

**Aus dem Zentrum für operative Medizin
Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. D. K. Bartsch**

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



**Evaluation antitumoraler Therapieoptionen beim
Schilddrüsenkarzinom durch Einsatz von
Tyrosinkinaseinhibitoren in vitro**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Humanmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von:

Sebastian Gläser aus Bergisch Gladbach
Marburg, 2011

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 18.08.2011

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: PD Dr. S. Hoffmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Steinmetz

Meinen Eltern

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Schilddrüsenkarzinom	2
1.1.1.	Epidemiologie.....	2
1.1.2.	Histologische Einteilung, Ätiologie und Prognose	2
1.1.2.1.	Differenzierte Schilddrüsenkarzinome.....	2
1.1.2.2.	Medulläres Schilddrüsenkarzinom (C-Zell-Karzinom)	3
1.1.2.3.	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom.....	4
1.1.3.	Diagnostik.....	4
1.1.4.	Therapie	5
1.1.4.1.	Differenzierte Schilddrüsenkarzinome.....	5
1.1.4.2.	Medulläres Schilddrüsenkarzinom.....	6
1.1.4.3.	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom.....	6
1.2.	Molekularbiologische Aspekte	7
1.2.1.	Rezeptortyrosinkinasen	7
1.2.1.1.	Der EGF-Rezeptor.....	9
1.2.1.2.	Signalisierung an intrazelluläre Effektorproteine	10
1.2.1.2.1.	Ras und die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK).....	10
1.2.1.2.2.	Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase-B (Akt)	11
1.2.1.3.	Der VEGF-Rezeptor und Neoangiogenese	12
1.3.	Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen als antitumorales Prinzip.....	14
1.3.1.	Gefitinib-ZD1839 (Iressa [®])	15
1.3.2.	Vandetanib-ZD6474 (Zactima [®])	16
1.4.	Fragestellung	17
2.	Material und Methoden	19
2.1.	Material.....	19
2.1.1.	Verwendete Zellen.....	19
2.1.2.	Zellkultur	19
2.1.3.	Substanzen und Chemikalien	20
2.1.4.	Kits und Antikörper	22
2.1.4.1.	Kits	22
2.1.4.2.	Antikörper.....	23
2.1.5.	Puffer und Lösungen	23
2.1.5.1.	Puffer und Lösungen für ELISA	23
2.1.5.2.	Puffer und Lösungen für Proteinchemie.....	24

2.1.5.3.	Lösungen für MTT-Assay	25
2.1.6.	Geräte und Einwegmaterial	25
2.2.	Methoden	26
2.2.1.	Zellkultur	26
2.2.2.	Versuche zur Zellproliferation.....	27
2.2.2.1.	Versuchsaufbau und Durchführung	27
2.2.2.2.	Prinzip des MTT-Assay	28
2.2.2.3.	Durchführung des MTT-Assay	29
2.2.3.	Analysen zur VEGF-Sekretion.....	29
2.2.3.1.	Versuchsaufbau und Durchführung	29
2.2.3.2.	Prinzip des <u>E</u> nzyme <u>L</u> inked <u>I</u> mmunosorbent <u>A</u> ssay	31
2.2.3.3.	Durchführung des ELISA.....	32
2.2.4.	Proteinchemische Methoden.....	34
2.2.4.1.	Stimulationsversuche für Western Blot-Analysen	35
2.2.4.2.	Herstellung des Zelllysates.....	35
2.2.4.3.	BCA-Protein Assay	36
2.2.4.4.	Western Blot.....	37
2.2.4.4.1.	Prinzip der Western Blot-Analyse.....	37
2.2.4.4.2.	Durchführung der SDS-Gelelektrophorese	38
2.2.4.4.3.	Nachweisreaktion/Immunoblot	40
2.2.4.4.4.	Western Blot-Stripping.....	41
2.2.5.	Statistik	42
3.	Ergebnisse.....	43
3.1.	Ergebnisse zur Proliferation	43
3.1.1.	Effekt von EGF auf die Proliferation	43
3.1.2.	Einfluss von ZD1839 auf die Proliferation	44
3.1.3.	Einfluss von ZD6474 auf die Proliferation	47
3.1.4.	Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Proliferation	49
3.2.	Ergebnisse zur VEGF-Sekretion	52
3.2.1.	Effekt von EGF auf die VEGF-Sekretion	52
3.2.2.	Beeinflussung der VEGF-Sekretion durch den TKI ZD1839	53
3.2.3.	Beeinflussung der VEGF-Sekretion durch den TKI ZD6474	55
3.2.4.	Beeinflussung der VEGF-Sekretion durch ZD1839/ZD6474	57
3.3.	Western Blot-Analysen.....	60

3.3.1.	Rezeptorexprimierung und Aktivität unter ZD1839	60
3.3.1.1.	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R).....	60
3.3.1.2.	Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor (VEGF-R)	61
3.3.1.3.	Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase-B (Akt).....	62
3.3.1.4.	Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)	63
3.3.2.	Rezeptorexprimierung und Aktivität unter ZD6474	64
3.3.2.1.	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R).....	64
3.3.2.2.	Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor (VEGF-R)	65
3.3.2.3.	Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase-B (Akt).....	66
3.3.2.4.	Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)	67
4.	Diskussion	68
4.1.	Zellproliferation.....	69
4.1.1.	EGF-Effekt auf die Zellproliferation und Wirkung der TKI.....	69
4.1.2.	Wirkung der TKI auf die Zellproliferation.....	70
4.1.3.	Zweiphasige Dosiswirkungskurve durch ZD1839	74
4.2.	VEGF-Sekretion	74
4.2.1.	EGF-Effekt auf die VEGF-Sekretion	74
4.2.2.	Hemmung der VEGF-Sekretion durch ZD1839 und ZD6474	75
4.3.	Western Blot-Analysen.....	77
4.4.	Ausblick.....	81
5.	Zusammenfassung	84
6.	Anhang	86
6.1.	Literaturverzeichnis	86
6.2.	Abbildungen zu Western Blot-Analysen und β -Actin-Färbungen	96
6.3.	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer.....	100
6.4.	Danksagung	101

I. Abkürzungsverzeichnis

Akt	Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase B
bFGF	Basic fibroblast growth factor
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum
FGM	Full growth medium (10% FCS)
FMTC	Familiar medullary thyroid cancer
FNAC	Feinnadelaspirationszytologie
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
H5	Wachstumsmangelmedium
IC50	Mittlere inhibitorische Konzentration
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MEK	Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase (MAPKK)
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
NSCLC	Non small cell lung cancer
PDGF	Platelet derived growth factor
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma oder auch rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RET	Rearranged during transfection protooncogen
TBS	Tris buffered saline
TGF α	Transforming growth factor alpha
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
TTBS	Tween tris buffered saline
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor

1. Einleitung

Das Schilddrüsenkarzinom ist der häufigste bösartige endokrine Tumor. Gemessen an allen malignen Tumoren beträgt sein Anteil etwa 1%. Frauen erkranken etwa zwei- bis dreimal häufiger als Männer. Etwa 94% der Schilddrüsenkarzinome gehen von den Follikel­epithelzellen aus. Dabei sind die differenzierten papillären und follikulären Schilddrüsenkarzinome die häufigsten Formen. Differenzierte Schilddrüsenkarzinome können durch eine Operation, kombiniert mit einer Radiojodtherapie und TSH-supprimierenden Levothyroxin-Dosen gut therapiert werden und weisen meistens eine sehr gute Prognose auf.

Das anaplastische Karzinom macht zwar nur 1,6% der Schilddrüsenkarzinome aus, zählt aber zu den hoch aggressiven Tumoren der Schilddrüse. Es zeichnet sich durch ein rasches, lokal destruktives Wachstum sowie eine frühe lymphogene und hämatogene Metastasierung aus. Aufgrund der raschen Tumorprogression reicht die Anamnese meist nur über wenige Wochen bis Monate. Das mediane Überleben beträgt zwischen vier und zwölf Monaten. Eine effektive Therapieform des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms gibt es bisher noch nicht. Da es in der Regel nicht am Jodstoffwechsel teilnimmt und somit einer Radiojodtherapie nicht zugänglich ist, bleibt in frühen Stadien lediglich die chirurgische Therapie und ggf. eine kombinierte Radiochemotherapie.

Die Angiogenese stellt einen zentralen Mechanismus in der Progression und Metastasierung von Tumoren dar. Nicht vaskularisierte Tumore erreichen lediglich eine Größe von wenigen Kubikmillimetern, da die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung im Inneren des Tumors nicht gewährleistet werden kann und der Tumor in der Folge zentral nekrotisiert. Da die Neoangiogenese für das Wachstum maligner Tumore essentiell ist, stellt sie einen therapeutischen Angriffspunkt dar. Mittlerweile sind zahlreiche körpereigene Stimulatoren (VEGF, EGF, bFGF, PDGF, IL-8, etc.) und Inhibitoren (Endostatin, Angiostatin etc.) der Angiogenese bekannt, wobei die Hemmung der Rezeptoren auf Seite der Stimulatoren einen wichtigen Ansatz in der Tumorthherapie darstellt. Aus der Familie der Tyrosinkinaserzeptoren gehören der EGF- und der VEGF-Rezeptor zu den am besten untersuchten Rezeptoren. In verschiedenen Tumorentitäten kann eine Überexpression beider Rezeptoren nachgewiesen werden. Eine EGFR-Überexpression geht dabei mit einer Dedifferenzierung des Schilddrüsenkarzinoms in ein anaplastisches Karzinom einher.

