in Anwesenheit von 5% fetalem Kälberserum durchgeführt. Activin wurde in Konzentrationen von 0.5 bis 50 ng/ml, Inhibin in Konzentrationen von 2.5 bis 50 ng/ml und TGFβ-1 in der Konzentration 10 ng/ml zugegeben. Jedem Meßwert liegen 6 Meßpunkte zugrunde. Die Zahlenwerte geben den Mittelwert ± Standardabweichung der Absorption bei spektrophotometrischer Quantifizierung im Mikrotiterplatten-Format an, die bei der jeweiligen Konzentration der Testsubstanz gemessen wurde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

Tabelle 12

Substanz		hr-Activin A											
Zellkultur		fetales Kälberserum 1% v/v, Primärkulturen aus verschiedenen Struma-Geweben (n = 3)											
Konzentration Test	0.5 ng/ml		2.5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		BrdU	MTT	BrdU	MTT	BrdU
	MTT	BrdU	MTT	BrdU	MTT	BrdU	MTT	BrdU					
% der Kontrolle Mittel±SD	106±11	123±11	100±3	109±8	85±6	105±1	88±4	99±2					
Max. Hemm.	-5	0	-4	0	-22	0	-16	-2					
Max. Stim.	+16	33	+2	+18	0	+6	0	+2					
Anteil der im Wachstum beeinflußten Kulturen	0%	100%	0%	33%	67%	0%	33%	0%					0%

Legende zu Tabelle 12:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 1% fetalem Kälberserum an 3 Struma-Geweben. Pro Primärkultur wurden ein MTT-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert ± SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl der untersuchten Kulturen (n) ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegen den Ergebnissen 4 MTT-Tests und 4 BrdU-Elisas zugrunde.

Maximale Hemmung: größte Hemmwirkung in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Maximale Stimulation: größte Wachstumsstimulation in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Anteil der im Wachstum beeinflüßten Kulturen: Prozentsatz der Kulturen, in denen das Wachstum der Zellen mit Signifikanz (p mindestens < 0.05) gehemmt oder stimuliert wurde.

Tabelle 13

Substanz		hr-Activin A							
Zellkultur		fetales Kälberserum 1% v/v, Primärkultur eines Rezidiv-Struma-Gewebes							
Konzentration		0.5 ng/ml		2.5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml	
Test		MTT	BrdU	MTT	BrdU	MTT	BrdU	MTT	BrdU
% der Kontrolle (Mittelwert)		108±6	81±23	103±10	82±17	97±11	79±15 *	88±7	78±14 **

Legende zu Tabelle 13:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 1% fetalem Kälberserum an einem Rezidiv-Struma-Gewebe. Es wurden ein MTT-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert ± SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen, bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl der untersuchten Kulturen (n) ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegt den Ergebnissen 1 MTT-Test und 1 BrdU-Elisa zugrunde. * =p<0.05, ** =p<0.01, *** =p<0.001

Tabelle 14

Substanz	hr-Activin												hr-TGFβ-1											
	fetales Kälberserum 5% v/v, Primärkulturen aus verschiedenen Struma-Geweben (n = 8)																							
Konzentration	0.5 ng/ml			2.5 ng/ml			10 ng/ml			50 ng/ml			2.5 ng/ml			10 ng/ml			50 ng/ml					
Test	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU
% der Kontrolle Mittel±SD	107 ± 4	101 ±3	102 ±18	104 ±4	99 ±1	99 ±11	100 ±4	95 ±4	97 ±8	95 ±3	91 ±6	96 ±13	103 ±3	98 ±1	98 ±4	108 ±3	93 ±2	98 ±6	110 ±3	97 ±2	102 ±10	95 ±10	83 ±11	
Max. Hemm.	0	-3	-23	0	-2	-17	-6	-10	-13	-7	-16	-20	-1	-3	-8	0	-8	-10	0	-5	-10	-20	-30	
Max. Stim.	+11	+3	+33	+9	0	+19	+4	0	+11	0	0	+13	+7	0	+3	+12	0	+8	+14	0	+22	+3	0	
Anteil der im Wachstum beeinflussten Kulturen	40%	0%	33%	0%	0%	13%	0%	0%	13%	20%	33%	38%	0%	0%	0%	40%	33%	0%	80%	0%	13%	40%	40%	

Legende zu Tabelle 14:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 1% fetalem Kälberserum an 8 Struma-Geweben. Pro Primärkultur wurden ein WST- oder MTT-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert ± SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen, bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl n der untersuchten Kulturen ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegen den Ergebnissen 5 WST-, 3 MTT-Tests und 8 BrdU-Elisas zugrunde.

Maximale Hemmung: größte Hemmwirkung in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Maximale Stimulation: größte Wachstumsstimulation in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle
Anteil der im Wachstum beeinflussten Kulturen: Prozentsatz der Kulturen, in denen das Zellwachstum mit Signifikanz (p mindestens < 0.05) gehemmt oder stimuliert wurde.

Tabelle 15

Substanz	hr-Activin A												hr-Inhibin A		hr-TGFβ-1								
	fetales Kälberserum 5% v/v Primärkulturen aus verschiedenen Rezidiv-Struma-Geweben (n = 4)																						
Konzentration Test	0.5 ng/ml			2.5 ng/ml			10 ng/ml			50 ng/ml			2.5 ng/ml			10 ng/ml			50 ng/ml				
	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT	BrdU	WST	MTT
% der Kontrolle Mittel±SD	100 ±4	102 ±5	96 ±8	96 ±5	94 ±2	86 ±9	94 ±1	97 ±8	84 ±10	89 ±1	86 ±8	72 ±12	100 ±3	95 ±9	94 ±5	100 ±5	91 ±14	99 ±17	102 ±6	94 ±6	67 ±15	81 ±9	67 ±15
Max. Hemm.	-3		-12	-9		-25	-7		-24	-12		-38	-3		-10	-5		-12	-4		-8	-29	-43
Max. Stim.	+4		+7	0		0	0		0	0		0	+2		0	+4		+24	+6		0	0	0
Anteil der im Wachstum beeinflußten Kulturen	0%		0%	0%		25%	33%		75%	100%		75%	0%		0%	0%		25%	33%		100%	100%	100%

Legende zu Tabelle 15:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 5% v/v fetalem Kälberserum an vier Rezidiv-Struma-Geweben. Pro Kultur wurden ein WST- oder MTT-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert ± SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen, bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl n der untersuchten Kulturen ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegen den Ergebnissen 3 WST-Tests, 1 MTT-Test und 4 BrdU-Elisas zugrunde.

Maximale Hemmung: größte Hemmwirkung in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Maximale Stimulation: größte Wachstumsstimulation in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Anteil der im Wachstum beeinflüßten Kulturen: Prozentsatz der Kulturen, in denen das Wachstum der Zellen mit Signifikanz (p mindestens <0.05) gehemmt oder stimuliert wurde.

Tabelle 16

Substanz Zellkultur	hr-Activin A						hr-Inhibin A						hr-TGFβ-1			
	5% FKS, Struma- und Rezidivstruma-Kulturen mit signifikanter Wachstumsbeeinflussung durch hr-Activin A															
Konzentration	0,5 ng/ml		2,5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		2,5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		10 ng/ml	
Test	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU
% der Kontrolle Mittel±SD	102 ±2	99 ±18	97 ±3	90 ±10	94 ±2	88 ±9	88 ±5	76 ±11	100 ±3	97 ±5	100 ±6	99 ±12	102 ±7	101 ±11	87 ±11	69 ±11
Max. Hemm.	-3	-23	-9	-25	-10	-24	-16	-38	-5	-10	-9	-12	-6	-8	-29	-43
Max. Stim.	+4	+33	0	+6	0	0	0	0	+4	+3	+7	+24	+10	+22	+2	0
Anteil der im Wachstum beeinflussten Kulturen	0%	29%	0%	29%	14%	29%	86%	86%	0%	0%	0%	14%	29%	14%	80%	100%

Legende zu Tabelle 16:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 5% v/v fetalem Kälberserum an 3 Struma- und 4 Rezidiv-Struma-Gewebe, die bei einer Activin-Konzentration von 50 ng/ml eine signifikante Wachstumshemmung (p mindestens $< 0,05$) zeigten. Pro Kultur wurden ein WST- oder MTT-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert \pm SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen, bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl n der untersuchten Kulturen ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegen den Ergebnissen 5 WST-, 2 MTT-Tests und 7 BrdU-Elisas zugrunde.

Maximale Hemmung: größte Hemmwirkung in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Maximale Stimulation: größte Wachstumsstimulation in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Anteil der im Wachstum beeinflussten Kulturen: Prozentsatz der Kulturen, in denen das Wachstum der Zellen mit Signifikanz (p mindestens $< 0,05$) gehemmt oder stimuliert wurde.

Tabelle 17

Substanz Zellkultur	hr-Activin A										hr-Inhibin A		hr-TGFβ-1			
	5% FKS, Struma-Kulturen ohne signifikante Wachstumsbeeinflussung durch hr-Activin A															
Konzentration	0,5 ng/ml		2,5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		2,5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		10 ng/ml	
Test	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU	WST/ MTT	BrdU
% der Kontrolle Mittel±SD	106 ±6	101 ±13	104 ±4	101 ±12	100 ±3	99 ±8	96 ±3	103 ±10	100 ±5	96 ±4	103 ±9	97 ±7	106 ±8	99 ±8	94 ±12	91 ±3
Max. Hemm.	-3	-16	-1	-14	-4	-10	-7	-11	-3	-8	-8	-10	-4	-10	-20	-12
Max. Stim.	+11	+19	+9	+19	+4	+11	0	+13	+7	0	+12	+8	+14	+9	+3	0
Anteil der im Wachstum beeinflussten Kulturen	40%	20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	40%	0%	60%	0%	33%	0%

Legende zu Tabelle 17:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 5% v/v fetalem Kälberserum an 5 Struma-Geweben, die bei einer hr-Activin A -Konzentration von 50 ng/ml keine signifikante Wachstumshemmung (p mindestens $< 0,05$) zeigten. Pro Kultur wurden ein WST- oder MTT-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert \pm SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen, bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl n der untersuchten Kulturen ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegen den Ergebnissen 3 WST-, 2 MTT-Tests und 5 BrdU-Elisas zugrunde.

Maximale Hemmung: größte Hemmwirkung in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Maximale Stimulation: größte Wachstumsstimulation in einer Primärkultur durch Zusatz der Testsubstanz, angegeben in Prozent der Kontrolle

Anteil der im Wachstum beeinflussten Kulturen: Prozentsatz der Kulturen, in denen das Wachstum der Zellen mit Signifikanz (p mindestens $< 0,05$) gehemmt oder stimuliert wurde.

Tabelle 18

Substanz	hr-Activin A						hr-Inhibin A						hr-TGFβ-1			
Zeilkultur	FKS 5% v/v, Primärkultur eines papillären Schilddrüsenkarzinoms															
Konzentration	0.5 ng/ml		2.5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		2.5 ng/ml		10 ng/ml		50 ng/ml		10 ng/ml	
Test	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU
% der Kontrolle Mittel±SD	115±5 **	98±4	113±4 **	106±8	113±6 **	112±5 *	112±6 *	118±8 *	106±4	103±7	110±3 *	96±8	115±3 ***	93±8	117±8 ***	100±6

Legende zu Tabelle 18:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 5% v/v fetalem Kälberserum an der Primärkultur eines papillären Schilddrüsen-Karzinoms. Es wurden ein WST-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert ± SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen, bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl der untersuchten Kulturen (n) ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegen den Ergebnissen 1 WST-Test und BrdU-Elisa zugrunde. *p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001

Tabelle 19

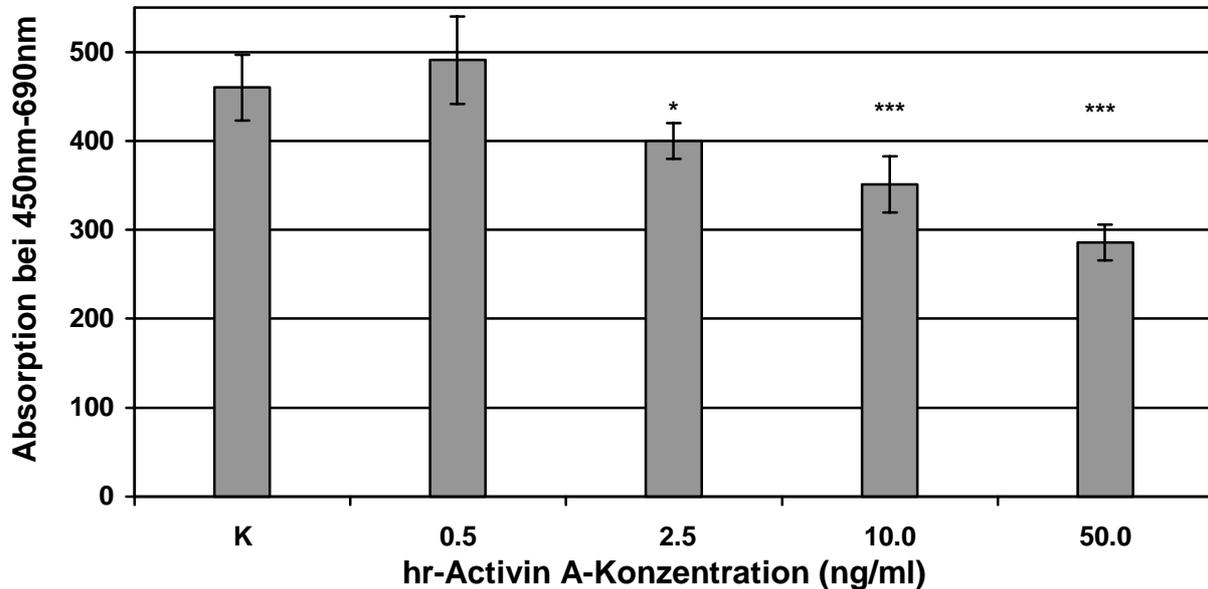
Substanz Konzentration	hr-Activin A						hr-Inhibin A						hr-TGFβ-1		
	0.5 ng/ml	2.5 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml	50 ng/ml	10 ng/ml
Zelllinie	133/7 (FTC)														
Test	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST
% der Kontrolle (Mittelwert)	90 **	102	98	92	95	90	97	96	100	104	95	112	39 ***	104	104
Zelllinie	238/25 (FTC)														
Test	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST
% der Kontrolle (Mittelwert)	58 ***	122	89	109	99	110	86	104	97	104	61 ***	115	66 ***	99	99
Zelllinie	MCF7 (Mamma-Karzinom)														
Test	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST
% der Kontrolle (Mittelwert)	86 **	109	85 ***	115	80 ***	105	75 ***	92	87 **	83 *	82 ***	95	85 ***	98	98
Zelllinie	Ovcar (Ovarial-Karzinom)														
Test	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST	BrdU	WST
% der Kontrolle (Mittelwert)	97	92	89	88 **	74 ***	95	61 ***	90 *	104	103	93	114 ***	48 ***	64 ***	64 ***

Legende zu Tabelle 19:

Die Tabelle zeigt die Ergebnisse der Zellstimulationsversuche in Anwesenheit von 5% v/v fetalem Kälberserum an vier verschiedenen Zelllinien. Pro Kultur wurden ein WST-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt.