Weiterhin konnten in vitro-Untersuchungen zeigen, dass das Vorhandensein von EGF die VEGF-Sekretion steigert. Somit stellen die beiden vorgestellten Rezeptoren einen interessanten therapeutischen Angriffspunkt vor allem in der Behandlung dedifferenzierter, also anaplastischer Karzinome dar.

1.1. Das Schilddrüsenkarzinom

1.1.1. Epidemiologie

Das Schilddrüsenkarzinom ist die häufigste maligne Neubildung endokriner Organe mit weltweit steigender Inzidenz. Gemessen an allen malignen Tumoren liegt der Anteil bei etwa 1% (Köhrle, 2004; Reiners et al., 2005). In der Bundesrepublik erkranken jährlich knapp über 4100 Personen an Schilddrüsenkrebs, wobei Frauen mit einem Anteil von 2800 Neuerkrankungen pro Jahr deutlich häufiger betroffen sind als Männer. Die erfasste altersstandardisierte Inzidenz für Deutschland wurde zwischen 2001 und 2002 mit 2,9 pro 100.000 für Männer und mit 5,9 pro 100.000 für Frauen geschätzt. Im Vergleich zum Jahr 1980, in dem eine Inzidenz von 4 pro 100.000 Frauen errechnet wurde, entspricht dies einem Anstieg um 50%. Auch in anderen EU-Ländern liegen die Inzidenzraten für Frauen weit höher als die für Männer. Das mittlere Erkrankungsalter für Frauen liegt bei etwa 58 Jahren, für Männer bei 54 Jahren. Damit liegt der Erkrankungsgipfel weit unter dem für andere Krebserkrankungen (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI 2006; Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010 Robert Koch-Institut, 2010).

1.1.2. Histologische Einteilung, Ätiologie und Prognose

1.1.2.1. Differenzierte Schilddrüsenkarzinome

Ausgehend von den Follikelepithelzellen sind differenzierte Schilddrüsenkarzinome mit einem Anteil von etwa 94% die häufigsten Schilddrüsenkarzinome und lassen sich in papilläre und follikuläre Karzinome unterteilen. Der häufigste Histiotyp ist das papilläre Schilddrüsenkarzinom, jedoch steigt in Regionen mit unzureichender Jodversorgung der relative Anteil an follikulären Schilddrüsenkarzinomen. Ätiologisch gilt ionisierende

Strahlung als wichtigster exogener Faktor für die Entwicklung eines Schilddrüsenkarzinoms (Sherman, 2003). Als besonders problematisch wird dabei die Strahlenexposition im Kindes- und Jugendalter erachtet. So beobachtete man nach dem Reaktorunfall in Tschernobyl 1986 vor allem einen drastischen Anstieg an kindlichen Schilddrüsenkrebserkrankungen in Regionen mit radioaktivem Niederschlag, wobei sich häufig sehr aggressive Tumoren fanden (Pacini et al., 1997; Williams et al., 2004). Des Weiteren konnten bei den papillären Karzinomen somatische Mutationen im RET-RAS-BRAF-Signaltransduktionsweg nachgewiesen werden, die zu einer Aktivierung der MAP-Kinase führen und damit die Zellteilung anregen (Kimura et al., 2003).

Das papilläre Schilddrüsenkarzinom metastasiert vorwiegend lymphogen und zeigt oft eine intrathyreoidale Ausbreitung, während das follikuläre Karzinom hämatogen in Knochen, Lunge und Gehirn metastasiert (Boone et al., 2003). Unter den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen existiert eine große Anzahl an histologischen Subtypen, die neben Alter, Stadium der Erkrankung und Tumordifferenzierungsgrad auch für die unterschiedliche Prognose der Erkrankung verantwortlich sind. So kann bei papillären Schilddrüsenkarzinomen ein durchschnittliches zehn Jahres-Überleben von 98% und bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen von 92% beobachtet werden. Demgegenüber zeigt die großzellige (Tall-Cell) Variante des papillären Schilddrüsenkarzinoms sowie das onkozytäre follikuläre Karzinom (Hürthle-Zell Tumor) eine schlechtere Prognose (D'Avanzo et al., 2004; Sherman, 2003).

1.1.2.2. Medulläres Schilddrüsenkarzinom (C-Zell-Karzinom)

Das medulläre Schilddrüsenkarzinom ist ein von den C-Zellen ausgehender neuroendokriner Tumor. Dieser nicht originär von Schilddrüsenfollikelzellen stammende Tumor ist mit einem Anteil von 5% an allen Schilddrüsenkarzinomen vertreten. Etwa 80% aller Erkrankungen treten sporadisch auf. Die übrigen treten im Rahmen einer multiplen endokrinen Neoplasie (MEN Typ IIA und IIB) oder eines familiären medullären Karzinoms (FMTC) auf. Bei der hereditären Form des C-Zell-Karzinoms stellen Keimbahnmutationen im RET-Protoonkogen (Rearranged during transfection protooncogene), welches für ein Zelloberflächenprotein aus der Familie der Tyrosinkinase kodiert und für Zellwachstum und Zelldifferenzierung verantwortlich ist, den entscheidenden ätiologischen Faktor dar. Der Nachweis dieser Mutation gelingt bei etwa 98% aller Fälle. Aufgrund der frühzeitigen lymphogenen Metastasierung

weisen bei Diagnosestellung bereits 50% der Patienten lokoregionäre Lymphknotenmetastasen auf und zeigen in Abhängigkeit vom Alter eine durchschnittliche zehn Jahres-Überlebenszeit von 50 bis 75% (Sherman, 2003). Es besteht Konsens darüber, dass bei der hereditären Form ein aggressiveres therapeutisches Vorgehen indiziert ist (Vgl. 1.1.4.2.).

1.1.2.3. Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom

Das anaplastische Schilddrüsenkarzinom zählt zu den aggressivsten Krebsarten und stellt wahrscheinlich die terminale Dedifferenzierung länger bestehender, unentdeckter differenzierter Schilddrüsenkarzinome dar. Es ist mit einer Häufigkeit von etwa 1,6% an allen Schilddrüsenkarzinomen relativ selten (Ain, 1999). Die anaplastischen Schilddrüsenkarzinome weisen eine hohe Anzahl an molekularen Veränderungen auf. So findet man in vielen anaplastischen Karzinomen Mutationen im Tumorsuppressorgen p53, aber auch Mutationen im Ras/Raf-MAPK- und PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg (Fagin et al., 1993; Santarpia et al., 2008).

Aufgrund der frühzeitigen lymphogenen und hämatogenen Metastasierung (Lunge, Knochen, umliegendes Weichteilgewebe, Gehirn, Trachea u.a.) sowie des lokal destruktiven Wachstums (teilweise Verdopplung des Tumolvolumens innerhalb einer Woche) ist das anaplastische Schilddrüsenkarzinom mit einer Mortalität von nahezu 100% verbunden. Dabei hängt die Überlebenszeit vom Stadium der Erkrankung ab. So liegt die mediane Überlebenszeit der Patienten nach Diagnosestellung zwischen vier und zwölf Monaten. Bei Patienten mit Fernmetastasen (50% aller Patienten) liegt die durchschnittliche Überlebenszeit bei nur drei Monaten (Ain, 1999). Prognoseverbessernde Therapiekonzepte existieren derzeit nicht (Vgl. 1.1.4.3.).

1.1.3. Diagnostik

Die Diagnostik von Schilddrüsenerkrankungen basiert neben der Palpation (als suspekt gelten: derbe, schnell wachsende, nicht verschiebliche Knoten) und Laboruntersuchungen (TSH und ggf. fT3, fT4, Calcitonin) vornehmlich auf der Sonographie. Sie stellt die Methode der Wahl in der Erkennung maligner Prozesse dar. Malignitätskriterien sind Echoarmut, unregelmäßige Begrenzung, verstärkte Gefäßversorgung, Gefäßinvasion, Mikroverkalkungen und eine regionale

Lymphadenopathie. Eine Schilddrüsenszintigraphie sollte nur noch in Fällen von erniedrigtem oder nicht messbarem TSH durchgeführt werden, um so zwischen metabolisch aktiven bzw. inaktiven Knoten unterscheiden zu können. Jeder klinisch und/oder sonographisch verdächtige solitäre Knoten $\geq 1\text{cm}$ sollte einer Feinnadelaspirationszytologie (FNAC) unterzogen werden. Die FNAC stellt den Goldstandard in der Differentialdiagnose von Schilddrüsenerkrankungen dar, weist jedoch Schwierigkeiten bei dem histopathologischen Befund einer follikulären Läsion auf. Da die Unterscheidung zwischen Adenom und follikulärem Karzinom nur am Gewebeschnitt erkennbar ist (das Karzinom zeigt eine Kapselinvasion), erfolgt bei diesem Befund häufig eine diagnostische Operation. Zur weiteren diagnostischen Abklärung des (medullären) C-Zell-Karzinoms werden Bestimmungen von Serumcalcitonin und CEA, ein Pentagastrintest sowie Gen-Analysen durchgeführt. Weitere präoperative Untersuchungen, die jedoch nicht routinemäßig durchgeführt werden, umfassen die Computertomographie (CT) ohne Kontrastmittel, die Magnetresonanztomographie (MRT) sowie die Positronen-Emissions-Tomographie (PET). Diese sollten speziellen Fragestellungen vorbehalten bleiben (Pacini et al., 2006; Sherman, 2003).

1.1.4. Therapie

1.1.4.1. Differenzierte Schilddrüsenkarzinome

Die radikale Thyreoidektomie mit Entfernung suspekter Lymphknoten (meist des zentralen Kompartiments) und nachfolgender Radiojodtherapie stellt das Standardverfahren in der Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome dar. Eine Ausnahme bilden gut differenzierte papilläre Karzinome $\leq 1\text{cm}$ Durchmesser (sogenannte Mikrokarzinome), bei denen eine ipsilaterale Hemithyreoidektomie ohne nachfolgende Radiojodtherapie durchgeführt werden kann.

Vom Follikelepithel ausgehende papilläre und follikuläre Karzinome der Schilddrüse nehmen als einzige Tumorentitäten am Jodstoffwechsel teil und befähigen aus diesem Grund zu einer postoperativen Radiojodtherapie. Ziel der Radiojodtherapie ist die Ablation von verbliebenem Schilddrüsengewebe, mikroskopisch kleinen Tumorresten, befallenen Lymphknoten und Metastasen. Voraussetzung für die Radiojodtherapie stellt neben der möglichst kompletten Thyreoidektomie ein erhöhter TSH-Spiegel $> 30\text{mU/l}$

dar, um eine optimale Radiojodaufnahme zu gewährleisten. Dieser wird etwa vier bis fünf Wochen postoperativ entweder durch Verzicht der Schilddrüsenhormonsubstitution und/oder durch Zufuhr von rekombinant hergestelltem TSH erreicht.

In der Nachbehandlung spielt die lebenslange Suppressionstherapie mit L-Thyroxin eine bedeutende Rolle, um so die postoperativ zu erwartende Hypothyreose auszugleichen. Des Weiteren können TSH-suppressive Dosen ($\text{TSH} \leq 0,1 \text{ mU/l}$) ein erneutes Tumorwachstum verhindern und somit die Rate an Lokalrezidiven senken. Darüber hinaus erfolgt in regelmäßigen Abständen eine körperliche Untersuchung, eine Sonographie des Halses und die Thyreoglobulinbestimmung (Pacini et al., 2006).

1.1.4.2. Medulläres Schilddrüsenkarzinom

Die Therapie der Wahl bei den medullären Schilddrüsenkarzinomen umfasst die totale Thyreoidektomie sowie die Dissektion des zentralen Lymphknotenkompartiments. Bei den sporadisch auftretenden Karzinomen erfolgt zusätzlich die Dissektion des ipsilateralen Lymphknotenkompartiments, bei den hereditären Formen die Dissektion beider lateraler Lymphknotenkompartimente. Obwohl die chirurgische Therapie den einzig kurativen Ansatz in der Behandlung des medullären Schilddrüsenkarzinoms darstellt, persistiert die Erkrankung bei zwei Dritteln der Patienten, so dass regelmäßige Nachsorgeuntersuchungen notwendig sind. Erhöhte Werte des spezifischen Tumormarkers Calcitonin sowie des CEA weisen auf einen Residualtumor hin, der einer erneuten Abklärung bedarf und einen chirurgischen Eingriff oder eine perkutane Strahlentherapie nach sich zieht. Um die erhöhte Mortalität, welche vor allem durch Metastasen und Lokalrezidive verursacht wird, zu senken sind neue Therapieoptionen erforderlich. Interessante Therapieansätze verfolgen unter anderem eine Hemmung des EGF- und VEGF-Rezeptors sowie der RET-Kinaseaktivität durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie ZD6474 oder XL184 (Schlumberger et al., 2008; Tai und Poon, 2010).

1.1.4.3. Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom

Die Behandlung des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms erfolgt aufgrund der infausten Prognose meistens unter palliativen Gesichtspunkten durch ein multimodales Therapiekonzept. Operativ ist eine radikale R0-Resektion anzustreben, meist ist jedoch

nur eine Tumorverkleinerung zu erreichen, da Nachbarstrukturen wie Nerven, Gefäße und Trachea oft frühzeitig infiltriert sind. Im Anschluss sollte eine perkutane Strahlentherapie erfolgen, die in 40% der Fälle initial zu einer Tumorverkleinerung führt. Die meisten Patienten erleiden jedoch ein Lokalrezidiv, was die Strahlenresistenz des anaplastischen Karzinoms verdeutlicht. Eine simultane Chemotherapie mit Doxorubicin als Radiosensitizer kann das initiale Ansprechen des Tumors auf 80% erhöhen und somit die Lokalrezidivrate senken. Eine adjuvante Chemo- bzw. Polychemotherapie dient in erster Linie der Kontrolle von Fernmetastasen, allerdings weisen undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome neben der Strahlenresistenz auch häufig eine Chemotherapieresistenz auf. Diese aggressiven multimodalen Therapiekonzepte sind jedoch allenfalls geeignet um eine gewisse lokale Tumorkontrolle zu erreichen. Eine Verbesserung der Überlebensprognose zeigt sich nicht. Die Infiltration der Atemwege durch einen lokal fortschreitenden, nicht-resektablen Tumor sowie die Ausbildung von Fernmetastasen stellen im Spätstadium die Haupttodesursache dar (Ain, 1999; Sherman, 2003).

Die im Gegensatz zu differenzierten Karzinomen nur schlechte Therapierbarkeit der anaplastischen Karzinome und die daraus resultierende extrem schlechte Prognose macht innovative Therapiestrategien erforderlich. Einen interessanten Angriffspunkt in der Behandlung stellen Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität dar.

1.2. Molekularbiologische Aspekte

1.2.1. Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen spielen eine fundamentale Rolle bei zahlreichen zellulären Prozessen und greifen regulierend in den Zellzyklus, die Zellmigration, den Zellmetabolismus sowie das Zellüberleben, die Proliferation und die Differenzierung ein (Schlessinger, 2000). Abweichungen von Proliferation, Differenzierung, Überleben und Motilität der Zelle sind grundsätzlich Ereignisse, die Anlass zur Entstehung von Krebserkrankungen geben können (Neel und Tonks, 1997).

Bis heute sind weit über 90 Gene bekannt, die für Proteintyrosinkinasen kodieren. Davon enkodieren 58 für Rezeptortyrosinkinasen, die aufgrund von Strukturhomologien in 20 Unterfamilien kategorisiert werden (siehe Abb 1.1). Weitere 32 kodieren für

1.2.1.1. Der EGF-Rezeptor

Der EGF-Rezeptor (ErbB) gehört zu den am meisten und längsten untersuchten Rezeptoren. An ihm konnte auch als erstes eine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität nachgewiesen werden (Cohen et al., 1980). Zusammen mit ErbB2 (HER2neu), ErbB3 und ErbB4 gehört er zu den Klasse-1-Rezeptortyrosinkinasen und besteht aus einem 1186 Aminosäuren umfassenden transmembranen Glykoprotein (Heldin, 1995; Wells, 1999). Die Bindung eines spezifischen Liganden wie z.B. EGF (epidermal growth factor), TGF α (transforming growth factor), HB-EGF (heparin binding EGF) oder Amphiregulin führt zu Homo- oder Heterodimerisation von ErbB-Rezeptoren (z.B. ErbB1/ErbB1, bzw. ErbB2/ErbB3) und infolge dessen zur Phosphorylierung von Tyrosinresten der zyttoplasmatischen Domäne. Die Bildung verschiedener Heterodimere verdeutlicht, dass die ErbB-Rezeptorfamilie ein hohes Maß an Signaldiversität erlaubt und so unterschiedlichste nachgeschaltete Signaltransduktionswege induzieren kann (Schlessinger, 2000), (Hierzu siehe Abbildung 1.2 und Erläuterungen in 1.2.1.2. ff.).

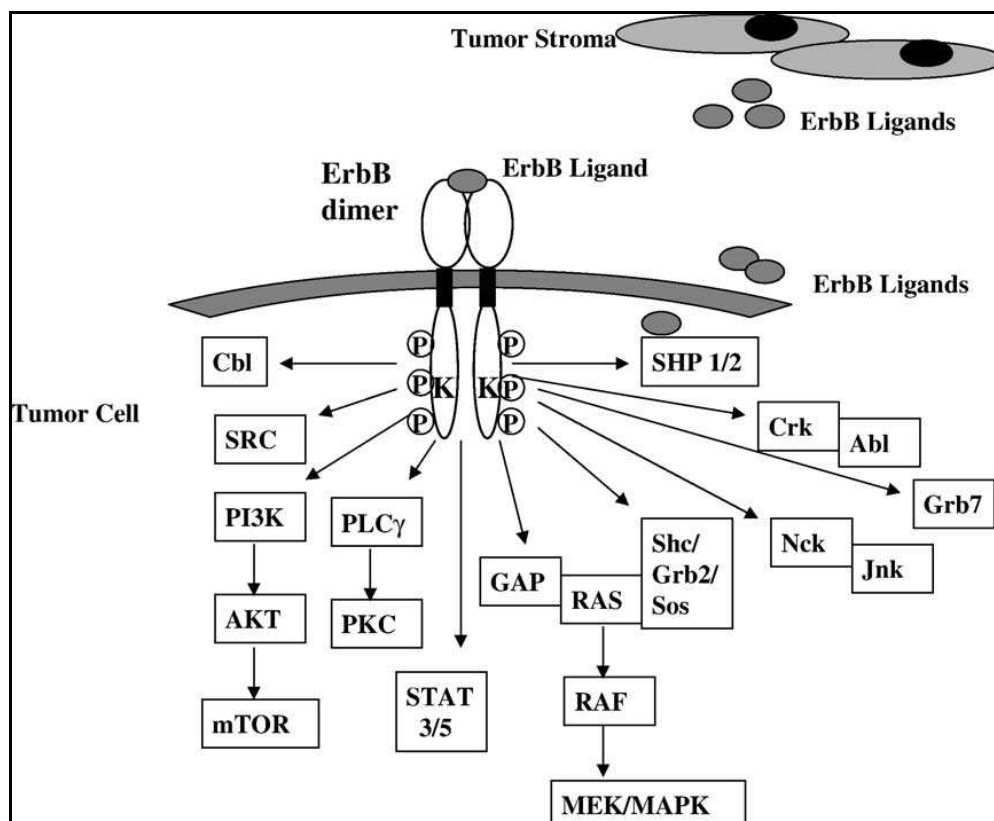


Abb. 1.2: ErbB-Aktivierung in Tumorzellen aus Normanno et al., 2006

Die ErbB-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen. In mehreren Studien konnte eine Überexpression des EGF-