% der Kontrolle: Mittelwert ± SD berechnet mit den Mittelwerten von n untersuchten Kulturen, bezogen auf die Kontrolle, die als einhundert Prozent definiert wurde. Die Anzahl n der untersuchten Kulturen ist für jede FKS-Konzentration und den verwendeten Test definiert. In diesem Fall liegen den Ergebnissen jeweils 1 WST-Test und 1 BrdU-Elisa zugrunde. *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$

Abb. 1
Der Einfluß von hr-Activin A auf die Proliferation primärer Follikel­epithelzellen einer Rezidivstruma (BrdU-ELISA)

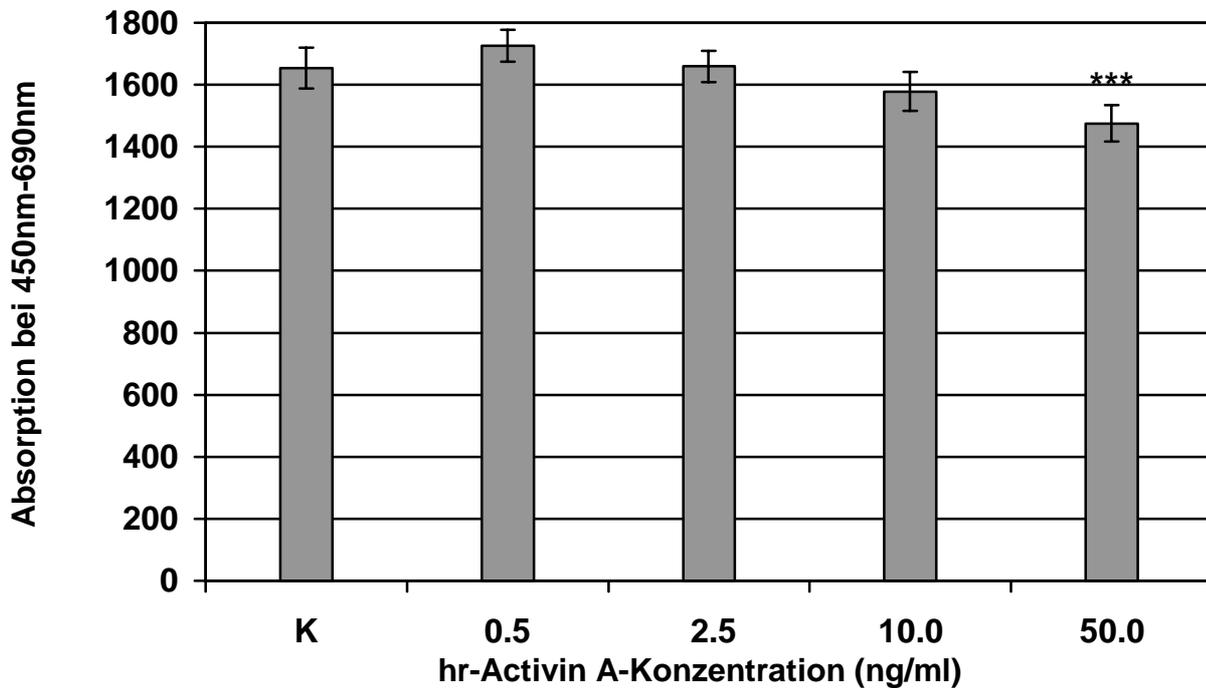


Legende zu Abb.1:

Je 3000-4000 Follikel­epithelzellen einer Primärkultur aus menschlichem Schilddrüsengewebe wurden in DMEM/HAM F12-Medium mit 5% FKS für 24 Stunden bei Standardbedingungen inkubiert. Die Testsubstanz hr-Activin A wurde in Konzentrationen von 0.5 bis 50 ng/ml zugegeben. Nach Inkubation für weitere 72 Stunden wurde der BrdU-ELISA durchgeführt und die Absorption bei 450 nm und der Referenzwellenlänge 690 nm gemessen. Die Abbildung zeigt die Absorption bei 450 nm ohne Zusatz von hr-Activin A bei der Kontrolle (K) und nach Zusatz von Activin in den Konzentrationen 0.5, 2.5, 10 und 50 ng/ml. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung. Jedem Meßwert liegen sechs Meßpunkte zugrunde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Abb. 2

Der Einfluß von hr-Activin A auf die Proliferation primärer Follikelepithelzellen einer Rezidivstruma (WST-Versuch)

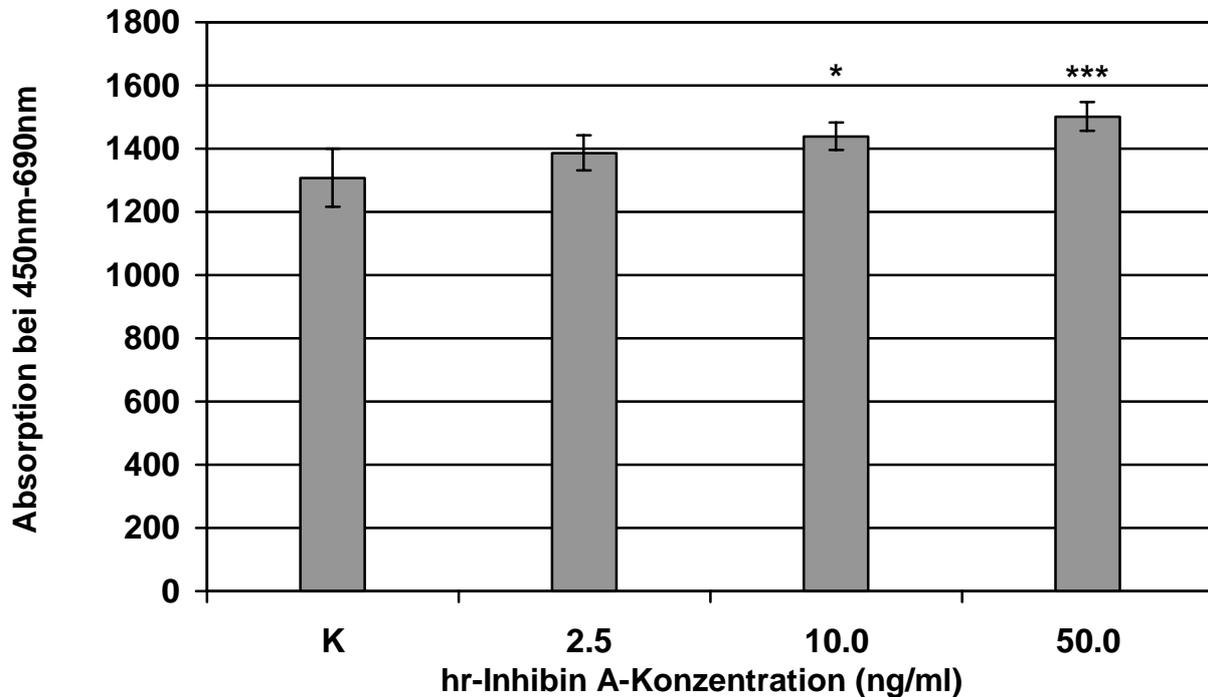


Legende zu Abb. 2:

Je 3000-4000 Zellen einer Primärkultur aus menschlichen Follikelepithelzellen der Schilddrüse wurden pro Vertiefung einer 96-Well-Platte in DMEM/HAM F12-Medium (1:1) mit 5% FKS für 24 Stunden inkubiert. Die Testsubstanz hr-Activin A wurde in Konzentrationen von 0.5 bis 50 ng/ml zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden wurde der WST-Test durchgeführt und die Absorption bei 450 nm und 690 nm Referenzwellenlänge gemessen. Die Abbildung zeigt die Absorption bei 450 nm ohne Zusatz von hr-Activin A bei der Kontrolle (K) und bei Konzentrationen von 0.5, 2.5, 10 und 50 ng/ml Activin A. Jedem Meßwert liegen sechs Meßpunkte zugrunde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Abb. 3

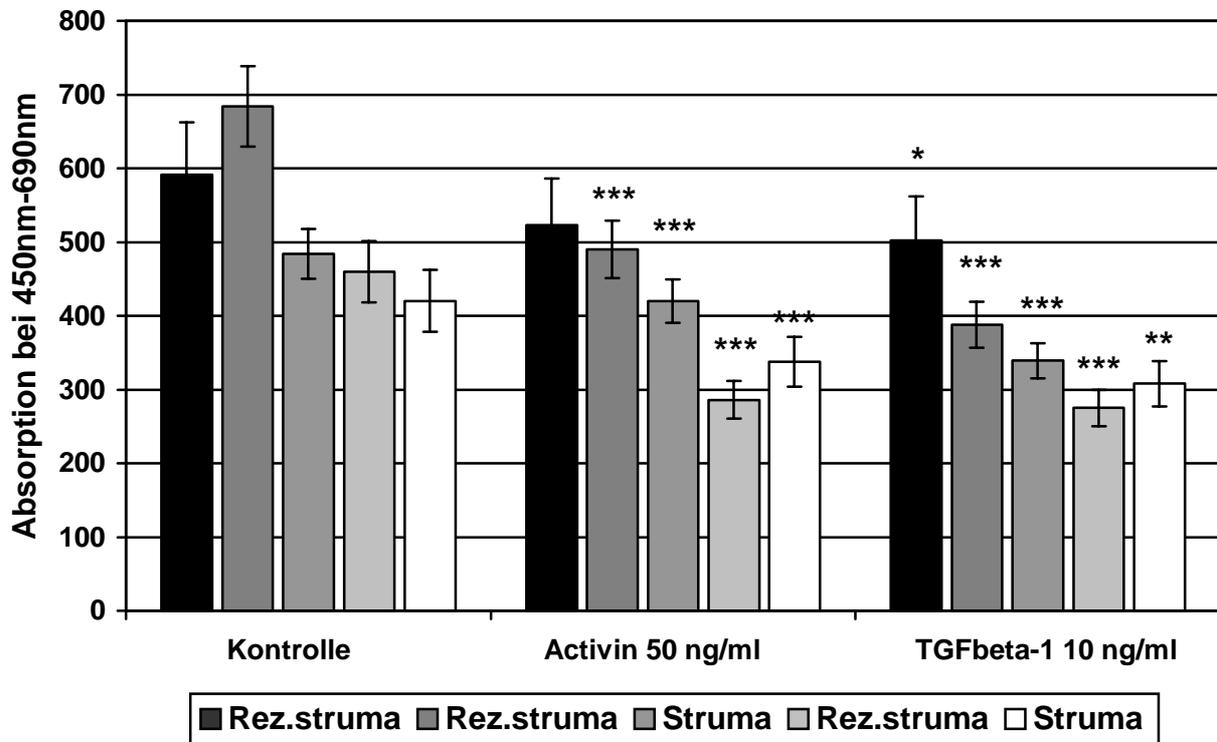
hr-Inhibin A stimuliert das Wachstum primärer Follikel­epithel-Zellen eines papillären Schilddrüsen-Karzinoms in vitro (WST-Versuch)



Legende zu Abb. 3:

Je 3000-4000 Zellen einer Primärkultur aus menschlichen Follikel­epithelzellen der Schilddrüse wurden pro Vertiefung einer 96-Well-Platte in DMEM/HAM F12-Medium (1:1) mit 5% FKS für 24 Stunden inkubiert. Die Testsubstanz hr Inhibin A wurde in Konzentrationen von 2.5 bis 50 ng/ml zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 120 Stunden wurde der WST-Test durchgeführt und die Absorption bei 450 nm und 690 nm Referenzwellenlänge gemessen. Die Abbildung zeigt die Absorption bei 450 nm ohne Zusatz von hr-Inhibin A bei der Kontrolle (K) und bei Konzentrationen von 2.5, 10 und 50 ng/ml Activin A. Jedem Meßwert liegen sechs Meßpunkte zugrunde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

Abb. 4
hr-TGFbeta-1 hemmt stärker als hr-Activin A die Proliferation primärer
Follikel epithelzellen der menschlichen Schilddrüse (BrdU-ELISA)



Legende zu Abb.4:

Je 3000-4000 Zellen einer Primärkultur aus menschlichen Follikel epithelzellen der Schilddrüse wurden pro Vertiefung einer 96-Well-Platte in DMEM/HAM F12-Medium (1:1) mit 5% FKS für 24 Stunden inkubiert. Die Testsubstanz hr-Activin A wurde in der Konzentration 50 ng/ml und hr-TGFbeta-1 in der Konzentration 10 ng/ml zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden wurde der BrdU-ELISA durchgeführt und die Absorption bei 450 nm und 690 nm Referenzwellenlänge gemessen. Die Abbildung zeigt die Absorption bei 450 nm ohne Zusatz von Testsubstanzen bei der Kontrolle (K) und nach Zusatz der Testsubstanzen. Jedem Meßwert liegen sechs Meßpunkte zugrunde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests (* = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$).

3.1.2 Maximale Hemmbarkeit und Konzentration halbmaximaler Proliferationsinhibition nach Zugabe von hr-Activin A (0,5-50 ng/ml) zu Primärkulturen menschlicher Schilddrüsen-Zellen

Tabelle 20

Kultur-Nr.	Histologie	BrdU, I max	BrdU, p-Wert	BrdU, IC ₅₀	WST, I max	WST, p-Wert	WST, IC ₅₀
720	PTC	-2	ns.	#	#	#	#
740	Struma nodosa	-16	*	2,5	-4	ns.	#
742	Struma nodosa	-23	***	10	-16	*	10
744	Struma multinodosa	-11	ns.	#	-6	ns.	#
746	Str.multinodosa (Rezidiv)	-37	***	10	-14	**	2,5
748	kompensiertes autonomes Adenom (Rezidiv)	-21	**	50	-10	*	10
751	Struma nodosa	-1	ns.	#	-7	ns.	#
752	Struma nodosa	0	ns.	#	-5	ns.	#
753	Str.multinodosa (Rezidiv)	-28	***	2,5	-12	***	10
754	Struma nodosa	-13	***	2,5	-7	ns.	#
755	Struma nodosa (Rezidiv)	-38	***	10	-11	***	10
756	Struma nodosa	-20	***	10	-6	**	10
757	Struma nodosa	-2	ns.	#	0	ns.	#
133	FTC	-10	ns.	#	-10	**	10
238	FTC	+4	ns.	#	-42	***	50
	MCF-7	-8	ns.	#	-25	***	2,5
	Ovcar	-2	**	10	-39	***	10

Legende zu Tabelle 20:

An 17 verschiedenen Primärkulturen menschlicher Schilddrüsengewebe wurden Proliferationsversuche in Anwesenheit von 5% fetalem Kälberserum durchgeführt. Die Testsubstanz hr-Activin A wurde in den Konzentrationen 0,5, 2,5, 10 und 50 ng/ml zugesetzt. Pro Gewebe wurden ein WST-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt. Jedem Meßwert liegen sechs Meßpunkte zugrunde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

I_{max}: Maximale Hemmung der Proliferation, angegeben in Prozent der Kontrolle

IC₅₀: Konzentration von hr-Activin A, die eine halbmaximale Reduktion der Zellzahl herbeiführt, angegeben in ng/ml

3.1.3 Maximale Wachstumsstimulation und Konzentration mit halbmaximaler Proliferationsstimulation nach Zugabe von hr-Inhibin A (2,5-50 ng/ml) zu Primärkulturen menschlicher Schilddrüsen-Zellen

Tabelle 21

Kultur-Nr.	Histologie	BrdU, S max	BrdU, p-Wert	BrdU, SC ₅₀	WST, S max	WST, p-Wert	WST, SC ₅₀
720	PTC	#	#	#	+15	***	10
740	Struma nodosa	#	#	#	#	#	#
742	Struma nodosa	#	#	#	#	#	#
744	Struma multinodosa	#	#	#	#	#	#
746	Str.multinodosa (Rezidiv)	+24	***	10	#	#	#
748	kompensiertes autonomes Adenom (Rezidiv)	#	#	#	#	#	#
751	Struma nodosa	#	#	#	+11	**	50
752	Struma nodosa	#	#	#	+14	**	10
753	Str.multinodosa (Rezidiv)	#	#	#	#	#	#
754	Struma nodosa	#	#	#	#	#	#
755	Struma nodosa (Rezidiv)	#	#	#	+6	**	10
756	Struma nodosa	+22	*	10	+10	***	10
757	Struma nodosa	#	#	#	+10	**	10
133	FTC	#	#	#	#	#	#
238	FTC	#	#	#	#	#	#
	MCF-7	#	#	#	#	#	#
	Ovcar	+14	***	50	#	#	#

Legende zu Tabelle 21:

An 17 verschiedenen Primärkulturen menschlicher Schilddrüsen-Gewebe wurden Proliferationsversuche in Anwesenheit von 5% fetalem Kälberserum durchgeführt. Die Testsubstanz hr-Inhibin A wurde in den Konzentrationen 2,5, 10 und 50 ng/ml zugesetzt. Pro Gewebe wurden ein WST-Test und ein BrdU-Elisa durchgeführt. Jedem Meßwert liegen sechs Meßpunkte zugrunde. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des ANOVA-Tests (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

S_{max}: Maximale Stimulation der Proliferation, angegeben in Prozent der Kontrolle

SC₅₀: Konzentration von hr-Activin A, die eine halbmaximale Proliferationsstimulation der Zellzahl herbeiführt, angegeben in ng/ml

3.1.4 Zytotoxizität von Activin A, Inhibin und TGFβ-1

Die Versuche zur Zytotoxizität von Activin A, Inhibin und TGFβ-1 wurden an zwei primären Zellkulturen menschlicher Schilddrüsenzellen in doppelten Ansätzen durchgeführt, die sich lediglich in ihrer FKS-Konzentration von 0,5 bzw. 5% (v/v) unterschieden.

Tabelle 22

Primärkultur-Nr.	720		745	
FKS-Konz. (v/v)	0,5%	5,0%	0,5%	5,0%
Messung	Absorption bei einer Wellenlänge von 492 nm			
Activin 50 ng/ml	236	342	924	788
Inhibin 50 ng/ml	242	340	815	823
TGFβ-1 10 ng/ml	225	342	946	830
Activin 50 + Inhibin 50 ng/ml	225	326	822	767
Kontrolle	260	351	850	878

Legende zu Tabelle 22:

Bei Kultur Nr. 720 handelt es sich um Zellen eines follikulären Schilddrüsen-Karzinoms, bei Kultur Nr. 745 um die eines papillären Karzinoms. Pro Vertiefung wurden je 6000 Zellen einer Primärkultur in 1:1 Medium mit verschiedenen FKS-Konzentrationen für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Testsubstanzen zu den jeweiligen Zielkonzentrationen zugegeben. Nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden erfolgte die Aufarbeitung der Kulturen mit Hilfe eines enzymatischen Tests (LDH-Cytotoxicity, Fa. Boehringer) und anschließend die Extinktionsmessung bei einer Meßwellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm. Jedem Wert liegen 2 Meßpunkte zugrunde.

3.2 Charakterisierung der qualitativen und quantitativen RT-PCR zur Amplifikation von ALK4-1 bis 4-4, ALK5 sowie ActRII und ActRIIB

3.2.1 Reproduzierbarkeit der semi-quantitativen RT-PCR-Ergebnisse

Tabelle.23: Duplex-PCR mit ALK4-1 und GAPDH

Gewebetyp	Anzahl der Gewebe	Standardabweichung der Triplette als Mittel \pm SD für die Gruppe in %
PTC	18	57 \pm 42
FTC	8	36 \pm 18
Struma	16	45 \pm 25
Morbus Basedow	5	25 \pm 18
Normalgewebe	7	17 \pm 7

Legende zu Tab. 23:

Die RT-PCR-Versuche wurden jeweils in drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt. Aus den Tripletten wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Nach Zusammenfassung der Proben zu Gewebetyp-Gruppen wurden die Standardabweichungen der Proben einer Gruppe in Prozent der Mittelwerte angegeben und aus diesen Prozentwerten wiederum der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Tab. 24: Duplex-PCR mit ALK4-4 und GAPDH

Gewebetyp	Anzahl der Gewebe	Standardabweichung der Triplette als Mittel \pm SD für die Gruppe in %
PTC	18	52 \pm 45
FTC	8	44 \pm 44
Struma	16	44 \pm 34
M.Basedow	5	23 \pm 17
Normalgewebe	8	44 \pm 33

Legende zu Tab. 24:

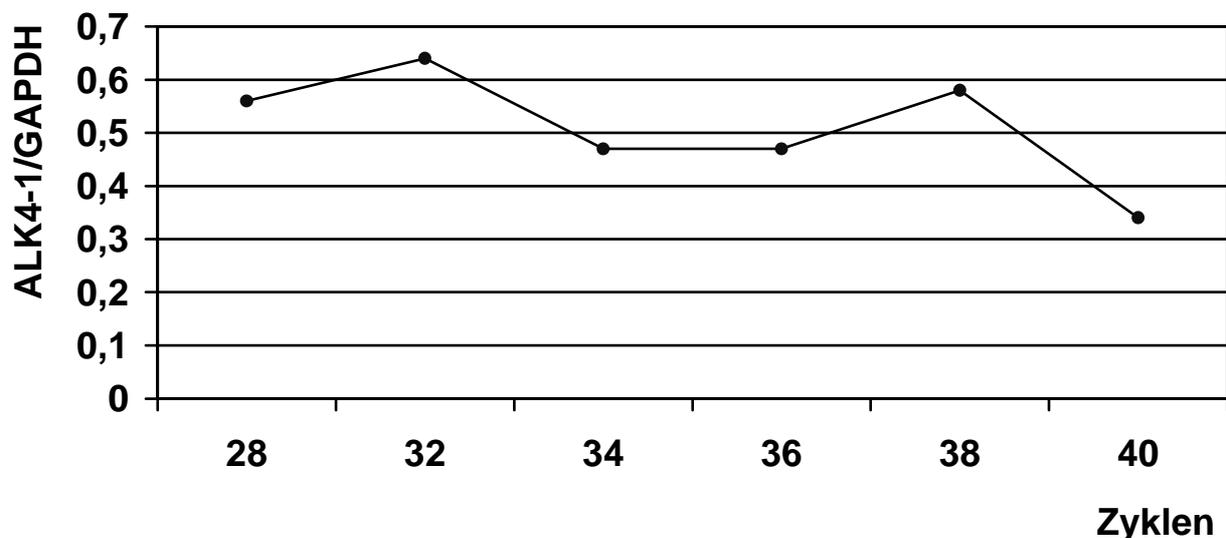
Die RT-PCR-Versuche wurden jeweils in drei voneinander unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt. Aus den Tripletten wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Nach Zusammenfassung der Proben zu Gewebetyp-Gruppen wurden die Standardabweichungen der Proben einer Gruppe in Prozent der Mittelwerte angegeben und aus diesen Prozentwerten wiederum der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

3.2.2 Linearitätskriterien der Duplex-PCR

3.2.2.1 Zyklusabhängiger Versuch mit dem Primerpaar ALK4-1 und GAPDH

Bei der Polymerasekettenreaktion kommt es durch Produktbildung bei zunehmender Zykluszahl abhängig von der Ausgangskonzentration zu abnehmender Amplifikationseffizienz. Daher mußte der Linearitätsbereich des Systems ermittelt werden, in dem das Verhältnis der Produkte sich nicht in Abhängigkeit der Zykluszahl der Duplex-PCR ändert. Sechs identische PCR-Ansätze durchliefen eine Amplifikation, bei der alle zwei Zyklen nach 28 bis 40 Zyklen ein Ansatz herausgenommen und gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Anhand der am Densitometer erhaltenen quantitativen Daten wurde der Quotient von ALK4-1 zu GAPDH gebildet.

Abb. 5 Duplex-PCR mit ALK4-1 und GAPDH



Legende zu Abb. 5:

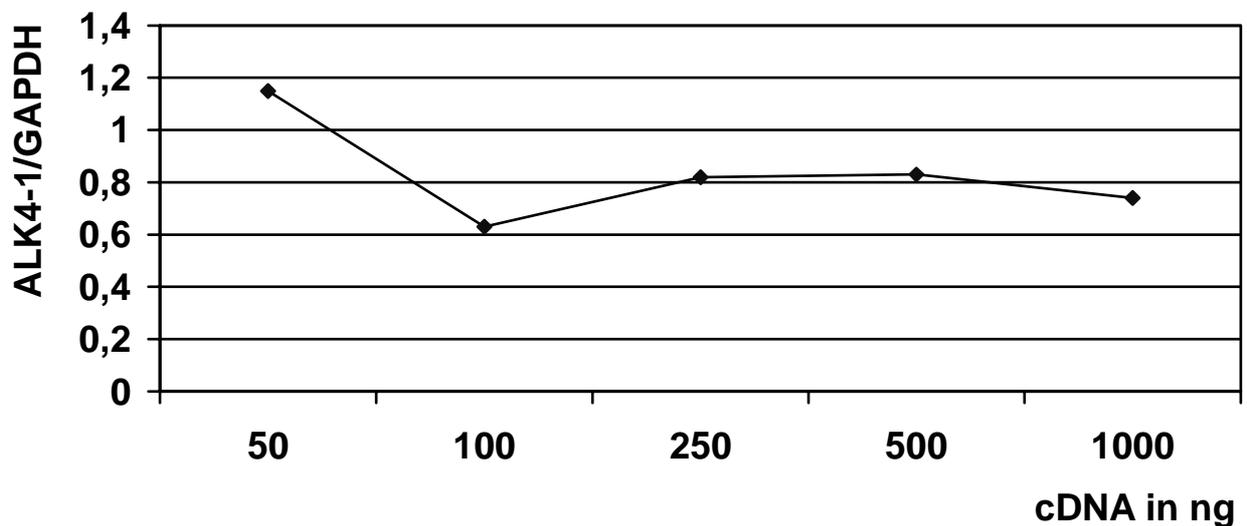
Das Diagramm zeigt zwischen dem 28. und 38. Zyklus eine relative ALK4-1/GAPDH-Ratio, die zwischen 0,47 und 0,64 liegt. Somit wird die in den folgenden PCR-Versuchen verwendete Zyklusanzahl von 35 Zyklen von diesem Linearitätsbereich eingeschlossen, in dem die Zykluszahl die ALK4-1/GAPDH-Ratio nur wenig beeinflusst.

3.2.2.2 Matrizenverdünnungsversuch mit dem Primerpaar ALK4-1 und GAPDH

Um den Einfluß der cDNA-Menge auf die ALK4-1/GAPDH-Ratio in der Polymerasekettenreaktion zu ermitteln, wurde eine PCR mit fünf Ansätzen durchgeführt, die sich lediglich in der Menge der cDNA, jedoch nicht in deren Qualität unterschieden.

Es wurden die Mengen 50, 100, 250, 500 und 1000 ng eingesetzt, unter identischen Bedingungen amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die quantitative Analyse erfolgte desitometrisch.

Abb. 6 Duplex-PCR mit ALK4-1 und GAPDH



Legende zu Abbildung 6:

Das Diagramm zeigt, daß die verwendete cDNA-Menge im Bereich zwischen 50 und 1000 ng nur einen geringen Einfluß auf das ALK4-1/GAPDH-Verhältnis hat.

3.2.3 Identifikation der RT-PCR-Produkte

3.2.3.1 Identifikation des ALK4-1-Rezeptor-Amplimers

Es sollte gezeigt werden, daß das in der RT-PCR erhaltene Amplifikat dem erwarteten Teilstück der Sequenz des ALK4-1-Rezeptors entspricht. Hierzu wurde unter den für die Oligonukleotid-Primer ALK4-Anker und ALK4-1 spezifischen PCR-Bedingungen cDNA aus humaner fetaler Leber (Fa. Clontech, Palo Alto, U.S.A.) amplifiziert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch von den verbliebenen Oligonukleotiden getrennt (PCR Purifikation Kit, Fa. Quiagen) und ein Aliquot auf einem PAA-Gel (8%) gegen einen Molekulargewichtsstandard (1 Kb Plus Leiter, Fa. Gibco) aufgetragen. Es hatte die erwartete Länge von 530 bp. Im Verfahren der Zyklussequenzierung mit Farbstoff-Terminatoren wurden ca. 50 ng des Produktes unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotid-Primer sequenziert (Fa. GATC, Konstanz):

```
CTTCCCATCACCCGCAGTGCCTCATAACTCTGCCACCAGTTGGGGATGTTGGGACGC
AGCTTCTGATCACATAAACCTTTCGCATTTCTCAATGGAAGGGTCAGAGGGCACTAA
GTCGTAATATGGCAGCTGATATTCTTCATGGACTCCTCCAGAATTGCATCTTCGAGCAAT
CTCCCAATATAACAAGCCCGAGGGCATAAATATCAGCACATTTAAAGGAGTCAAAGTGTTT
CATATTAATGGTTTCATCAAGTACTTCAGGGGCCATTGTATCGTTTTGGTCCCCACCCTCT
GATTTCGGGCAATGTCAATGGTGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGT
TCTGCTATGGACACACTGCCATTT
```

Diese Sequenz entspricht der in der Genbank abgelegten kodierenden Sequenz von ALK4-1 (Genbank Z22536) Basenpaare 1049-1413 (ten Dilke et al., Oncogene 1993).

3.2.3.2 Identifikation des ALK4-2-Rezeptor-Amplimers

Es sollte gezeigt werden, daß das in der RT-PCR erhaltene Amplifikat dem erwarteten Teilstück der Sequenz des ALK4-2-Rezeptors entspricht. Hierzu wurde unter den für die Oligonukleotid-Primer spezifischen PCR-Bedingungen cDNA aus humaner fetaler Leber (Fa. Clontech, Palo Alto, U.S.A.) amplifiziert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch von den verbliebenen Oligonukleotiden getrennt (PCR Purifikation Kit, Fa. Quiagen) und ein Aliquot auf einem PAA-Gel (8%) gegen einen Molekulargewichtsstandard (1 Kb Plus Leiter, Fa. Gibco) aufgetragen. Es hatte die erwartete Länge von 453 bp. Im Verfahren der Zyklussequenzierung mit Farbstoff-Terminatoren wurden ca. 50 ng des Produktes unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotid-Primer sequenziert (Fa. GATC, Konstanz):

```
GATTCCTCAATGGAAGGGTCAGAGGGCACTAAGTCGTAATATGGCAGCTGATATTCTT
CATGGACTCCTCCAGAATTGCATCTTCGAGCAATCTCCAATATACAAGCCCGAGGGCA
TAAATATCAGCACATTTAAAGGAGTCAAAGTGTTTCATATTAATGGTTTTCATCAAGTACTT
CAGGGGCCATGTATCGTTTTGGTCCCCACCCTCTGATTCGGGGCAATGTCAATGGTGTCA
GTGACTGCATCATGACGGACAGCCAGGCCAGGTCTGCTATGGCACACATGCCATTTTT
CTTACCAGAATGTTCTTTGACTTTAAGTCTCGATGA
```

Diese Sequenz entspricht der in der Genbank abgelegten kodierenden Sequenz von ALK4-2 (Genbank L22536) Basenpaare 996-1328 (ten Dijke et al., Onkogene 1993).