Rezeptors in soliden Neoplasmen gezeigt werden, beispielsweise in Tumoren von Lunge, Kopf und Hals sowie in Darm und Brust (Normanno et al., 2006). Insbesondere bei Verlust des TSH-Rezeptors (charakteristisch für die meisten anaplastischen Schilddrüsenkarzinome) konnte gezeigt werden, dass die in vitro-VEGF-Sekretion über ligandenabhängige EGF-Rezeptor-Aktivierung deutlich ansteigt und somit gerade der EGF-Rezeptor bei der Neoangiogenese des Schilddrüsenkarzinoms eine wichtige Rolle einnimmt (Hoffmann et al., 2004).

1.2.1.2. Signalisierung an intrazelluläre Effektorproteine

Unter 1.2.1. wurde beschrieben, dass Effektorproteine mit aktivierten Rezeptortyrosinkinasen in Wechselwirkung treten. Über verschiedene komplexe Signalwege werden die an der Zelloberfläche ausgelösten Signale durch das Zytoplasma an den Zellkern weitergeleitet. Zu den wichtigsten von Rezeptortyrosinkinasen aktivierten Signalwegen zählen der Ras/Raf/MAPK-Weg, der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Weg und der Phospholipase C-Weg. Nachfolgend werden die beiden erstgenannten Signalwege genauer beschrieben.

1.2.1.2.1. Ras und die Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Die Ras-Proteine gehören zu der Ras-Superfamilie von monomeren GTPasen, die über eine Lipidgruppe an der zytosolischen Seite der Membran verankert sind. Ras existiert in zwei verschiedenen Formen: der inaktiven GDP- und der aktiven GTP-gebundenen Form. Dabei steuern zwei Klassen von Signalproteinen die Ras-Aktivität. Der Guanin-Nucleotid austauschfaktor (z.B. Sos) fördert die Aufnahme von GTP und aktiviert Ras, wohingegen GTPase aktivierende Proteine (GAP) die Hydrolysegeschwindigkeit von gebundenem GTP erhöhen und so Ras inaktivieren. Ras fungiert oft in Zusammenhang mit Rezeptortyrosinkinasen, wenn Oberflächensignale über Serin/Threonin-Kinasen an den Zellkern weitergeleitet werden, um Zellproliferation oder -differenzierung zu steuern (Crespo und Leon, 2000). Etwa 30% aller menschlichen Tumoren weisen eine Ras-Mutation auf, die zu einer ständigen Aktivierung führen (Downward, 1998). Die Bindung von GTP an Ras (aktive Form) löst eine Konformationsänderung aus, wodurch eine Kontaktfläche von Ras mit Raf, einer Serin/Threonin-Kinase entsteht. Raf

wiederum stellt einen Aktivator von MEK dar, die schließlich die MAP-Kinase aktiviert, welche in zwei Gruppen unterteilt werden kann. Zur ersten Gruppe gehören Erk1 und Erk2 (extracellular regulated kinases), die hauptsächlich für Zellproliferation verantwortlich sind. Ihre Substrate stellen Transkriptionsfaktoren (zB. Elk-1) dar, an dessen Ende die Aktivierung von Genen steht. Hierzu gehört zum Beispiel Cyclin D1, welches entscheidenden Einfluss auf die Überführung der Zelle von der G1- in die S-Phase hat. Zur zweiten Gruppe, die hauptsächlich durch extrazellulären Stress aktiviert wird, zählen die p38-Kinasen und die JNK-Familie (Widmann et al., 1999).

1.2.1.2.2. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase-B (Akt)

Der PI3-Kinase/Akt-Signalweg ist einer der Hauptwege der Signaltransduktion nach Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen. Dieser Signalweg stellt einen Regulator vieler zellulärer Prozesse wie Zellproliferation, -wachstum, -migration und -überleben dar. Es gibt verschiedene Formen der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), sie bestehen jedoch immer aus einer regulatorischen und einer katalytischen Einheit und können sowohl über Rezeptortyrosinkinasen als auch über G-Proteingekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Luo et al., 2003; Vivanco und Sawyers, 2002). Die Regulatoruntereinheit (p85) dient dabei als Adapterprotein, das über ihre SH2-Domäne an Phosphotyrosine von aktivierten Rezeptortyrosinkinasen bindet. Die katalytische Einheit (p110), welche auch direkt über Ras aktiviert werden kann, katalysiert die Phosphorylierung von in der Plasmamembran befindlichen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Intrazelluläre Signalproteine binden über ihre Pleckstrinhomologe Domäne (PH-Domäne) direkt an PIP₃, wobei die Protein Serin/Threonin-Kinasen PKB (Proteinkinase B, auch Akt genannt) und die PDK1 (phospholipid dependent kinase) von besonderem Interesse sind. Ein weiterer notwendiger Schritt stellt die Phosphorylierung von Akt an Thr308 durch PDK1 dar, was die katalytische Aktivität von Akt steigert.

Biologische Konsequenzen, die sich durch die Akt-Aktivierung ergeben und relevant für das Wachstum von Tumoren sind, lassen sich in nachfolgende Kategorien unterteilen:

1. Zellüberleben
2. gesteigerte Proliferation (erhöhte Zellzahl durch Zellteilung)
3. erhöhtes Wachstum (Zunahme der Zellgröße).

Zu 1.: Akt phosphoryliert direkt mehrere Komponenten, die für den programmierten Zelltod verantwortlich sind. Ein Mechanismus stellt die Phosphorylierung von BAD dar, welches normalerweise den programmierten Zelltod über Komplexbildung mit dem Überlebensfaktor BCL-X_L auslöst. Die Phosphorylierung von BAD verhindert diese Komplexbildung, so dass BCL-X_L seine anti-apoptotische Funktion aufrechterhalten kann. Ebenso verhält es sich mit den apoptoseinduzierenden Caspasen, deren katalytische Aktivität durch Akt-vermittelte Phosphorylierung gehemmt wird.

Zu 2.: Akt kann die Proliferationsrate über Aktivatoren des Zellzyklus fördern. Wie unter 1.2.1.2.1 erläutert, stellt Cyclin D1 einen wichtigen Faktor in der Zellzyklusregulation dar. Durch direkte Phosphorylierung der Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) verhindert Akt die Phosphorylierung von Cyclin D1, wodurch der Abbau von Cyclin D1 in Proteasomen gehemmt wird.

Zu 3.: Akt gehört zu den Stimulatoren der Serin/Threonin-Kinase mTor (mammalian target of rapamycin), die an der Kontrolle der Proteinbiosynthese beteiligt ist. Stehen der Zelle genügend Nährstoffe zur Verfügung, sendet mTor ein Signal an die p70S6-Kinase (RSK), welche die Proteintranslation steigert (Cantley, 2002; Schlessinger, 2000; Vivanco und Sawyers, 2002).

1.2.1.3. Der VEGF-Rezeptor und Neoangiogenese

Folkman stellte bereits 1971 die Hypothese der Neovaskularisation von soliden Tumoren auf, wonach Tumore ohne Anschluss an das Blutgefäßsystem nicht über eine Größe von 1-2mm³ hinaus wachsen können (Folkman, 1971). Ein weiteres Phänomen, das Anlass zu intensiven Forschungen gab, war die Beobachtung, dass vom Primärtumor freigesetzte Substanzen ein Wachstum von Metastasen hemmen konnten. Erst nach Resektion des Primärtumors entfiel dieser hemmende Effekt auf unentdeckte Mikrometastasen, die nun aus ihrem Ruhezustand in einen aktiven Zustand überführt wurden und wachsen konnten. Verantwortlich für diesen Ruhezustand („Tumordormancy“) war Angiostatin, ein endogener Inhibitor der Angiogenese. In den folgenden Jahren wurden mehrere sowohl proangiogene Faktoren als auch Inhibitoren der Angiogenese gefunden, die sich physiologischerweise im Gleichgewicht halten (siehe Abbildung 1.3). Wird dieses Gleichgewicht durch eine Zunahme proangiogener Faktoren und eine gleichzeitige Abnahme inhibitorischer Faktoren gestört, führt dies zu Neoangiogenese (Folkman, 1995; Hanahan und Folkman, 1996; O'Reilly et al., 1994).

Die Tumorangiogenese ist ein dynamischer Prozess, der durch mehrere hintereinander geschaltete Schritte, wie Abbau von Basalmembranen durch Proteasen, Endothelzellproliferation und -migration sowie Bildung von Kapillaren gekennzeichnet ist (Ferrara, 1999; Folkman, 1990).