3.2.3.3 Charakterisierung des ALK4-4-Rezeptor-Amplimers

Um zu zeigen, daß das in der RT-PCR erhaltene Amplifikat dem erwarteten Teilstück der Sequenz des ALK4-4-Rezeptors entspricht, wurde unter den für die Oligonukleotid-Primer ALK4-Anker und ALK4-4 spezifischen PCR-Bedingungen cDNA aus humaner fetaler Leber (Fa. Clontech, Palo Alto, U.S.A.) amplifiziert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch von den verbliebenen Oligonukleotiden getrennt (PCR Purifikation Kit, Fa. Quiagen) und ein Aliquot auf einem PAA-Gel (8%) gegen einen Molekulargewichtsstandard (1 Kb Plus Leiter, Fa. Gibco) aufgetragen. Es hatte die erwartete Länge von 248 bp. Im Verfahren der Zyklussequenzierung mit Farbstoff-Terminatoren wurden ca. 50 ng des Produktes unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotid-Primer sequenziert (Fa. GATC, Konstanz):

CGTTTGGTCCCACCCTCTGATTCGGGGCAATGTCAATGGTGTGTCAGTGACTGCATCATGA
CGGACAGCCAGGCCAGGTCTGCTATGGCACACATGCCATTTTTCTTCACCAGAATGTT
CTTTGACTTTAAGTCTCGATGAGCAATTCCAGGCTTCCCTTGGGTGCCACGATCTC

Diese Sequenz entspricht der in der Genbank abgelegten Gen-Sequenz von ALK4 (Genbank Z22536) Basenpaare 1136-961 (ten Dilke et al., Oncogene 1993). Diese neue mRNA-Sequenz wird aktuell in der Gen-Bank abgelegt.

3.2.3.4 Identifikation des ALK5-Rezeptor-Amplimers

Es sollte gezeigt werden, daß das in der RT-PCR erhaltene Amplifikat dem erwarteten Teilstück der Sequenz des ALK5-Rezeptors entspricht. Hierzu wurde unter den für die Oligonukleotid-Primer spezifischen PCR-Bedingungen cDNA aus humaner fetaler Leber (Fa. Clontech, Palo Alto, U.S.A.) amplifiziert. Das Produkt wurde säulenchromatographisch von den verbliebenen Oligonukleotiden getrennt (PCR Purifikation Kit, Fa. Quiagen) und ein Aliquot auf einem PAA-Gel (8%) gegen einen Molekulargewichtsstandard (1 Kb Plus Leiter, Fa. Gibco) aufgetragen. Es hatte die erwartete Länge von 658 bp. Im Verfahren der Zyklussequenzierung mit Farbstoff-Terminatoren wurden ca. 50 ng des Produktes unter Verwendung der spezifischen Oligonukleotid-Primer sequenziert (Fa. GATC, Konstanz):

AAATTGACTTAATTCCTCGAGATAGGCCGTTTGTATGTGCACCCTCTTCAAAAAGTGGGT
CTGTGACTACAACATATTGCTGCAATCAGGACCATTGCAATAARATRGAAGTTCCTCAACTA
CTGTAAAGTCATCACCTGGCCTTGGTCCTGTGGAAGTGGCAGCTGTCATTGCTGGACCA
GTGTGCTTCGTCTGCATCTCACTCATGTTGATGGTCTATATCTGCCACAACCGCACTGTC
ATTCACCATCGAGTGCCAAATGAAGAGGACCCTTCATTAGATCGCCCTTTTATTTTCAGAG
GGTACTACGTTGAAAGACTTAATTTATGATATGACAACGTCAGGTTCTGGCTCAGGTTTA
CCATTGCTTGTTTCAGAGAA

Diese Sequenz entspricht der in der Genbank abgelegten kodierenden Sequenz von ALK5 (Genbank L11695) Basenpaare 297-675 (ten Dijke et al., Cell 1993).

3.3 Qualitative mRNA-Expression in benignen und malignen Schilddrüsengeweben bezogen auf GAPDH

Tabelle 25

	ALK4-1 (530 bp)	ALK4-2 (453 bp)	ALK4-3 (346 bp)	ALK4-4 (248 bp)	ALK5 (658 bp)	ActRII (434 bp)	ActRIIB (281 bp)
PTC	34/35 (97%)	13/16 (81%)	12/15 (80%)	34/34 (100%)	14/17 (82%)	14/14 (100%)	3/4 (75%)
FTC	14/14 (100%)	6/6 (100%)	6/7 (86%)	14/14 (100%)	8/8 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)
Struma	16/16 (100%)	12/12 (100%)	10/10 (100%)	16/16 (100%)	16/16 (100%)	15/15 (100%)	8/8 (100%)
M. Basedow	5/5 (100%)	5/5 (100%)	2/2 (100%)	5/5 (100%)	5/5 (100%)	n.u.	n.u.
Normalgewebe	12/12 (100%)	n.u.	n.u.	12/12 (100%)	n.u.	12/12 (100%)	n.u.

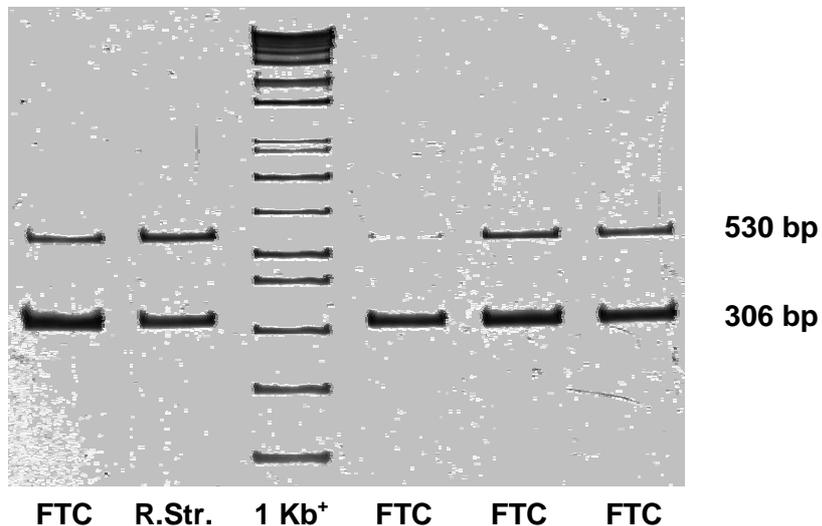
Legende zu Tabelle 25:

Die Tabelle zeigt die Anzahl der Proben, bei denen die cDNA des jeweiligen Rezeptors amplifiziert werden konnte in Bezug auf die Gesamtanzahl der Gewebe einer Gruppe. Die Gruppen, in denen ALK4-1 und ALK4-4 untersucht wurden, umfassen eine größere Anzahl von Proben, da diese auch in der späteren quantitativen Analyse untersucht wurden.

Einige Gewebe, die ein negatives Ergebnis für ALK4-3, ActRII oder ActRIIB zeigen, wurden nur in einer PCR getestet und gelten daher nicht als sicher negativ. n.u.: nicht untersucht.

Darstellung der RT-PCR-Amplifikate auf PAA-Gelen (8%)

Abbildung 7 ALK4-1 in der Duplex-PCR mit GAPDH



Legende zu Abb. 7:

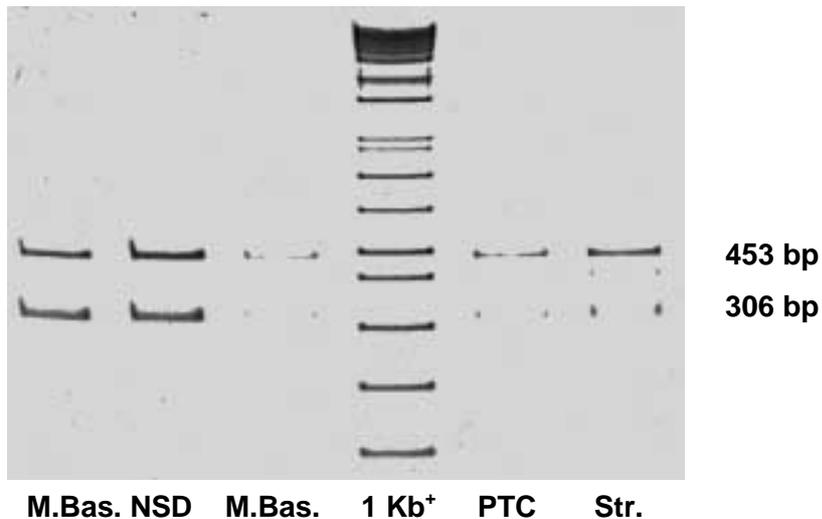
Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer RT-PCR, in der fünf verschiedene cDNA-Proben mit dem spezifischen Primer ALK4-1 und dem Referenzprimer GAPDH 306 amplifiziert wurden. Die Amplimere wurden auf einem PAA-Gel (8%) bei 153 Volt für 45 Minuten gegen einen Molekulargewichtsmarker (1 Kb Plus, Fa. Gibco) aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

FTC: Follikuläres Schilddrüsen-Karzinom

R.Str.: Rezidiv einer Struma

1 Kb⁺: 1 Kb Plus DNA Ladder, Molekulargewichts-Marker der Fa. Gibco

Abbildung 8 ALK4-2 in der Duplex-PCR mit GAPDH



Legende zu Abb. 8:

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer RT-PCR, in der fünf verschiedene cDNA-Proben mit dem spezifischen Primer ALK4-2 und dem Referenzprimer GAPDH 306 amplifiziert wurden. Die Amplimere wurden auf einem PAA-Gel (8%) bei 153 Volt für 45 Minuten gegen einen Molekulargewichtsmarker (1 Kb Plus, Fa. Gibco) aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

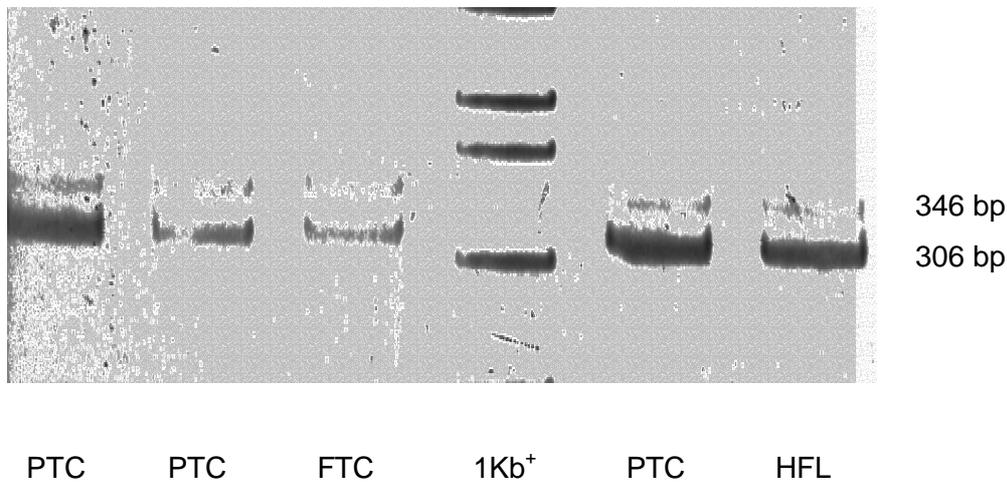
M.Bas.: Morbus Basedow

NSD: Nebenschilddrüsen-Karzinom

PTC: Papilläres Schilddrüsen-Karzinom

1 Kb⁺: 1 Kb Plus DNA Ladder, Molekulargewichts-Marker der Fa. Gibco

Abbildung 9 ALK4-3 in der Duplex-PCR mit GAPDH



Legende zu Abb. 9:

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer RT-PCR, in der fünf verschiedene cDNA-Proben mit dem spezifischen Primer ALK4-3 und dem Referenzprimer GAPDH 306 amplifiziert wurden. Die Amplimere wurden auf einem PAA-Gel (8%) bei 153 Volt für 45 Minuten gegen einen Molekulargewichtsmarker (1 Kb Plus, Fa. Gibco) aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

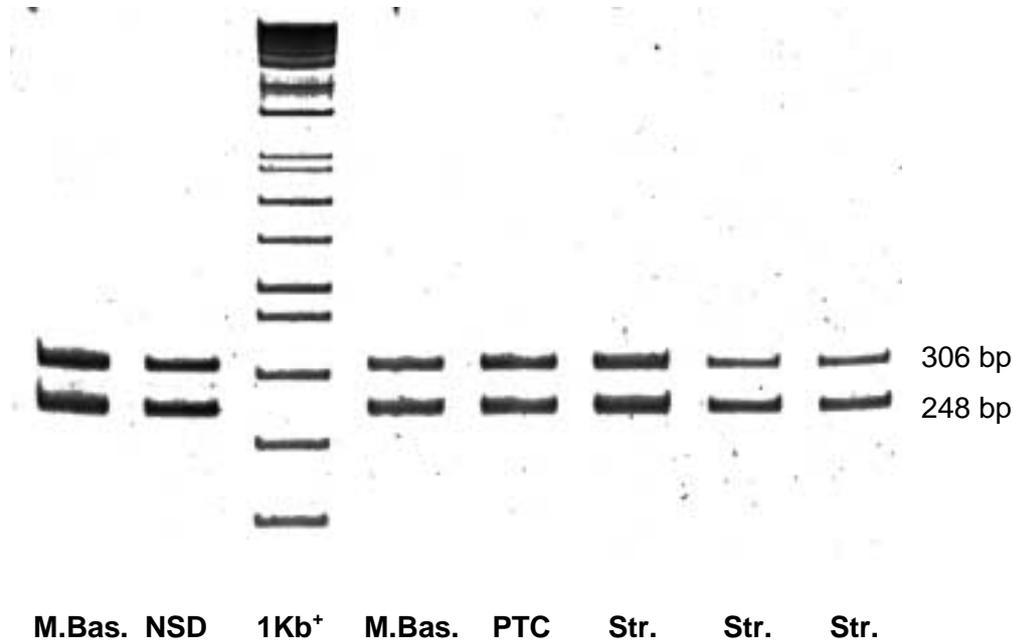
PTC: Papilläres Schilddrüsen-Karzinom

FTC: Follikuläres Schilddrüsen-Karzinom

HFL: Humane fetale Leber (Fa. Clontech)

1 Kb⁺: 1 Kb Plus DNA Ladder, Molekulargewichts-Marker der Fa. Gibco

Abbildung 10 ALK4-4 in der Duplex-PCR mit GAPDH



Legende zu Abb. 10:

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer RT-PCR, in der sieben verschiedene cDNA-Proben mit dem spezifischen Primer ALK4-4 und dem Referenzprimer GAPDH 306 amplifiziert wurden. Die Amplimere wurden auf einem PAA-Gel (8%) bei 153 Volt für 45 Minuten gegen einen Molekulargewichtsmarker (1 Kb Plus, Fa. Gibco) aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

M.Bas.: Morbus Basedow

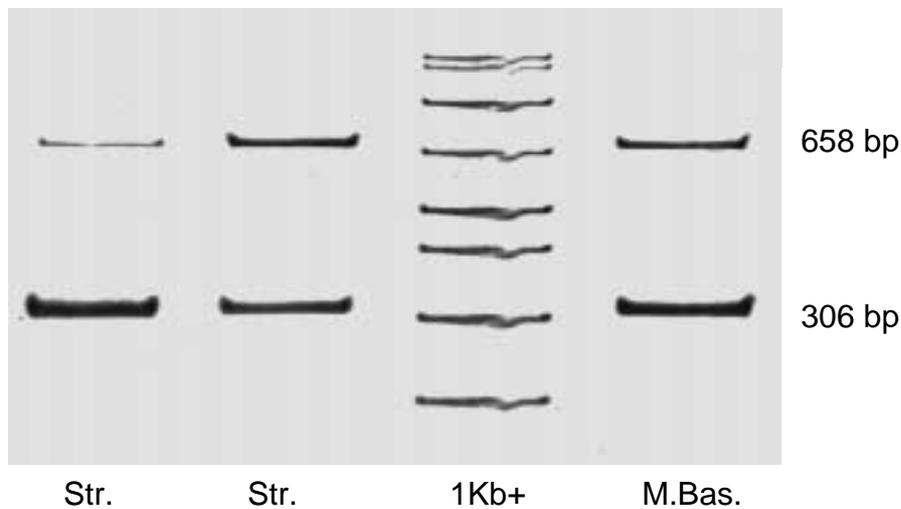
PTC: Papilläres Schilddrüsen-Karzinom

NSD: Nebenschilddrüsen-Karzinom

Str.: Struma

1 Kb⁺: 1 Kb Plus DNA Ladder, Molekulargewichts-Marker der Fa. Gibco

Abbildung 11 ALK5 und GAPDH in der Duplex-PCR



Legende zu Abb. 11:

Die Abbildung zeigt das Ergebnis einer RT-PCR, in der drei verschiedene cDNA-Proben mit dem spezifischen Primer ALK5 und dem Referenzprimer GAPDH 306 amplifiziert wurden. Die Amplimere wurden auf einem PAA-Gel (8%) bei 153 Volt für 45 Minuten gegen einen Molekulargewichtsmarker (1 Kb Plus, Fa. Gibco) aufgetrennt. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

Str.: Struma

M.Bas.: Morbus Basedow

1 Kb⁺: 1 Kb Plus DNA Ladder, Molekulargewichts-Marker der Fa. Gibco

3.4 Semi-quantitative m-RNA-Expression von ALK4-1 und ALK4-4 bezogen auf Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Tabelle 26

Gewebetyp	n	ALK4-4/ ALK4-1	ALK4-4	ALK4-1
Differenziertes SD-Karzinom	26	1,4±3,0	0,5±0,6^{***}	0,3±0,3^{***}
papillär	18	1,7±3,7	0,6±0,7 ^{***}	0,4±0,3 ^{***}
follikulär	8	0,9±0,6	0,4±0,2 ^{***}	0,3±0,1 ^{***}
Struma	17	1,2±0,5	1,3±1,1^{***}	1,4±1,0 n.s.
Basedow	5	0,9±0,2	1,0±0,5^{***}	1,0±0,7 n.s.
Normalgewebe	8	3,2±1,4	5,3±3,8	1,3±0,5

Legende zu Tab. 26:

Die Tabelle zeigt die RT-PCR-Ergebnisse von ALK4-4 und ALK4-1. Insgesamt wurden eine Anzahl (n) von 56 malignen und benignen Schilddrüsengeweben untersucht. Die Gruppe der differenzierten Schilddrüsen-Karzinome wurde nochmals in papilläre und follikuläre Neoplasien unterteilt. Das Signifikanzniveau jeder Gewebegruppe in Bezug auf die Normalgewebe wurde mit dem T-Test für unverbundene Stichproben ermittelt: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. ns.: nicht signifikant.

3.4.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der RT-PCR mit Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz-Gen

Die statistische Signifikanz der Differenz der Mittelwerte im Vergleich definierter Gruppen wurde mit dem Student-T-Test für unverbundene Stichproben nach vorheriger Analyse der Varianzgleichheit vorgenommen. Die Gruppe der papillären Schilddrüsen-Karzinome ist mit $p < 0.05$ und die der follikulären Karzinome mit $p < 0.01$ signifikant unterschiedlich von der Gruppe der Strumen bezüglich der m-RNA für ALK4-4. Für ALK4-1 sind die papillären Schilddrüsen-Karzinome ($p < 0.01$) und die follikulären Karzinome ($p < 0.001$) ebenfalls signifikant verschieden von den Strumen. Für folgende Kriterien wurde eine statistische Untergruppenanalyse durchgeführt, die weder für die Expressionsratio ALK4-1/GAPDH noch für die Ratio ALK4-4/GAPDH einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppe zeigte: Tumor-Stadium nach UICC, Tumor-Größe in cm, kapselüberschreitendes Wachstum, Lymphknoten-Stadium nach UICC, Präsenz oder Fehlen von Lymphknoten-Metastasen, Geschlecht und Alter.

3.5 Semi-quantitative m-RNA-Expression von ALK4-1 und ActR11 bezogen auf Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD)

Tabelle 27

Gewebetyp	n	ALK4-1	ActR11
Differenziertes SD-Karzinom	31	0,45±0,41 ***	2,69±2,46 n.s.
papillär	25	0,46±0,42 *	2,68±2,53 n.s.
follikulär	6	0,42±0,38 *	2,71±2,37 n.s.
Struma	15	0,52±0,30 *	3,35±1,80 n.s.
Normalgewebe	12	1,54±1,49	3,60±1,90

Legende zu Tab.27:

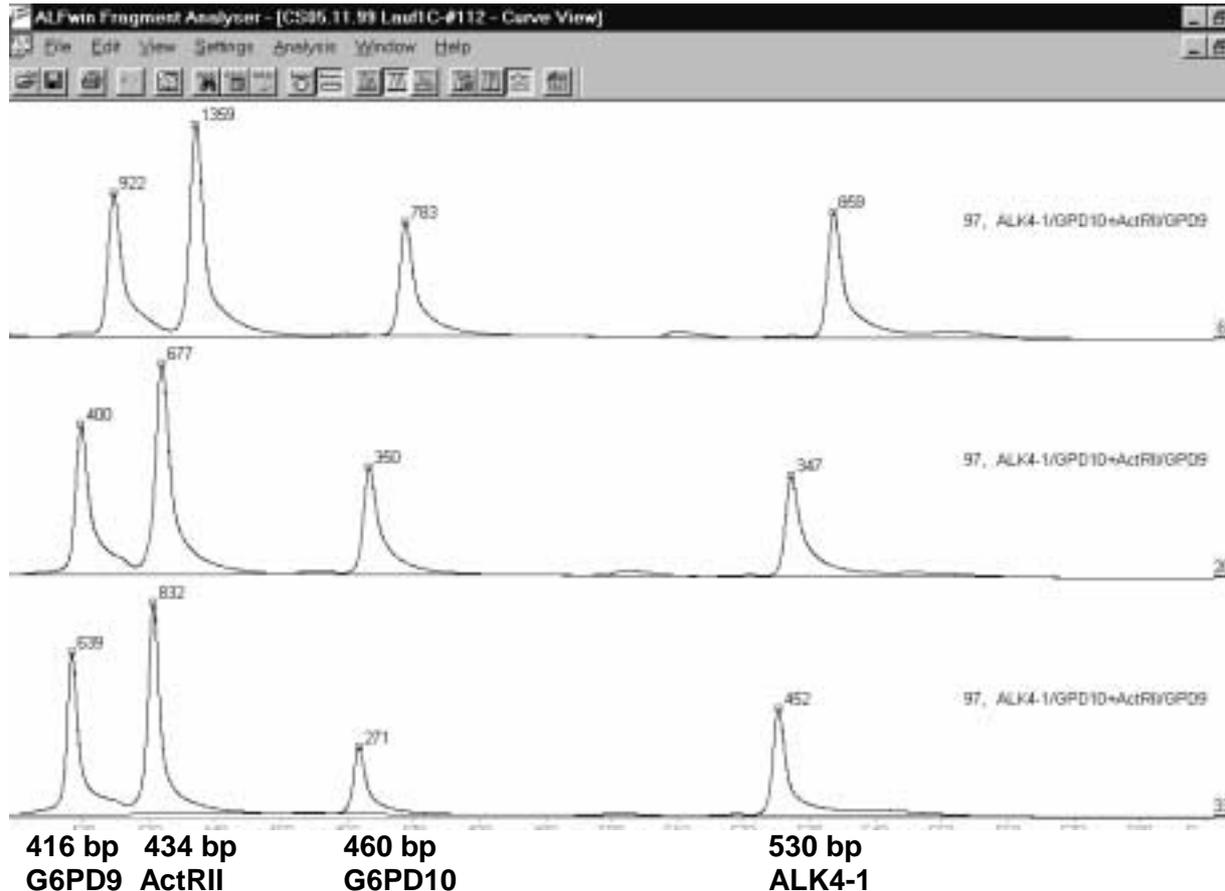
Die Tabelle zeigt die RT-PCR-Ergebnisse von ALK4-1 und ActRIIB. Insgesamt wurden eine Anzahl (n) von 66 malignen und benignen Schilddrüsengeweben untersucht. Die Gruppe der differenzierten Schilddrüsen-Karzinome wurde nochmals in papilläre und follikuläre Neoplasien unterteilt. Das Signifikanzniveau jeder Gewebegruppe in Bezug auf die Normalgewebe wurde mit dem T-Test für unverbundene Stichproben ermittelt: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$. ns.: nicht signifikant

3.5.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse aus der RT-PCR mit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD) als Referenz-Gen

Die statistische Signifikanz der Differenz der Mittelwerte im Vergleich definierter Gruppen wurde mit dem Student-T-Test für unverbundene Stichproben nach vorheriger Analyse der Varianzgleichheit vorgenommen. Ein mit $p = 0,02$ signifikanter Unterschied zwischen den Mittelwerten fand sich, wenn alle benignen ($n = 31$) und alle malignen ($n = 35$) Erkrankungen miteinander bezüglich ALK4-1 verglichen wurden. Die Gruppe der benignen Erkrankungen der Schilddrüse umschließt Strumen, Rezidiv-Strumen, M. Basedow und Normalgewebe der Schilddrüse. Für folgende Kriterien wurde eine statistische Untergruppenanalyse durchgeführt, die weder für die Expressionsratio ALK4-1/G6PD10 noch für die Ratio ActRIIB/G6PD10 einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Mittelwerten der Gruppe zeigte: Tumor-Stadium nach UICC, Tumor-Größe in cm, kapselüberschreitendes Wachstum, Lymphknoten-Stadium nach UICC, Präsenz oder Fehlen von Lymphknoten-Metastasen, Geschlecht und Alter.

3.5.2 Darstellung der RT-PCR-Amplifikate auf Polyacrylamid-Gelen (8%) im Laser-aktivierten Fluoreszenz-Sequenator

Abbildung 22 : Fragmentanalyse der PCR-Amplimere aus der differentiell quantitativen Duplex-RT-PCR mit den Primer-Paaren Alk 4-1/G6PD10 und ActRII/G6PD9

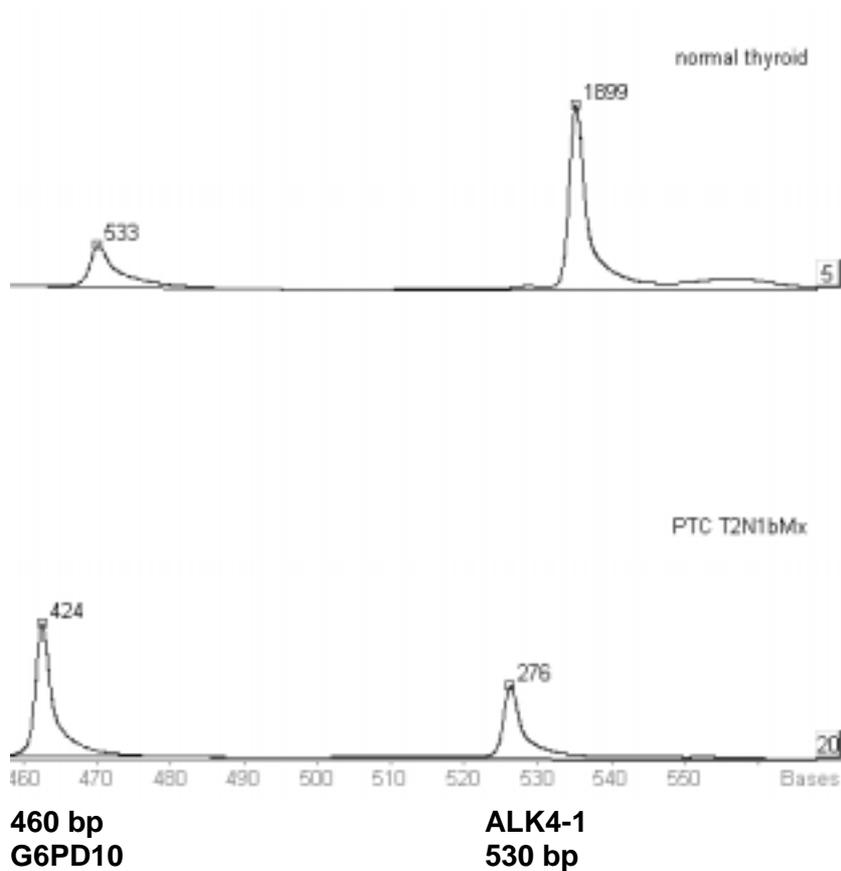


Legende zu Abb.22:

Um die mRNA-Expression des Activin-Typ-Ib-Rezeptors ALK4-1 (530 bp) und des Activin-Typ-II-Rezeptors ActRII (434 bp) im Vergleich zu G6PD10 (460 bp) bzw. G6PD9 (416bp) zu ermitteln, wurde eine semi-quantitative Duplex-PCR mit cybergreen-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Amplimere wurden auf einem laser-aktivierten Fluoreszenz-Sequenator (A.L.F.) aufgetrennt. Die Flächen unter den Kurven wurden berechnet. Von jeder Probe wurden, wie hier zu sehen bei Probe 97, unabhängige Triplikate analysiert.

Abbildung 23.

Die mRNA-Expression des Activin-Typ-Ib-Rezeptors ALK4-1 ist in papillären Schilddrüsen-Karzinomen im Vergleich zu Normalgewebe vermindert.