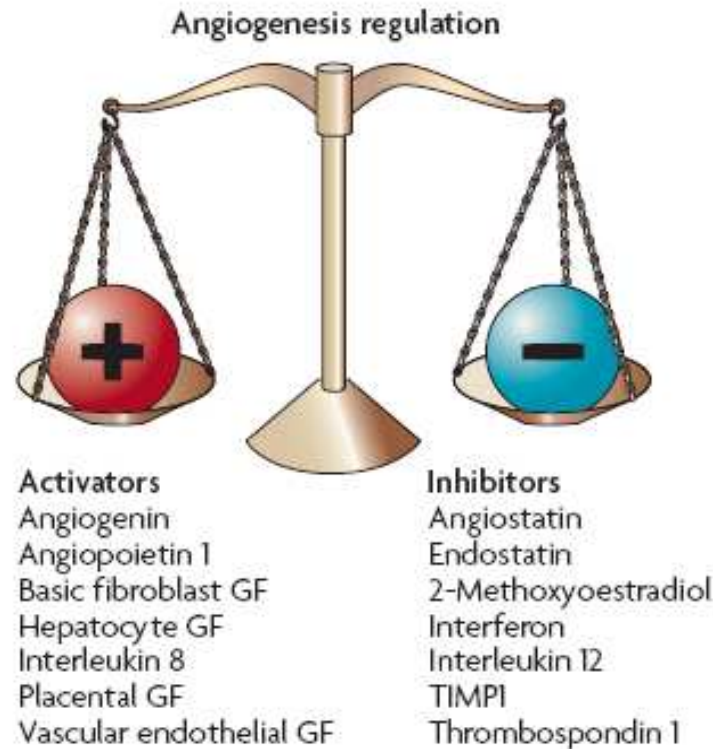


Abb. 1.3: Regulatoren der Angiogenese aus Zetter, 2008

Unter den Angiogenesefaktoren nimmt VEGF eine Schlüsselrolle ein, da er von nahezu allen soliden Tumoren gebildet und sezerniert wird (Siemeister et al., 1998). Zu den Prozessen, die über VEGF gefördert werden, zählen unter anderem das Wachstum von Endothelzellen und ihre Migration, die Stimulation von Surfactant, das Zellüberleben, Chemotaxis, die Steigerung der Gefäßpermeabilität und die Vasodilatation. Die Expression von VEGF wird hauptsächlich über einen bestehenden Sauerstoffmangel geregelt, wobei der hypoxie-induzierbare Faktor (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) das zentrale Element darstellt. Der VEGF-Rezeptor gehört zu der Familie der Rezeptortyrosinkinasen, wobei bisher drei verschiedene Formen identifiziert werden konnten. Für die Effekte von VEGF an Gefäßendothelzellen sind der VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase, Flt-1) und der VEGFR-2 (kinase domain region/fetal liver kinase, KDR/Flk-1) verantwortlich. Beide Rezeptoren bestehen aus einer immunoglobulinartig aufgebauten extrazellulären Domäne, einer transmembranen Region sowie einer

intrazellulären Sequenz, die durch eine Kinaseinsertionsregion unterbrochen ist (Carmeliet, 2003; Ferrera, 2005). Der VEGF-Rezeptor-1 ist vor allem ein positiver Regulator der Monozyten- und Makrophagen-Migration und kann sowohl als positiver wie auch negativer Regulator der VEGFR-2-Signalfunktion dienen. Der VEGF-Rezeptor-2 vermittelt alle normalen und pathophysiologischen Aspekte der Angiogenese, wie wachstums-, migrations- und differenzierungsfördernde Signale. Der VEGF-Rezeptor-3 ist insbesondere verantwortlich für die Entwicklung und Funktion von lymphatischen Endothelzellen. Bindung von spezifischen Liganden kann auch in Heterodimerisation von VEGFR-2 und VEGFR-3 resultieren (Olsson et al., 2006).

1.3. Inhibition von Rezeptortyrosinkinasen als antitumorales Prinzip

Das zunehmende Wissen über Tumorentstehung und Tumorüberleben auf molekularbiologischer Ebene hat in den letzten Jahren zur Entwicklung von Medikamenten geführt, die Möglichkeiten einer zielgerichteten Therapie („targeted therapy“) eröffnen. Durch eine spezifische Hemmung ausgewählter Signaltransduktionswege soll im Gegensatz zur konventionellen Chemotherapie eine maximale, optimierte Tumorkontrolle bei einem geringeren Nebenwirkungsprofil erreicht werden. Grundsätzlich stehen nachfolgende Angriffspunkte zur Verfügung:

- 1.) Niedermolekulare Substanzen („small molecules“), welche spezifisch die ATP-bindende Region der Kinasedomäne von Rezeptortyrosinkinasen blockieren und so die Aktivierung intrazellulärer Signalwege hemmen.
- 2.) Monoklonale Antikörper (mAb), welche spezifisch für einen Wachstumsfaktor sind und diesen vor seiner Bindung an den Rezeptor inaktivieren oder kompetitiv verdrängen.

Derzeit werden eine Vielzahl von Tyrosinkinaseinhibitoren in präklinischen und klinischen Phase I-III Studien untersucht oder sind bereits in der Behandlung von Tumorerkrankungen zugelassen. Allein 285 offene und geschlossene klinische Phase I-III-Studien untersuchen zurzeit die Wirkung von Tyrosinkinaseinhibitoren an verschiedenen Tumorentitäten (siehe: <http://www.clinicaltrials.gov>). Einen Überblick über aktuelle und ältere Studien geben Imai und Takaoka, 2006; Kessler et al., 2010; Steeghs et al., 2007 sowie Stoffel, 2010.

1.3.1. Gefitinib-ZD1839 (Iressa®)

ZD1839 stellt einen oral verfügbaren, niedermolekularen, selektiven EGF-Rezeptor-Inhibitor dar. Chemisch handelt es sich um ein synthetisches Chinazolin [N-(3-Chlor-4-fluorphenyl)-7-methoxy-6-[3-(morpholin-4-yl)propoxy]chinazolin-4-amin] mit einem Molekulargewicht von MW = 447Da.

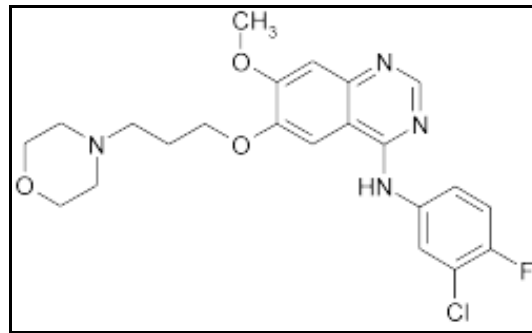


Abb. 1.4: Strukturformel ZD1839

Präklinische Studien haben gezeigt, dass ZD1839 das Wachstum verschiedener Tumorentitäten, wie z.B. Lungen-, Prostata-, Dickdarm-, Ovarial- und Brusttumoren hemmt. Dabei stehen vor allem hemmende Effekte auf die Tumorphosphorylierung und -angiogenese sowie apoptosefördernde Effekte im Vordergrund (Herbst, 2002). So konnte ZD1839 bei in vitro-Untersuchungen zu verschiedenen Zelllinien des androgen-sensitiven und androgen-unabhängigen Prostatakarzinoms die Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors inhibieren (IC₅₀ 0,46µM bis 0,97µM), die Zellproliferation hemmen (mittlere IC₅₀ 0,45µM) und bei Konzentrationen von > 1µM ZD1839 Apoptose induzieren (Vicentini et al., 2003). ZD1839 war der erste EGFR-Inhibitor, der in zwei randomisierten Phase II-Studien klinisch relevante Antitumoraktivität bei Patienten mit therapierefraktärem nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom (NSCLC) zeigte und so 2003 als third-line Therapie beim NSCLC eingeführt wurde. Später stellte sich in der randomisierten, Plazebo-kontrollierten Phase III-Studie ISEL (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer trial) jedoch heraus, dass ZD1839 gegenüber der Plazebogabe keinen signifikanten Effekt auf das mediane Überleben der Patienten mit NSCLC hatte (Thatcher et al., 2005). Eine weitere Studie testete die Kombinationstherapie von ZD1839 und 5-Fluorouracil bei verschiedenen Zelllinien des NSCLC. Gemessen an dem antiproliferativen Effekt reichten die IC₅₀-Werte je nach Zelllinie von 9µM bis 35µM ZD1839 und konnten durch die Kombination mit 5-FU halbiert bzw. reduziert werden (Okabe et al., 2009). Durch intensive

Tumorzellforschung auf Molekularebene konnte mittlerweile gezeigt werden, dass ZD1839 beim fortgeschrittenen NSCLC mit aktivierender EGFR-Mutation eine gute Wirksamkeit aufweist. Träger der oben genannten Mutation erwiesen sich dabei als Responder, während Patienten ohne entsprechende Mutation non-responder für ZD1839 waren. Dies führte dazu, dass ZD1839 als first-line Therapie bei Patienten mit aktivierender EGFR-Mutation zugelassen wurde (siehe auch 4.4.). ZD1839 ist derzeit weiter Gegenstand intensiver Forschungen im Bereich verschiedener Tumorentitäten (Ciardiello und Tortora, 2008; Takeuchi und Ito, 2010).

1.3.2. Vandetanib-ZD6474 (Zactima®)

ZD6474 gehört wie ZD1839 zu den niedermolekularen, oral verfügbaren Tyrosinkinaseinhibitoren aus der chemischen Gruppe der Chinazoline [4-(4-Brom-2-fluoranilino)-6-methoxy-7-(1-methylpiperidin-4-ylmethoxy)chinazolin], mit einem Molekulargewicht von MW = 475Da.

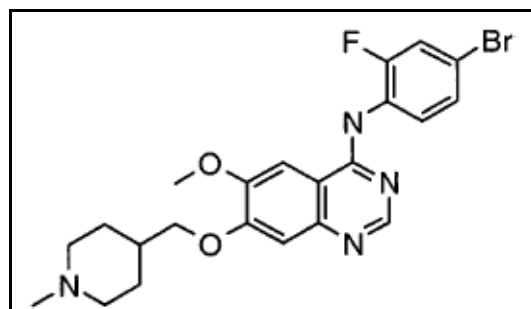


Abb. 1.5: Strukturformel ZD6474

Zielstruktur von ZD6474 ist die Kinaseinsertionsregion des VEGF-Rezeptors (VEGFR1 und VEGFR3). Die Substanz zeigt aber ebenso Aktivität gegenüber dem EGF-Rezeptor (ErbB1) sowie anderer Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen (Wedge et al., 2002). In vitro-Studien untersuchen unter anderem die Wirksamkeit beim Magenkarzinom und dem Bronchialkarzinom. Untersuchungen an TMK-1-Zelllinien des Magenkarzinoms konnten eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl durch ZD6474 nachweisen (McCarty et al., 2004). Eine dosisabhängige Zellzahlreduktion zeigte sich ebenfalls an verschiedenen Zelllinien des NSCLC mit IC50-Werten von etwa 2µM bis 3µM ZD6474. In derselben Studie konnte nachgewiesen werden, dass ZD6474 Apoptose induziert und die Phosphorylierung nachgeschalteter zytoplasmatischer Signalwege inhibiert (Wu et al., 2007). Mittlerweile sind mehrere klinische Studien (Phase I-III) zu

ZD6474 abgeschlossen oder in Vorbereitung. Im Vordergrund steht dabei insbesondere die Behandlung des fortgeschrittenen NSCLC (Kombinationstherapien, Monotherapie versus Plazebo, Monotherapie versus Erlotinib). Vielversprechend sind aber auch Studien zu Tumoren, die Mutationen im RET-Protoonkogen aufweisen, wie z.B. das hereditäre medulläre Schilddrüsenkarzinom (Herbst et al., 2007; Schlumberger et al., 2008). Ergebnisse einer Phase II-Studie zeigten, dass ZD6474 beim fortgeschrittenen hereditären medullären Schilddrüsenkarzinom in 20% der Fälle zu einer partiellen Remission führte und in 53% der Fälle eine Stabilisierung der Erkrankung erreicht werden konnte (Wells et al., 2010).

1.4. Fragestellung

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, den antitumoralen Einfluss zweier Tyrosinkinaseinhibitoren (Gefitinib-ZD1839, Iressa[®] und Vandetanib-ZD6474, Zactima[®]) auf vier verschiedene Zelllinien von Schilddrüsenkarzinomen in vitro zu untersuchen. Gefitinib stellt einen Tyrosinkinaseinhibitor dar, der primär am EGF-Rezeptor wirkt, während Vandetanib primär am VEGF-Rezeptor wirkt. Untersucht wurden zwei anaplastische Karzinomzelllinien (Hth74 und der aggressivere Subklon C643) sowie eine papilläre (TPC-1) und eine follikuläre (FTC-133) Zelllinie. Um beide Substanzen zu evaluieren kamen drei verschiedene quantitative und qualitative Untersuchungsmethoden zum Einsatz. Hierbei wurden alle Versuchsreihen jeweils in Ab- und Anwesenheit von EGF durchgeführt.

- (1) Hemmung der Zellproliferation durch Gefitinib und Vandetanib sowie deren Kombination Gefitinib/Vandetanib in Abhängigkeit von Konzentration und Wirkdauer.
- (2) Auswirkung von Gefitinib und Vandetanib sowie der Kombination von Gefitinib/Vandetanib auf die VEGF-Sekretion.
- (3) Identifikation, quantitative und qualitative Bestimmung von membrangebundenen Rezeptoren sowie zytoplasmatischen Effektorproteinen (EGF-R, pEGF-R, VEGF-R, pVEGF-R, Akt, pAkt, MAPK, pMAPK) und die Auswirkung von Gefitinib und Vandetanib auf den Rezeptorstatus.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Inwieweit beeinflusst die simultane Stimulation der Zellen mit EGF die Proliferation, VEGF-Sekretion und den Rezeptorstatus von EGF-R, VEGF-R, Akt und MAPK? Welchen Einfluss hat dies auf die Wirksamkeit von ZD1839 und ZD6474?
- Gibt es Wirksamkeitsunterschiede der getesteten Substanzen auf die verschiedenen Zelllinien?
- Lässt sich durch die Kombinationstherapie eines EGF-R-Inhibitors mit einem VEGF-R-Inhibitor ein additiver oder gar synergistischer Effekt auf die Hemmung der Zellproliferation erzielen? Kann es durch die Kombinationstherapie auch zu antagonistischen Effekten kommen?
- Lässt sich durch die Kombinationstherapie eines EGF-R-Inhibitors mit einem VEGF-R-Inhibitor ein additiver oder gar synergistischer Effekt auf die Hemmung der VEGF-Sekretion erzielen? Kann es durch die Kombinationstherapie auch zu antagonistischen Effekten kommen?
- Inwieweit ändert sich die Expression membrangebundener Rezeptoren durch ZD1839 und ZD6474? Werden nachgeschaltete, zytoplasmatische Signalwege beeinflusst?

Mit Hilfe der in vitro-Versuche verfolgt die vorliegende Studie das Ziel, die Voraussetzungen für eine Evaluation der gefundenen Ergebnisse in einem in vivo-Modell zu schaffen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. *Verwendete Zellen*

Untersucht wurden etablierte Zelllinien von Schilddrüsenkarzinomen unterschiedlicher Differenzierungsgrade. Für die anaplastischen Schilddrüsenkarzinome standen die Hth74 und der aggressivere Subklon C643 zur Verfügung (Heldin und Westermark, 1991). Für die papillären Karzinome wurde die Zelllinie TPC-1 verwendet (Ishizaka et al., 1990) und für die follikulären Karzinome die FTC-133 (Hoelting et al., 1994) untersucht. Die Zellen wurden in der eigenen Tumorzellbank vorgehalten und bis zur Kultivierung in flüssigem Stickstoff bei -196°C cryokonserviert.

2.1.2. *Zellkultur*

DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine	Biochrom AG, Deutschland
DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w stable Glutamine	Biochrom AG, Deutschland
Fetales Rinderserum, FCS	PAA Laboratories, Österreich
Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Acetat	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Haemacytometer Deckgläser 20x26mm	Plan Optik, Deutschland
Hydrocortison	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Plan Optik, Deutschland
PBS-Dulbecco w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10000U / 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Biochrom AG, Deutschland
Rinderinsulin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Somatostatin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Trypanblau 0,1%	Apotheke der Philipps Universität
Trypsin/EDTA, 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom AG, Deutschland
Zellkulturflaschen, Cellstar 175 cm^2 und 75 cm^2	Greiner Bio-One, Deutschland

Ansatz 1 Liter H5-Medium (10xStock): 50ml Aliquots bei -20°C aufbewahren

1000ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w stable Glutamine

10µl Glycyl-L-histidyl-L-lysin-Acetat

10µl Hydrocortison

50mg Transferrin

100µg Somatostatin

100mg Rinderinsulin

H5-Medium für Analysen zur VEGF-Sekretion und Stimulationsversuche:

450ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w stable Glutamine

50ml H5-Medium (10xStock)

5ml Penicillin/Streptomycin 10000U/10000µg/ml

FCS 10% (FGM):

450ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine

50ml Fetales Rinderserum, FCS

5ml Penicillin/Streptomycin 10000U/10000µg/ml

FCS 2%:

490ml DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine

10ml Fetales Rinderserum, FCS

5ml Penicillin/Streptomycin 10000U/10000µg/ml

2.1.3. Substanzen und Chemikalien

Acrylamid/Bis, rotiphorese GEL30	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Amersham ECL Western Blocking Analysis	GE Healthcare, UK
Aprotinin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Ammoniumpersulfat [(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈]	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
BSA, Rinderserumalbumin RIA, für WB	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
BSA, Rinderserumalbumin für ELISA	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
β-Mercaptoethanol (C ₂ H ₆ OS)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Bromphenolblau	Roth GmbH & Co KG, Deutschland

Di-Natriumhydrogenphosphat-2-Hydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck KGaA, Deutschland
Natrium-di-hydrogenphosphat-2-Hydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck KGaA, Deutschland
Natrium-di-hydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck KGaA, Deutschland
DMSO [$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$]	Wak Chemie medical, Deutschland
EGF, rekombinant aus E. coli	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Riedel-de Haen GmbH, Deutschland
Glycerin, wasserfrei ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Glycin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)	Acros Organics, U.S.A.
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Methanol (CH_3OH)	Riedel-de Haen GmbH, Deutschland
MTT-Reagenz	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Deutschland
Natriumazid, reinst (NaN_3)	Merck KGaA, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Natriumdesoxycholat ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Nonidet P40	Roche Diagnostics, Deutschland
Orthovanadate	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
PMSF	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Prestained Protein Marker, Broad Range	BioLabs, U.S.A.
Saccharose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	Merck KGaA, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Deutschland
SDS ultra pure ($\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
Schwefelsäure, konzentriert (H_2SO_4)	Merck KGaA, Deutschland
TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{N}_2$)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
TRIS-Base ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	Roth GmbH & Co KG, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Deutschland
Gefitinib-ZD1839 (Iressa [®])	Astra Zeneca, UK
Vandetanib-ZD6474 (Zactima [®])	Astra Zeneca, UK

2.1.4. Kits und Antikörper

2.1.4.1. Kits

ELISA-human VEGF DuoSet DY293B R&D Systems U.S.A.