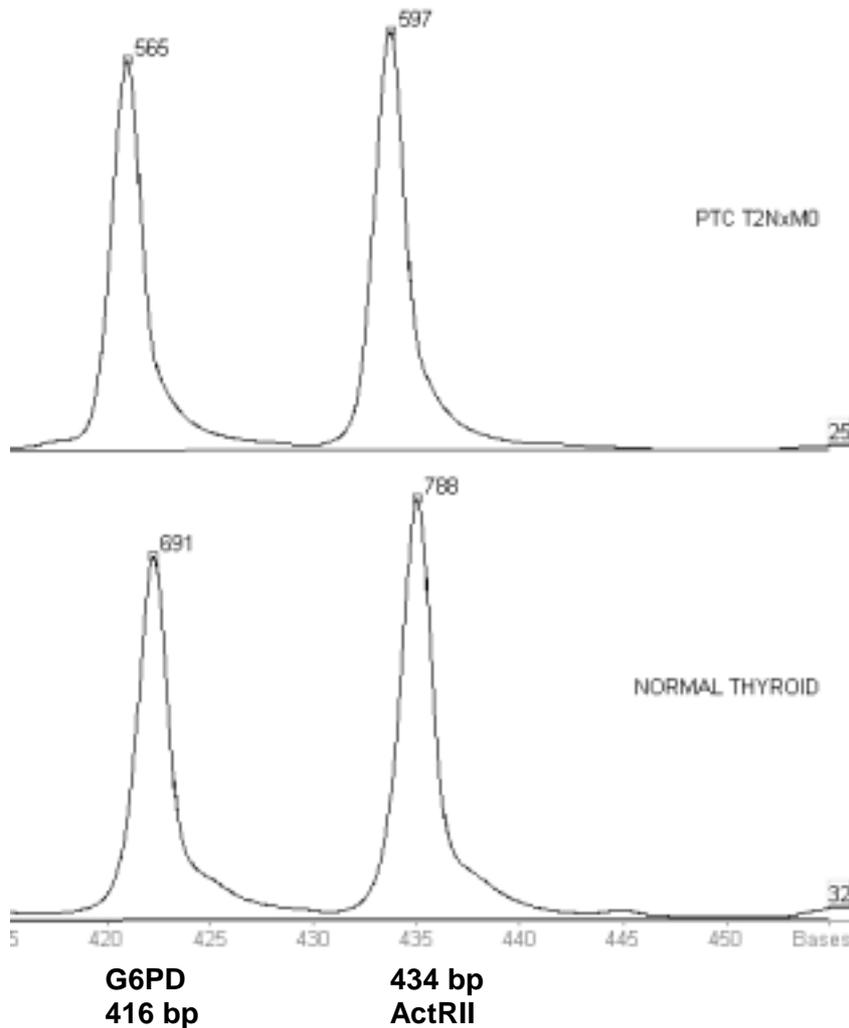


Legende zu Abb. 23:

Um die mRNA-Expression des Activin-Typ-Ib-Rezeptors ALK4-1 (530 bp) im Vergleich zu G6PD (460 bp) zu ermitteln, wurde eine semi-quantitative Duplex-PCR mit cybergreen-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Amplimere wurden auf einem laser-aktivierten Fluoreszenz-Sequenator (A.L.F.) aufgetrennt. Die Flächen unter den Kurven wurden berechnet. Von jeder Probe wurden unabhängige Triplikate analysiert.

Abbildung 24.

Kein Unterschied der mRNA-Expression des Activin-Typ-II-Rezeptor ActRII zwischen papillärem Schilddrüsen-Karzinom und Normalgewebe der Schilddrüse



Legende zu Abb. 24:

Um die mRNA-Expression des Activin-Typ-II-Rezeptors ActRII (434 bp) im Vergleich zu G6PD (416 bp) zu ermitteln, wurde eine semi-quantitative Duplex-PCR mit cybergreen-markierten Oligonukleotiden durchgeführt. Die Amplimere wurden auf einem laser-aktivierten Fluoreszenz-Sequenator (A.L.F.) aufgetrennt. Die Flächen unter den Kurven wurden berechnet. Von jeder Probe wurden unabhängige Triplikate analysiert.

4. Diskussion

4.1 Activin A beeinflusst das Proliferationsverhalten menschlicher Schilddrüsen-Zellen *in vitro*

Die Daten belegen, daß humanes rekombinantes Activin A im wesentlichen die Proliferation von humanen thyreoidalen Follikelepithel-Zellen *in vitro* hemmt (Tab. 1). Die Wirksamkeit des Wachstumsfaktors variiert zwischen verschiedenen Primärkulturen menschlicher Schilddrüsen erheblich. (Tab.11). Während in manchen Kulturen eine hochsignifikante Wachstumshemmung bis zu 40 % auftritt (Tab.16), reagieren andere Kulturen nicht mit einer Änderung des Proliferationsverhaltens. (Tab.17). Von 12 unterschiedlichen Primärkulturen aus Strumen und Rezidivstrumen waren 4 (33 %) refraktär gegenüber Activin (Tab.17). Eine solche Refraktärität gegen hemmende Wachstumsfaktoren wurde nicht nur in unserer Arbeitsgruppe, sondern auch in Versuchen an humanen primären Follikelepithelzellen der Schilddrüsen bei Experimenten mit TGF β -1 nachgewiesen (Asmis, Kaempf et al.,1996).

War ein Hemmeffekt von Activin A nachweisbar, so fand sich in den meisten Fällen eine Dosis-Wirkungs-Beziehung. Ein signifikanter Hemmeffekt war im Regelfall bei Activin-Konzentrationen von 2,5-10 ng/ml vorhanden (Tab.11). Tab. 12 zeigt den mit 20 % im Mittel nur mäßigen hemmenden Einfluß von Activin A auf drei Struma-Gewebe in Anwesenheit von nur 1 % fetalem Kälberserum. Unter diesen Versuchsbedingungen wiesen primäre Follikelepithelzellen der Schilddrüse nur eine geringe Spontanproliferation auf (Schulte, Antoch et al.,1996). Der wachstumshemmende Effekt von Activin A wurde deshalb unter diesen Bedingungen nicht sichtbar. Im Gegensatz dazu zeigen Follikelepithelzellen aus Rezidiv-Struma-Gewebe eine höhere Proliferationstendenz unter solchen serumarmen Bedingungen (Tab. 13) (Schulte, Antoch et al.,1996). Dementsprechend wies der empfindliche BrdU-ELISA eine hochsignifikante Wachstumshemmung von 20 % nach. Betrachtet man nur Primärkulturen aus Strumen, so findet sich in Anwesenheit von 5 % fetalem Kälberserum bei einem Drittel der Struma-Gewebe (33%) eine signifikante Hemmung des Zellwachstums bei hohen Activin A-Konzentrationen von 50 ng/ml (Tab. 11, Tab. 20). Bei Mittelwertbildung aus dem gesamten Kollektiv der Strumen ist dieser Effekt jedoch nicht mehr signifikant nachweisbar (Tab. 14). In drei von vier (75 %) Rezidiv-Strumen findet sich in Anwesenheit von 5 % fetalem Kälberserum eine signifikante Hemmung des Wachstums (Tab. 20). Diese Wirkung ist auch im Mittelwert des untersuchten Rezidiv-Strumen-Kollektivs bei 10 und 50 ng/ml nachweisbar (Tab. 15). In der Primärkultur von Follikelepithelzellen eines papillären Schilddrüsen-Karzinoms war kein wachstumshemmender Effekt von Activin nachzuweisen (Tab. 18).

Diese Daten fügen sich in die Reihe eingangs zitierter Beobachtungen, die Activin A eine Rolle für die negative Kontrolle des Zellwachstums zusprechen. Sie belegen, daß das Konzept des Wachstumshemmers Activin A auf die menschliche Schilddrüse ausgedehnt werden kann.

An zwei etablierten Zelllinien FTC133 und FTC238, die aus einem metastasierten follikulären Schilddrüsen-Karzinom gewonnen wurden, ließ sich kein Hemmeffekt bezüglich der Proliferation durch Activin A nachweisen (Tab. 19). Sowohl bei einer Mamma-Karzinom-Zelllinie (MCF7) als auch an einer Ovarial-Karzinom-Zelllinie (OVCAR) fand sich eine signifikante Proliferationshemmung unter 50 ng/ml Activin A in Anwesenheit von 5 % fetalem Kälberserum (Tab. 19). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß der Verlust der Activin-Inhibition eine Besonderheit des differenzierten Schilddrüsen-Karzinoms darstellen könnte, wobei verlässliche Schlüsse aus den vorliegenden Fallzahlen nicht gezogen werden können.

An jeder Kultur wurde die Hemmung des Zellwachstums mit zwei verschiedenen Methoden untersucht. Der BrdU-ELISA weist Änderungen der DNA-de-novo-Synthese durch Einbau des Basenalogons Bromodesoxyuridin nach. Die Effizienz dieser Methode zum quantitativen Studium der Zellteilungsaktivität ist in vitro und in vivo einschlägig belegt (Dolbeare und Selden,1994, Dolbeare,1995). MTT- und WST-1-Test erfassen Änderungen der Proliferationsaktivität indirekt; sie messen indirekt die Zellzahl durch Quantifikation mitochondrialer Redox-Prozesse (Carmichael, DeGraff et al.,1987, Carmichael, DeGraff et al.,1995). In den hier durchgeführten Experimenten lieferten BrdU-ELISA und WST-1-Test konkordante Ergebnisse. Neben der Sicherung der Ergebnisse durch Konzentrations-Wirkungs-Untersuchungen in jeder einzelnen Zellkultur und sechsfacher Reproduktion jedes Einzelwertes besteht hiermit eine Konsolidierung der Ergebnisse unter Verwendung einer auf anderem Prinzip basierenden Meßmethode.

Eine Zytotoxizität von Activin A auch in hoher Konzentration von 50 ng/ml konnte weder an einem papillären noch an einem follikulären Schilddrüsen-Karzinom nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis ist ein weiteres Element zur Sicherung der Hypothese, daß die unter Activin A beobachtete Senkung der Zellzahl mit einer Hemmung der Proliferation und nicht mit einem durch andere Mechanismen wie Apoptose erklärbaren Untergang von Zellen zu begründen ist (Tab. 22) (Nishihara, Okahashi et al.,1993, Wang, Tilly et al.,1996).

4.2 Die Wirkung von Inhibin A auf Follikelepithelzellen der menschlichen Schilddrüse

Inhibin A wies auf vier von acht (50 %) Primärkulturen von Strumen eine hoch signifikante ($p < 0.01$) oder höchst signifikante ($p < 0.001$) Wachstumssteigerung auf (Tab. 21). Diese Wirkung war nie zuvor auf Schilddrüsenzellen untersucht worden. Nur an einer von drei (33%) Rezidiv-Strumen war eine signifikante Proliferationssteigerung nachweisbar. Auch an der Primärkultur eines papillären Schilddrüsen-Karzinoms führte Inhibin A zu einer signifikanten Wachstumssteigerung. (Abb. 3, Tab. 18). Auch wenn kein Normalgewebe untersucht werden konnte, belegen diese Ergebnisse doch, daß Inhibin A durchgängig eine stimulierende und keine inhibierende Wirkung auf menschliche Schilddrüsen-Zellen hat, und daß der bis heute nicht identifizierte Inhibin-Rezeptor zur Regelausstattung zumindest der pathologisch veränderten Schilddrüsenzelle gehört. Diese Beobachtung fügt sich in eine Reihe von Ergebnissen, die bisher an verschiedenen menschlichen und tierischen Epithelzell-Systemen gemacht worden waren (Spencer, Rabinovici et al., 1992, Moore, Krummen et al., 1994).

Auch in der Schilddrüse liegt somit der an anderen Geweben nachgewiesene Antagonismus von Activin A und Inhibin A vor (Xu, McKeenan et al., 1995). Während Activin A die Proliferation hemmt, führt Inhibin A zu einer Steigerung derselben. Die Bedeutung dieser Beobachtung besteht zunächst in der Feststellung, daß die isolierte Follikelepithelzelle der Schilddrüse über ein funktionierendes Rezeptor- und Signaltransduktionssystem für die beiden Substanzen verfügt. Die jüngst an Primärkulturen von Schweine-Follikelepithelzellen der Schilddrüse publizierte Beobachtung, daß Activin A ein Hemmer des Wachstums der Schilddrüse ist, wird somit auf das menschliche Schilddrüsengewebe ausgedehnt. Zusammen mit der Beobachtung, daß nicht nur beim Schwein (Franzen, Piek et al., 1999), sondern auch beim Menschen (La Rosa, Uccella et al., 1999) immunhistochemisch ein Vorkommen beider Proteinmediatoren im Follikelepithel-Verband vorhanden ist, ergeben sich hier hinreichende Argumente für die Stützung der Hypothese, daß Activin A und Inhibin A auch bei der Wachstumsregulation der Schilddrüse in vivo eine Rolle spielen. Während der Effekt von Inhibin dem anderer proliferationsfördernder Wachstumsfaktoren wie EGF oder IGF deutlich unterlegen ist, darf das Activin A in seiner Bedeutung dem TGF β -1 zur Seite gestellt werden (Abb. 4). Die hier vorgestellten Experimente belegen somit zum ersten Mal die Existenz eines zweiten, TGF β -1-unabhängigen, parakrinen, hemmenden Wachstums-Kontrollmechanismus in der menschlichen Schilddrüse (Schulte, Jonas et al., 2001).

4.3 Die Wirkung von TGF β -1 auf Follikelepithelzellen der menschlichen Schilddrüse

TGF β -1 ist der stärkste bekannte Hemmer des Wachstums follikulärer Schilddrüsen-Karzinom-Zellen in vitro (Grubeck-Loebenstein, Buchan et al.,1989, Taton, Lamy et al.,1993). Es ist bekannt, daß der TGF β -Effekt in etwa 50 % der Primärkulturen von Patienten mit erhöhter Schilddrüsenwachstumsneigung wie Strumen und Rezidivstrumen fehlt (Asmis, Kaempff et al.,1996). Wir führten daher einen Vergleich der Wirksamkeit von Activin A in einer Konzentration von 50 ng/ml und TGF β -1 in einer Konzentration von 10 ng/ml durch (Abb. 4). Weder der Anteil gehemmter Kulturen noch das Ausmaß der Hemmung unterschieden sich bei Activin A und TGF β -1. Diese Beobachtung weist Activin A den Rang eines starken Proliferationshemmers der Follikelepithel-Zellen der menschlichen Schilddrüse zu. Hinweise für eine Wirksamkeit von Activin und Inhibin als parakrine Wachstumsfaktoren der Schilddrüse liegen bis heute nur am Modell der Primärkultur des Schweine-Thyreozyten vor, wo eine Wachstumshemmung der Schweine-Follikelepithel-Zellen durch Activin A nachwies (Franzen, Piek et al.,1999) wurde. Insgesamt fügen sich diese Ergebnisse in Beobachtungen an zahlreichen etablierten Zelllinien und wenigen Primärkultur-Modellen beim Tier an anderen Organen als der Schilddrüse ein.

4.4 Qualitative und quantitative RT-PCR-Analysen zur Ausstattung der menschlichen Schilddrüse mit Rezeptoren für Activin

Über die Ausstattung der menschlichen Schilddrüse mit Rezeptoren für Activin fehlen Daten bislang völlig. Wir haben in Erfahrung zu bringen versucht, ob und in welchen Mengen beide Typen des Activin-Rezeptor-Systems vorhanden sind. Mit Hilfe einer qualitativen RT-PCR-Methode wurde der Nachweis geführt, daß beide Typ-I-Activin-Rezeptoren, ALK2 und ALK4, und beide Typ-II-Rezeptor-Typen, ActRII und ActRIIB, in menschlichem Schilddrüsengewebe vorhanden sind. Der Typ-I-Rezeptor ALK4-1 war durch RT-PCR in 12/12 (100 %) der Normalgewebe nachweisbar (Tab. 25). Die Identität des erhaltenen Amplimers mit der publizierten humanen cDNA-Sequenz wurde durch Sequenzierung bewiesen. Darüber hinaus wiesen auch Morbus Basedow, Struma, follikuläres und mit Ausnahme eines einzigen Patienten auch papilläre Schilddrüsen-Karzinome den ALK4-1-Rezeptor auf (Tab.25, Abb.7). Vom Activin-Typ-I-Rezeptor ALK4 sind verschiedene Splice-Varianten bekannt, die aus einer gemeinsamen Vorläufer-mRNA herausgeschnitten werden (Xu, Matsuzaki et al.,1994). Diese

Splice-Varianten haben somit möglicherweise funktionelle Auswirkungen. Die Tabelle 25 zeigt die qualitativen RT-PCR-Analysen dieser Splice-Varianten an einer großen Gruppe von Patienten mit benignen und malignen Schilddrüsen-Erkrankungen. Das Vorkommen jeder Splice-Variante konnte bei jeder Erkrankung regelhaft nachgewiesen werden.

Da eine systematische Untersuchung der Activin-Typ-Ib-Rezeptor-Splice-Variante sowohl bei menschlichen Geweben als auch im Tiermodell fehlt, sind Schlüsse über die hier gemachten Beobachtungen nicht mit Sicherheit möglich. Die von Xu und Mitarbeitern (Xu, Matsuzaki et al., 1994) aus der genomischen Sequenz vorhergesagten Splicevarianten ALK4-1 bis 4-4 sind aber angesichts unserer Ergebnisse nicht per se als erkrankungsassoziiert zu betrachten. Diese Feststellung steht im Gegensatz zu einer Hypothese der Arbeitsgruppe von Klibanski, die die ALK4-Splice-Variante als Neoplasie-typisch bei bestimmten Hypophysen-Tumoren charakterisierte (Alexander, Bikkal et al., 1996). Untersuchungen am Activin-Rezeptorsystem der Schweine-Schilddrüse wiesen nach, daß von beiden bekannten Activin-Typ-I-Rezeptoren ALK2 und ALK4 Activin A bevorzugt an den ALK4-Rezeptor bindet. Die von uns nachgewiesene Redundanz der ALK4-Splice-Variante dürfte daher mit hoher Wahrscheinlichkeit funktionelle Konsequenzen haben. Die durch den Splicevorgang bedingten Veränderungen der Protein-Kinase-Domäne im zytoplasmatischen Rezeptoranteil sind aufgrund der vorliegenden Erkenntnisse zu den Funktionsdomänen dieses Rezeptors gleichzeitig mit Veränderungen der Phosphorylierungsstellen assoziiert.

Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsprozesse aber sind für die Signaltransduktionsaktivität insbesondere im Zusammenhang mit Heterodimerisierungsvorgängen von Bedeutung. Auch die Activin-Typ-II-Rezeptoren ActRII und ActRIIB finden sich sowohl in normalen als auch in pathologisch veränderten Nativpräparaten der Schilddrüse (Tab. 25).

Zusammenfassend belegen die hier vorgestellten Daten das Vorkommen aller konstitutiven Komponenten des Activin-Rezeptor-Systems in der menschlichen Schilddrüse. Untersuchungen zu dieser Fragestellung liegen bis heute nur an wenigen anderen menschlichen Geweben vor. Unsere Untersuchungen sichern die Existenz eines kompletten Activin-Signaltransduktionsweges in der normalen und in der pathologisch veränderten Schilddrüse.

Vor dem Hintergrund der Tatsache, daß ein funktionelles wachstumshemmendes Activin-Rezeptor-System in der normalen und in der pathologisch veränderten Schilddrüse von Bedeutung ist, haben wir im folgenden die Frage bearbeitet, ob Veränderungen dieses Systems bei eben den Erkrankungen vorliegen, die mit pathologisch erhöhtem Wachstum einhergehen. Diese Frage stellt sich insbesondere angesichts der Tatsache, daß das andere bekannte potente wachstumshemmende System, nämlich der TGF β -1-Signalweg, eben solche Veränderungen aufweist. Bei Schilddrüsen-Malignomen vom papillären und

follikulären Typus findet sich eine herabgesetzte Expression des TGF β -Typ-II- Rezeptors (Lazzereschi, Ranieri et al.,1997, Matoba, Sugano et al.,1998). Diese führt zu einer funktionellen TGF β -Refraktärität, die über den Ausfall der Wachstumshemmung für Genese und Fortschreiten dieser Karzinome verantwortlich gemacht wird. In-vitro-Experimente an transformierten Ratten-Zelllinien mit Verlust des TGF β -Typ-II-Rezeptors belegen, daß durch Rekonstitution dieses Rezeptor-Typus eine phänotypische Reversion des malignen Zustandes solcher Zellen möglich ist (Coppa, Mincione et al.,1997).

Zum semi-quantitativen Nachweis der Boten-RNA-Expression des Activin-Typ-Ib- und TypII-Rezeptors verwendeten wir eine hochsensitive RT-PCR-Methode. Die niedrige Kopienzahl der Activin-Rezeptor-RNAs und direkte Quantifizierbarkeit bei gleichzeitig eingeschränkter Verfügbarkeit des benötigten Tumormaterials machten eine solche Optimierung erforderlich. Für jedes verwendete Primerpaar wurde vor Verwendung im semi-quantitativen Ansatz die Methode unter mehreren Aspekten optimiert. Bei der Polymerasekettenreaktion verläuft die Produktbildung prinzipiell hyperbolisch. Führt man wie hier eine Duplex-PCR durch Zusatz der Oligonukleotid-Primer in einem Ansatz durch, so erreichen die Hyperbeln aufgrund der unterschiedlichen Matrizenkonzentrationen nach unterschiedlichen Zykluszahlen den Übergang in die Plateauphase. Zur Messung der Produktmengen verwendbar war der Zyklusbereich der Amplifikation, in dem die Zunahme beider Amplimere linear verläuft. In einem ersten Schritt wurde diese Zykluszahl für jedes Primerpaar unter Verwendung verschieden konzentrierter Matrizen definiert (Abb.5) Sodann wurde im Verdünnungsexperiment belegt, daß die eingesetzte cDNA-Konzentration keinen Einfluß auf das Verhältnis der gebildeten Amplifikate unter diesen Zyklusbedingungen hat (Abb.6) Dieser Nachweis ist insbesondere deshalb von Bedeutung , da bei der hier verwendeten spektrophotometrischen RNA- und DNA-Quantifikation im niedrigen Konzentrationsbereich erhebliche Ungenauigkeiten auftreten. Um den Einfluß von Meßschwankungen zu vermindern, wurde jede Probe an drei verschiedenen Tagen durch eine unabhängige PCR untersucht.

GAPDH ist ein im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiertes Gen, dessen Produkt eine zentrale Rolle im Glukose-Metabolismus einnimmt. Zustände veränderter quantitativer Genexpression von GAPDH sind in der Schilddrüse nicht bekannt, so daß zur Quantifikation der Activin-Rezeptor-Expression die in vielen humanen Modellen verwendete Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zur Anwendung kam. Um etwaige dennoch auftretende Verfälschungen der Meßwerte durch Regulationsphänomene des Referenz-Gens auszuschließen, wurden die mit GAPDH erhaltenen Ergebnisse mit einem zweiten unabhängigen PCR-System validiert. Hierbei kam Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), ein anderes ubiquitär exprimiertes konstitutives Gen, als Referenz-Gen zur Verwendung. Nicht nur für die einzelnen Proben sondern auch für die untersuchten

Gruppen konnten die mit GAPDH erhaltenen Ergebnisse bei Verwendung von G6PD bestätigt werden.

Bisher durchgeführte Untersuchungen zur mutationellen Aktivierung von Onkogenen und Tumor-Supressor-Genen in der Schilddrüse lieferten keine direkt für die Klinik relevanten Ergebnisse (Goretzki, Schulte et al.,1998, Schulte, Antoch et al.,1998). Weitreichende Kenntnisse über molekulargenetische und zytogenetische Aspekte sowohl benigner als auch maligner Neoplasien der Schilddrüse öffnen jedoch den Weg hin zu einer hoch-sensitiven und spezifischen präoperativen Diagnostik von Schilddrüsentumoren (Schulte, Röher,2000). Beispielsweise konnte gezeigt werden, daß Lysophosphatid-Säure (LPA) ein mit Thyreotropin in seiner Potenz vergleichbarer Wachstumsfaktor für die menschliche Schilddrüse ist und daß die Expression der mRNA für den LPA-Rezeptor EDG4 in papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinomen erhöht ist (Schulte, Beyer et al.,2001).

Unsere Untersuchungen der Expression des Activin-Typ-II-Rezeptors zeigten keine quantitativen Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Geweben (Tab. 27). Untersuchungen der für die Signaltransduktion der Schilddrüse hauptverantwortlichen Activin-Typ-Ib-Rezeptoren hingegen wiesen eine hochsignifikante Abnahme der relativen Kopienzahl der normalen Messenger-RNA-Splice-Variante ALK4-1 (Tab. 26, Tab. 28) beim differenzierten Schilddrüsen-Karzinom auf. Sowohl für das papilläre als auch für das follikuläre Schilddrüsen-Karzinom war die Minderung der Expression gegenüber Normalgewebe höchst signifikant (Schulte, Jonas et al.,2001). Auch bei Struma-Gewebe fand sich eine signifikante Senkung der Expression (Tab. 27). Im Hinblick auf die bei Frauen in der Menopause erniedrigten Activin A-Spiegel im Serum kann dies ein Hinweis auf die Beeinflussung der Strumaentstehung durch das sexuell dimorphe Hormon Activin A sein (Schulte, Jonas et al.,2000). Im Zusammenhang mit der von Knudson 1972 begründeten und seither an vielen Modellen belegten Tumor-Supressor-Gen-Theorie interpretieren wir die hier gemachten Beobachtungen als Inaktivierung eines wachstumshemmenden Signaltransduktionsweges. Die Tatsachen, daß Activin das Wachstum der menschlichen Schilddrüsenfollikel epithelzelle in vitro höchst signifikant hemmt und daß in Schilddrüsen-Karzinomen eine höchst signifikante Senkung der Expression des führenden Activin-Rezeptors auftritt, liefern mithin die notwendigen Argumente, um den Activin-Typ-I-Rezeptor ALK4 als potentiell Tumor-Supressor-Gen anzusprechen. Eine solche Rolle ist diesem Rezeptor weder bei der menschlichen Karzinogenese noch im Tiermodell zugewiesen worden. Hierzu fehlen Daten völlig und müssen Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

5. Zusammenfassung

Activin A und Inhibin A sind Protein-Wachstumsfaktoren mit phylogenetisch konservierter Bedeutung für die Bildung von Organstrukturen und die Kontrolle der Gewebeproliferation. Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, welche Rolle Activin A und Inhibin A sowie ihre Rezeptoren in der menschlichen Schilddrüse spielen. Die Untersuchungen zur in-vitro-Regulation des Wachstums durch Activin A in Konzentrationen von 10 und 50 ng/ml wiesen einen höchst signifikanten Hemmeffekt bei Strumen und Rezidiv-Strumen nach. Inhibin A führt bei der Hälfte der untersuchten benignen Schilddrüsengewebe und auch in der Primärkultur eines papillären Schilddrüsen-Karzinoms zu einer höchst signifikanten Wachstumssteigerung bei Konzentrationen von 10 bis 50 ng/ml.

Qualitative RT-PCR wies das Vorkommen der beiden Typ-I-Activin-Rezeptoren ALK2 und ALK4 sowie beider Typ-II-Rezeptoren ActRII und ActRIIB nicht nur in Normalgewebe, sondern auch in Strumen, Rezidivstrumen und differenzierten Schilddrüsen-Karzinomen nach. Die qualitative Analyse der Splice-Varianten des Typ-Ib-Activin-Rezeptors wies regelhaft das Vorkommen von vier Isoformen mit veränderter Protein-Kinase-Domäne nach. Expressionsstudien durch semi-quantitative RT-PCR unter Verwendung zweier unterschiedlicher Referenz-Gen-Primer wiesen eine höchst signifikante Reduktion des für die Activin-Wirkung zentralen Typ-I-Rezeptors ALK4 in differenzierten Schilddrüsen-Karzinomen nach. Für den Activin-Typ-II-Rezeptor ActRII fanden sich keine Unterschiede.

In Summa: Activin A ist ein Hemmer und Inhibin A ein Stimulator des Wachstums der Follikelepithelzelle der Schilddrüse in vitro. Die Schilddrüse verfügt über einen differenzierten Satz von von Activin-Rezeptoren. Die höchst signifikante Minderung der ALK4-Expression in Schilddrüsen-Karzinomen identifiziert ein neues potentiell Tumor-Supressor-Gen mit möglicherweise universeller Bedeutung.