Im Set enthalten:

Capture Antibody (maus anti-humanes VEGF)

Detection Antibody (biotinyliert Ziegen anti-humanes VEGF)

Standard (rekombinantes humanes VEGF)

Streptavidin-HRP

Substrat Lösung DY999 R&D Systems U.S.A.

Im Set enthalten:

Farbreagenz A: H₂O₂

Farbreagenz B: Tetramethylbenzidin

BCATM Protein Assay Kit Pierce, U.S.A.

Im Set enthalten:

BCATM Reagent A: bestehend aus einem Gemisch von Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1M Natriumhydroxid

BCATM Reagent B: bestehend aus 4% Kupfersulfat

Albuminstandard, BSA

2.1.4.2. Antikörper

Antikörper	Firma	Bezeichnung	Quelle	Bestell-Nr.
t-VEGF-R2	Santa Cruz	Flk-1 (Q20)	Ziege, pAk (IgG)	Sc-19530
p-VEGF-R2	Abcam	phospho Y1054	Kaninchen, pAk	ab5472
t-EGF-R	Cell Signaling	EGF-R	Kaninchen, pAk	2232
p-EGF-R	Cell Signaling	1H12 (Tyr1068)	Maus, mAk	2236
t-Akt	Cell Signaling	Akt	Kaninchen, pAk	9272
p-Akt	Cell Signaling	Phosphor Akt (Ser473)	Kaninchen, pAk	9271
t-MAPK	Cell Signaling	p44/42-MAPK	Kaninchen, pAk	9102
p-MAPK	Cell Signaling	phospho p44/42-MAPK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen, pAk	9101
β-Actin	Sigma-Aldrich	clone AC-74	Maus, mAk	A2228

Antikörper	Firma	Konfiguration	Quelle	Bestell-Nr.
Anti-Ziege	DakoCytomation	HRP konjugiert	Kaninchen, pAk	P0449
Anti-Kaninchen	DakoCytomation	HRP konjugiert	Ziege, pAk	P0448
Anti-Maus	DakoCytomation	HRP konjugiert	Ziege, pAk	P0447

2.1.5. Puffer und Lösungen

2.1.5.1. Puffer und Lösungen für ELISA

10 x PBS (steril filtriert)	137mM NaCl 2,7mM KCl 8,1mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O 1,5mM KH ₂ PO ₄ pH-Wert 7,2 bis 7,4
1 x PBS	10 x PBS 1:10 mit Aqua bidest verdünnt
Waschpuffer 0,05%	0,05% Tween 20 in 1 x PBS pH-Wert 7,2 bis 7,4
Blockpuffer	1% BSA 5% Saccharose 0,05% Natriumazid

Reagent Diluent (steril filtriert)	1% BSA in 1 x PBS pH-Wert 7,2 bis 7,4
Substrat Lösung	1:1 Gemisch aus Lösung A und B
Stopp Lösung	2N H ₂ SO ₄

2.1.5.2. *Puffer und Lösungen für Proteinchemie*

PBS für RIPA-Puffer	9,1mM Na ₂ HPO ₄ 1,7mM NaH ₂ PO ₄ 150mM NaCl pH-Wert auf 7,4 mit NaOH einstellen
RIPA-Puffer	PBS 1% Nonidet P40 0,5% Natriumdesoxycholat 0,1% SDS
10% SDS	SDS ultra pure 1:10 in Aqua bidest
25% APS	APS in Aqua bidest lösen
2 x Probenpuffer	1ml Glycerin 0,5ml β-Mercaptoethanol 3ml 10% SDS 1,25ml 1M Tris-HCl pH 6,7 1,5ml Bromphenolblau
10 x Laufpuffer pH 8,3	30g Tris base 144g Glycin 10g SDS ultra pure
1 x Laufpuffer pH 8,3	10 x Laufpuffer 1:10 mit Aqua bidest
10 x Transferpuffer pH 9	58,2g Tris base 29,3g Glycin
1 x Transferpuffer pH 9	10 x Transferpuffer 1:10 mit Aqua bidest verdünnt. Zu 1 Liter 1 x Transferpuffer wurden 3,75ml 10% SDS hinzugefügt.
10 x TBS	12g Tris base 87,6g NaCl pH-Wert auf 8 mit HCl einstellen
1 x TBS	10 x TBS 1:10 mit Aqua bidest verdünnt
TTBS 0,05%	10 x TBS 1:10 mit Aqua bidest verdünnt 0,05% Tween 20

Stripping Puffer	7,01ml β -Mercaptoethanol 20g SDS (2%) 62,5ml 1M Tris HCl pH 6,7 1000ml Aqua bidest
-------------------------	--

2.1.5.3. Lösungen für MTT-Assay

MTT-Reagenz	PBS 1 mg/ml MTT-Reagenz steril filtriert, lichtgeschützt
Stopplösung	85 ml Isopropanol 15 ml SDS 20% 0,4 ml 10M HCL

2.1.6. Geräte und Einwegmaterial

Abdeckfolien, Plate Sealers	Corning Inc., U.S.A.
Analysenwaage Explorer T2914	Ohaus, Schweiz
Diverse Glasbehälter	Schott Duran GmbH, Deutschland
Elektrophoresekammer, Glasplatten	BioRad, U.S.A.
ELISA Reader, Emax precision	Molecular Devices, U.S.A.
Filterpapier, Extra Thick 7,5x10cm	BioRad, U.S.A.
Filmkassette, Ortho Regular Curix screens	AGFA, Deutschland
Film-Entwicklermaschine Optimax	Protec GmbH, Deutschland
Inkubator Typ: B5061 EK-CO2	Heraeus, Deutschland
Kühlzentrifuge, Centrifuge 5415R	Eppendorf GmbH, Deutschland
Loading Tips, Aerosol Resistant Tips	Molecular Bio-Products, U.S.A.
Membranfilter 0,22 μ m Durapore	Millipore, U.S.A.
Mikroskop Typ: 020-505.030	Wild Leitz GmbH, Portugal
Mikroskop, Nikon TMS 302052	Nikon, Japan
Mikrotiterplatten 96-Well Polystyrol Costar	Corning Inc., U.S.A.
Nitrocellulosemembran, Hybond ECL	Amersham Biosciences, Deutschland
Parafilm	Pechiney Plastic Packing, U.S.A.
pH-Meter Typ: 1121001 WinLab	Windaus Labortechnik, Deutschland
Pipetten, handbetrieben verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Deutschland
Pipetten, akkubetrieben accujet pro	Brand, Deutschland
Pipettenspitzen bis 1000 μ l	Eppendorf AG, Deutschland

Pipettenspitzen 2ml bis 20ml für accujet pro Power Pac 200	Greiner bio-one, Deutschland BioRad, U.S.A.
Probenröhrchen 10ml	Greiner Labortechnik, Deutschland
Rotationsrüttler 4020	Köttermann, Deutschland
Rührmagnet Typ: 50310	Heidolph, Deutschland
Röntgenfilm, Kodak BioMax MR Film 13x18cm	Kodak, U.S.A.
SemiDry TransferCell, Trans-Blot SD	BioRad, U.S.A.
Standardpetrischalen 92x16mm	Sarstedt AG & Co, Deutschland
Tischzentrifuge, Minifuge T	Heraeus, Deutschland
Tischzentrifuge, Function Line Labofuge 400R	Heraeus, Deutschland
Tischzentrifuge, Biofuge T	Heraeus, Deutschland
Ultraschallbad, Sonorex RK 100	Bandelin electronic, Deutschland
Vortexer, MS1 Minishaker	IKA Works Inc., U.S.A.
Work Bench, Hera Safe Typ: HS12	Heraeus, Deutschland
Wasserbad Typ: 1002 GFL	GFL mbH, Deutschland
Waage Typ: 2254	Sartorius AG, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, Cellstar 50ml	Greiner bio-one, Deutschland
Zentrifugenröhrchen, Cellstar 15ml	Greiner bio-one, Deutschland
24-Well-Platten, Costar Cell Culture Cluster	Corning Inc., U.S.A.
96-Well-Platten, Costar Cell Culture Cluster	Corning Inc., U.S.A.
50ml Reagenzien Reservoir, Costar	Corning Inc., U.S.A.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen zellkulturellen Methoden wurden, falls nicht gesondert erwähnt, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Alle verwendeten Zelllinien wurden in FGM (DMEM/HAM'S F-12 (1:1), w/o L-Glutamine mit 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach dem Waschen mit PBS für kurze Zeit mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen des Trypsinisierungsvorgangs wurde der Zellkultur FGM-Medium zugeführt, anschließend die Zellsuspension in einem Zentrifugenröhrchen

aufgenommen und bei 1000 Upm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde abgesaugt, das Pellet mit Medium resuspendiert und je nach Größe des Pellets 1:2 oder 1:3 verdünnt und in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