6. Literatur

1. Ying SY. Inhibins and activins: chemical properties and biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 1987; 186: 253-64
2. Yingling J, Wang X, Bassing C. Signaling by the transforming growth factor- β receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1242: 115-136
3. Hubner G, Alzheimer C, Werner S. Activin: a novel player in tissue repair processes. *Histol Histopathol* 1999; 14: 295-304
4. Massague J. TGF β signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell* 1996; 85: 947-50
5. Takumi T, Moustakas A, Lin HY, Lodish HF. Molecular characterization of a type I serine-threonine kinase receptor for TGF- β and activin in the rat pituitary tumor cell line GH3. *Exp Cell Res* 1995; 216: 208-14
6. ten Dijke P, Yamashita H, Ichijo H, Franzen P, Laiho M, Miyazono K, Heldin CH. Characterization of type I receptors for transforming growth factor- β and activin. *Science* 1994; 264: 101-4
7. Attisano L, Cárcamo J, Ventura F, Weis F, Massague J, Wrana J. Identification of human activin and TGF β type I receptors that form heteromeric kinase complexes with type II receptors. *Cell* 1993; 75: 671-680
8. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by members of the transforming growth factor- β superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7: 327-39
9. Carcamo J, Weis FM, Ventura F, Wieser R, Wrana JL, Attisano L, Massague J. Type I receptors specify growth-inhibitory and transcriptional responses to transforming growth factor β and activin. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 3810-21
10. Willis SA, Zimmerman CM, Li LI, Mathews LS. Formation and activation by phosphorylation of activin receptor complexes. *Mol Endocrinol* 1996; 10: 367-79
11. Attisano L, Wrana JL, Cheifetz S, Massague J. Novel activin receptors: distinct genes and alternative mRNA splicing generate a repertoire of serine/threonine kinase receptors. *Cell* 1992; 68: 97-108
12. Matsuzaki K, Xu J, Wang F, McKeehan WL, Krummen L, Kan M. A widely expressed transmembrane serine/threonine kinase that does not bind activin, inhibin, transforming growth factor β , or bone morphogenic factor. *J Biol Chem* 1993; 268: 12719-23
13. Ying SY, Zhang Z, Furst B, Batres Y, Huang G, Li G. Activins and activin receptors in cell growth. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 114-22
14. Halvorson LM, DeCherney AH. Inhibin, activin, and follistatin in reproductive medicine. *Fertil Steril* 1996; 65: 459-69

15. Ling N, Ying SY, Ueno N, Shimasaki S, Esch F, Hotta M, Guillemin R. A homodimer of the beta-subunits of inhibin A stimulates the secretion of pituitary follicle stimulating hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 138: 1129-37
16. Yamaoka T, Idehara C, Yano M, Matsushita T, Yamada T, Li S, Moritani M, Hata J, Sugino H, Noji S, Itakura M. Hypoplasia of pancreatic islets in transgenic mice expressing activin receptor mutants. *J Clin Invest* 1998; 102: 294-301
17. Yu J, Shao LE, Lemas V, Yu AL, Vaughan J, Rivier J, Vale W. Importance of FSH-releasing protein and inhibin in erythrodifferentiation. *Nature* 1987; 330: 765-7
18. Wang QF, Tilly KI, Tilly JL, Preffer F, Schneyer AL, Crowley WF, Jr., Sluss PM. Activin inhibits basal and androgen-stimulated proliferation and induces apoptosis in the human prostatic cancer cell line, LNCaP. *Endocrinol.* 1996; 137: 5476-83
19. Zauberman A, Oren M, Zipori D. Involvement of p21(WAF1/Cip1), CDK4 and Rb in activin A mediated signaling leading to hepatoma cell growth inhibition. *Oncogene* 1997; 15: 1705-11
20. Spencer SJ, Rabinovici J, Jaffe RB. Human recombinant activin-A inhibits proliferation of human fetal adrenal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 1678-80
21. Spencer SJ, Rabinovici J, Mesiano S, Goldsmith PC, Jaffe RB. Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells. *J Clin Invest* 1992; 90: 142-9
22. Liu QY, Niranjan B, Gomes P, Gomm JJ, Davies D, Coombes RC, Buluwela L. Inhibitory effects of activin on the growth and morphogenesis of primary and transformed mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1996; 56: 1155-63
23. Ohga E, Matsuse T, Teramoto S, Katayama H, Nagase T, Fukuchi Y, Ouchi Y. Effects of activin A on proliferation and differentiation of human lung fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 228: 391-6
24. Di Simone N, Hall HA, Welt C, Schneyer AL. Activin regulates betaA-subunit and activin receptor messenger ribonucleic acid and cellular proliferation in activin-responsive testicular tumor cells. *Endocrinol.* 1998; 139: 1147-55
25. Lin CR, Kiousi C, O'Connell S, Briata P, Szeto D, Liu F, Izpisua-Belmonte JC, Rosenfeld MG. Pitx2 regulates lung asymmetry, cardiac positioning and pituitary and tooth morphogenesis. *Nature* 1999; 401: 279-82
26. Kosaki R, Gebbia M, Kosaki K, Lewin M, Bowers P, Towbin JA, Casey B. Left-right axis malformations associated with mutations in ACVR2B, the gene for human activin receptor type IIB. *Am J Med Genet* 1999; 82: 70-6

27. Hayes FJ, Hall JE, Boepple PA, Crowley WF, Jr. Clinical review 96: Differential control of gonadotropin secretion in the human: endocrine role of inhibin. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 1835-41
28. Gonzalez-Manchon C, Vale W. Activin-A, inhibin and transforming growth factor-beta modulate growth of two gonadal cell lines. *Endocrinol.* 1989; 125: 1666-72
29. Xu J, Matsuzaki K, McKeegan K, Wang F, Kan M, McKeegan WL. Genomic structure and cloned cDNAs predict that four variants in the kinase domain of serine/threonine kinase receptors arise by alternative splicing and poly(A) addition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 7957-61
30. Alexander JM, Bikkal HA, Zervas NT, Laws ER, Klibanski A. Tumor-specific expression and alternate splicing of messenger ribonucleic acid encoding activin/transforming growth factor- β receptors in human pituitary adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 81: 783-790
31. Chang J, Park K, Bang YJ, Kim WS, Kim D, Kim SJ. Expression of transforming growth factor beta type II receptor reduces tumorigenicity in human gastric cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2856-9
32. Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J, Markowitz S. Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 3101-4
33. Iacopetta BJ, Welch J, Soong R, House AK, Zhou XP, Hamelin R. Mutation of the transforming growth factor-beta type II receptor gene in right-sided colorectal cancer: relationship to clinicopathological features and genetic alterations. *J Pathol* 1998; 184: 390-5
34. MacKay SL, Auffenberg T, Tannahill CL, Ksontini R, Josephs MD, Nowak M, Moldawer LL, Copeland EM, 3rd. Transfection of the type II TGF-beta receptor into colon cancer cells increases receptor expression, inhibits cell growth, and reduces the malignant phenotype. *Ann Surg* 1998; 227: 781-9
35. Wagner M, Kleeff J, Lopez ME, Bockman I, Massaquoi J, Korc M. Transfection of the type I TGF-beta receptor restores TGF-beta responsiveness in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1998; 78: 255-60
36. Goggins M, Shekher M, Turnacioglu K, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998; 58: 5329-32
37. Kalkhoven E, Roelen BA, de Winter JP, Mummery CL, van den Eijnden-van Raaij AJ, van der Saag PT, van der Burg B. Resistance to transforming growth factor beta and

- activin due to reduced receptor expression in human breast tumor cell lines. *Cell Growth Differ* 1995; 6: 1151-61
38. Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91: 179-84
 39. Grubeck-Loebenstien B, Buchan G, Sadeghi R, Kissonerghis M, Londei M, Turner M, Pirich K, Roka R, Niederle B, Kassal H, et al. Transforming growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter. *J Clin Invest* 1989; 83: 764-70
 40. Taton M, Lamy F, Roger PP, Dumont JE. General inhibition by transforming growth factor beta 1 of thyrotropin and cAMP responses in human thyroid cells in primary culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1993; 95: 13-21
 41. Lazzereschi D, Ranieri A, Mincione G, Taccogna S, Nardi F, Colletta G. Human malignant thyroid tumors displayed reduced levels of transforming growth factor beta receptor type II messenger RNA and protein. *Cancer Res* 1997; 57: 2071-6
 42. Matoba H, Sugano S, Yamaguchi N, Miyachi Y. Expression of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta Type-II receptor mRNA in papillary thyroid carcinoma [In Process Citation]. *Horm Metab Res* 1998; 30: 624-8
 43. Coppa A, Mincione G, Lazzereschi D, Ranieri A, Turco A, Lucignano B, Scarpa S, Ragano-Caracciolo M, Colletta G. Restored expression of transforming growth factor beta type II receptor in k-ras-transformed thyroid cells, TGF beta-resistant, reverts their malignant phenotype. *J Cell Physiol* 1997; 172: 200-8
 44. La Rosa S, Uccella S, Billo P, Facco C, Sessa F, Capella C. Immunohistochemical localization of alpha- and betaA-subunits of inhibin/activin in human normal endocrine cells and related tumors of the digestive system. *Virchows Arch* 1999; 434: 29-36
 45. Kotajima A, Miyamoto Y, Tsuruo M, Kosaka M, Saito S. Effects of activin A on deoxyribonucleic acid synthesis, iodine metabolism, and cyclic adenosine monophosphate accumulation in porcine thyroid cells. *Endocrinol.* 1995; 136: 1214-8
 46. Franzen A, Piek E, Westermark B, ten Dijke P, Heldin NE. Expression of transforming growth factor-beta1, activin A, and their receptors in thyroid follicle cells: negative regulation of thyrocyte growth and function. *Endocrinol.* 1999; 140: 4300-10
 47. Asmis LM, Kaempfer J, Von Gruenigen C, Kimura ET, Wagner HE, Studer H. Acquired and naturally occurring resistance of thyroid follicular cells to the growth inhibitory action of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1). *J Endocrinol* 1996; 149: 485-96
 48. Schulte K, Antoch G, Ellrichmann M, Goretzki P, Röher H. Increased cell proliferation - an in vitro feature of thyroid carcinoma? *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.* 1996; 104: A8

49. Dolbeare F, Selden JR. Immunochemical quantitation of bromodeoxyuridine: application to cell- cycle kinetics. *Methods Cell Biol* 1994; 41: 297-316
50. Dolbeare F. Bromodeoxyuridine: a diagnostic tool in biology and medicine, Part I: Historical perspectives, histochemical methods and cell kinetics. *Histochem J* 1995; 27: 339-69
51. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 1987; 47: 936-942
52. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of radiosensitivity. *Cancer Res.* 1995; 47: 943-946
53. Nishihara T, Okahashi N, Ueda N. Activin A induces apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 197: 985-91
54. Wang Q, Tilly K, Tilly L, Preffer F, Schneyer A, Crowley W, Sluss P. Activin inhibits basal and androgen-stimulated proliferation and induces apoptosis in the human prostatic cancer cell line, LNCaP. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1996; 137: 5476-5483
55. Moore A, Krummen LA, Mather JP. Inhibins, activins, their binding proteins and receptors: interactions underlying paracrine activity in the testis. *Mol Cell Endocrinol* 1994; 100: 81-6
56. Xu J, McKeehan K, Matsuzaki K, McKeehan WL. Inhibin antagonizes inhibition of liver cell growth by activin by a dominant-negative mechanism. *J Biol Chem* 1995; 270: 6308-13
57. Goretzki P, Schulte KM. Bedeutung von Onkogenen in Entstehung und Prognose von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen. *Internist* 1998; 39: 584-587
58. Schulte KM, Antoch G, Ellrichmann M, Finken-Eigen M, Kohrer K, Simon D, Goretzki P, Röher HD. Regulation of the HGF-receptor c-met in the thyroid gland. *Exp Clin Endokrinol Diabetes* 1998; 106(4):310-8.
59. Schulte KM, Röher HD. The thyroid nodule - molecular, genetic and cytogenetic aspects. *Viszeralchirurgie* 2000; 35: 95-101.
60. Schulte KM, Beyer A, Köhrer K, Oberhäuser S, Röher HD. Lysophosphatidic acid: a novel lipid growth factor for human thyroid cells. Overexpression of the high-affinity receptor EDG4 in differential thyroid cancer. *Int J Cancer* 2001; 92: 249-256.
61. Schulte KM, Jonas C, Krebs R, Röher HD. Activin A and Activin receptors in thyroid cancer. *Thyroid* 2001; 11:3-14.
62. Schulte KM, Jonas C, Krebs R, Röher HD. Activin A and Activin receptors in the human thyroid: a link to the female predominance of goiter ? *Horm Metabol Res* 2000; 32: 1-11.

7. Lebenslauf

Name, Vorname	Jonas, Claudia
Geboren	05.02.1974 in Düsseldorf/Kaiserswerth
Schulische Ausbildung	Grundschulbesuch in Rheine bei Münster, 1980-1982 Grundschulbesuch in Kippenheim (Schwarzwald), 1982-1984 Besuch des Städt. Gymnasiums in Ettenheim, 1984-1993
Studium	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von April 1994 bis April 2001 Ärztliche Vorprüfung: April 1996 Erstes Staatsexamen: April 1997 Zweites Staatsexamen: September 1999 Drittes Staatsexamen: April 2001
Famulaturen	Famulatur in einer orthopädischen Praxis in Duisburg, August 1996 Famulatur in der Allgemein- und Unfallchirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses, Ettenheim, September 1996 Famulatur in der Medizinischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses Düsseldorf, September 1997 Famulatur in der Clinica del Campo in San Cristobal de las Casas (Chiapas, Mexiko), September 1998 Famulatur in einer Allgemeinärztlichen Praxis in Neuss, März 1999
Praktisches Jahr	1.Tertial: Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie, Westdeutsche Kieferklinik, HHU Düsseldorf 2.Tertial: Viszeralchirurgie, Inselspital, Universität Bern/CH 3.Tertial: Innere Medizin, Klinik für Hämatologie und Onkologie, HHU Düsseldorf

Claudia Jonas:

Die Ausstattung der menschlichen Schilddrüse mit Activin-Rezeptoren und die Activin A-vermittelte Hemmung des Wachstums humaner Follikelepithelzellen der Schilddrüse *in vitro*

Abstract:

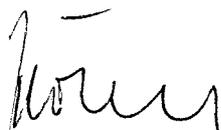
Activin A und Inhibin A sind Protein-Wachstumsfaktoren mit phylogenetisch konservierter Bedeutung für die Bildung von Organstrukturen und die Kontrolle der Gewebeproliferation. Die vorliegende Arbeit untersucht die Frage, welche Rolle Activin A und Inhibin A sowie ihre Rezeptoren in der menschlichen Schilddrüse spielen. Die Untersuchungen zur in-vitro-Regulation des Wachstums durch Activin A in Konzentrationen von 10 und 50 ng/ml wiesen einen höchst signifikanten Hemmeffekt bei Strumen und Rezidiv-Strumen nach. Inhibin A führt bei der Hälfte der untersuchten benignen Schilddrüsengewebe und auch in der Primärkultur eines papillären Schilddrüsen-Karzinoms zu einer höchst signifikanten Wachstumssteigerung bei Konzentrationen von 10 bis 50 ng/ml.

Qualitative RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaktion) wies das Vorkommen der beiden Typ-I-Activin-Rezeptoren ALK2 (Activin-like kinase) und ALK4 sowie beider Typ-II-Rezeptoren ActRII (Activin-Rezeptor II) und ActRIIB (Activin-Rezeptor IIB) nicht nur in Normalgewebe, sondern auch in Strumen, Rezidivstrumen und differenzierten Schilddrüsen-Karzinomen nach. Die qualitative Analyse der Splice-Varianten des Typ-Ib-Activin-Rezeptors wies regelhaft das Vorkommen von vier Isoformen mit veränderter Protein-Kinase-Domäne nach.

Expressionsstudien durch semi-quantitative RT-PCR unter Verwendung zweier unterschiedlicher Referenz-Gen-Primer wiesen eine höchst signifikante Reduktion des für die Activin-Wirkung zentralen Typ-I-Rezeptors ALK4 in differenzierten Schilddrüsen-Karzinomen nach. Für den Activin-Typ-II-Rezeptor ActRII fanden sich keine Unterschiede.

In Summa: Activin A ist ein Hemmer und Inhibin A ein Stimulator des Wachstums der Follikelepithelzelle der Schilddrüse *in vitro*. Die Schilddrüse verfügt über einen differenzierten Satz von von Activin-Rezeptoren. Die höchst signifikante Minderung der ALK4-Expression in Schilddrüsen-Karzinomen identifiziert ein neues potentiell Tumor-Suppressor-Gen mit möglicherweise universeller Bedeutung.

Referent:



Univ.-Prof. Dr. med. H.-D. Röher