2.2.2. Versuche zur Zellproliferation

2.2.2.1. Versuchsaufbau und Durchführung

Für alle vier Zelllinien wurde der Einfluss von Gefitinib-ZD1839, Vandetanib-ZD6474 und deren Kombination auf die Zellzahl untersucht. Im Folgenden wird dies als Zellproliferation bezeichnet. Die jeweiligen Experimente wurden mit und ohne gleichzeitige EGF-Stimulation angesetzt. In den einzelnen Experimenten wurden jeweils Dreifachbestimmungen vorgenommen und jedes Experiment dreimal wiederholt. Jede Versuchsreihe erstreckte sich über insgesamt acht Tage. Es wurden sieben verschiedene Endkonzentrationen bei den Einzelsubstanzen Gefitinib-ZD1839 und Vandetanib-ZD6474 getestet: 0,1µM; 1µM; 2µM; 4µM; 6µM; 8µM und 10µM. Bei den Kombinationsversuchen mit Gefitinib-ZD1839/Vandetanib-ZD6474 wurden vier verschiedene Endkonzentrationen getestet: für Gefitinib-ZD1839 6µM und 8µM, für Vandetanib-ZD6474 2µM und 5µM. Als Kombination Gefitinib-ZD1839/Vandetanib-ZD6474 wurden eingesetzt: 6µM/2µM sowie 8µM/5µM. Die EGF-Stimulation erfolgte mit einer Endkonzentration von 20 ng/ml.

- **Durchführung:**

A: Aussaat der Zellen

Trypsin/EDTA, Nährmedium FGM und PBS wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Nährmedium wurde zunächst aus der Zellkulturflasche abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 20ml PBS gewaschen. Das Ablösen der Zellen erfolgte wie bereits unter 2.2.1. beschrieben. Zu 900µl einer 0,1% Trypanblau-Lsg. wurden 100µl des resuspendierten Zellpellet zugegeben und in einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl ermittelt (Zellzahl x 10⁵/ml). Es folgte die Berechnung der benötigten Menge an Zellsuspension, um jedes Well mit 10⁴ Zellen zu bestücken. Um möglichst optimale

Wachstumsbedingungen zu schaffen, erfolgte die Aussaat in FGM-Medium mit anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C.

B: Nullwertmessung und Aufbringen der Konditionen

Am zweiten Tag erfolgte die erste kolorimetrische Messung (Nullwertmessung) mittels MTT-Assay wie unter 2.2.2.3. beschrieben.

Unmittelbar vor Auftragen der Konditionen wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen anschließend mit 200µl PBS gewaschen, um restliches Medium und Zelldetritus möglichst vollständig zu entfernen. Das PBS wurde wieder abgesaugt und durch 100µl FCS 2% bzw. 100µl FCS 2% + EGF ersetzt. Die einzelnen Konditionen wurden aus den jeweiligen Stocklösungen (EGF = 10µg/ml, Gefitinib-ZD1839 = 20mM und Vandetanib-ZD6474 = 10mM) der Substanzen hergestellt. Als Kontrolle diente DMSO in einer Endkonzentration von 4µM und 10µM bei den Einzelsubstanzexperimenten sowie 5µM bei den Kombinationsversuchen. Es erfolgte das Aufbringen der verschiedenen Konditionen und Inkubation für 24 Stunden bei 37°C.

C: MTT-Assay nach 24, 96 und 144 Stunden Inkubation

Die erste kolorimetrische Messung erfolgte 24 Stunden nach Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen Gefitinib-ZD1839 und Vandetanib-ZD6474 bzw. deren Kombination. Hierzu wurde ein MTT-Assay durchgeführt und die photometrische Messung mittels ELISA Reader vorgenommen (zur Durchführung siehe 2.2.2.3.). Nach 96 Stunden wurde äquivalent verfahren und ein Mediumwechsel der „144-Stunden Platte“ durchgeführt. Hierbei wurden die neu angesetzten Konditionen in das jeweilige Well pipettiert und die Platte für weitere 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Am achten Tag nach Aussaat der Zellen erfolgte die letzte kolorimetrische Auswertung mittels MTT-Assay.

2.2.2.2. Prinzip des MTT-Assay

Mit dem MTT-Assay ist eine kolorimetrische Messung lebender Zellen aufgrund ihrer Stoffwechselaktivität in Relation zur Zellzahl möglich. Der MTT-Assay wurde erstmals 1983 von Mosmann beschrieben (Mosmann, 1983). MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid] wird in lebenden Zellen aktiv

aufgenommen und über die mitochondriale NADH-abhängige Succinatdehydrogenase zu blauen Formazan-Kristallen reduziert. Die großen Formazan-Kristalle sind für die Zellmembran impermeabel und akkumulieren so in lebenden Zellen. Mit Hilfe eines Detergens (hier Isopropanol) werden die Formazan-Kristalle solubilisiert, bzw. die Zellen lysiert und der Metabolisierungsprozess von MTT zu Formazan unterbrochen. Das gelöste Formazan kann nun mit einem Spectrophotometer (ELISA Reader) gemessen werden, wobei die Absorption direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen ist.

2.2.2.3. Durchführung des MTT-Assay

Um den Zellrasen nicht zu beschädigen, wurde das Nährmedium mit einer Mehrkanalpipette vorsichtig abgezogen. Nach dem Waschvorgang mit PBS (100µl/Well) wurden die Zellen mit 100µl MTT-Reagenz je Well versetzt und anschließend für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das MTT-Reagenz vorsichtig abgesaugt und durch 150µl frisch angesetzte Stopp-Lösung (siehe 2.1.5.3.) pro Well ersetzt. Der Ansatz wurde anschließend noch einmal für etwa 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde die Platte für etwa 30 Sekunden in ein Ultraschallbad gegeben um eine möglichst vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Das Ausmaß der Formazanbildung wurde durch photometrische Messung im ELISA Reader bei 570/630nm bestimmt.

2.2.3. Analysen zur VEGF-Sekretion

2.2.3.1. Versuchsaufbau und Durchführung

Analog den Experimenten zur Zellproliferation wurde für alle vier Zelllinien der Einfluss von Gefitinib-ZD1839, Vandetanib-ZD6474 und deren Kombination auf die VEGF-Sekretion mit und ohne EGF-Stimulation untersucht. Auch hier wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und jedes Experiment dreimal wiederholt. Insgesamt wurden vier verschiedene Endkonzentrationen bei den Einzelsubstanzen Gefitinib-ZD1839 und Vandetanib-ZD6474 getestet: 0,1µM; 1µM; 2µM und 5µM. Bei den Kombinationsversuchen wurden zwei verschiedene Endkonzentrationen getestet: für Gefitinib-ZD1839 einzeln 2µM, für Vandetanib-ZD6474 einzeln 3µM und in

Kombination Gefitinib-ZD1839/Vandetanib-ZD6474 mit 2 μ M/3 μ M. Die EGF-Stimulation erfolgte mit einer Endkonzentration von 10ng/ml.

- **Durchführung:**

A: Aussaat der Zellen

Das Aussäen der Zellen erfolgte wie bereits unter 2.2.2.1. ausführlich beschrieben (Durchführung, A: Aussaat der Zellen). Je Well wurden 10⁵ Zellen ausgesät. Die errechnete Menge an Zellsuspension wurde in 30ml FGM-Medium aufgenommen und pro Well jeweils 1000 μ l der Zellsuspension in eine 24-Well-Platte pipettiert.

B: Mediumwechsel von FGM auf H5-Medium und Pipettieren der Konditionen

Zunächst wurde das FGM-Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 1000 μ l PBS gewaschen. Das PBS wurde sofort wieder abgesaugt und durch H5-Mangelmedium ersetzt. Am dritten Versuchstag erfolgte die Inkubation der Zellen mit den entsprechenden Konditionen. Unmittelbar vor dem Auftragen der Konditionen wurde das H5-Medium abgesaugt und der Zellrasen kurz mit 1000 μ l PBS gewaschen. Das PBS wurde dann durch 900 μ l FCS 2% bzw. 800 μ l FCS 2% + 100 μ l FCS 2% + EGF ersetzt. Als Kontrolle diente DMSO in einer Endkonzentration von 5 μ M bei den Einzelsubstanz- und den Kombinationsversuchen. Nach Befüllen der 24-Well-Platte erfolgte die Inkubation für 48 Stunden bei 37°C.

C: MTT-Assay und Einfrieren der Proben

Nach erfolgter Inkubation wurde der Kulturüberstand als konditioniertes Medium (CM) gewonnen. Dazu wurde das Medium abpipettiert, in Eppendorf-Cups überführt und anschließend in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge für 15 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in frische Eppendorf-Cups überführt und bei -20°C bis zur weiteren Analyse (dazu Kapitel 2.2.3.3. Durchführung des ELISA) eingefroren. Parallel dazu erfolgte die Durchführung eines MTT-Assays wie unter 2.2.2.3. beschrieben. Hierbei wurden je Well 1000 μ l MTT-Lösung und 1000 μ l Stopplösung verwendet. Um Doppelbestimmungen durchführen zu können, wurden 250 μ l pro Well in eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die so kolorimetrisch bestimmte Zellzahl pro Well wurde dann in Relation zur gemessenen VEGF-Menge gesetzt.

2.2.3.2. Prinzip des Enzyme Linked Immunosorbent Assay

Engvall und Perlmann beschrieben 1972 erstmalig den ELISA (Engvall und Perlmann, 1972). Ein ELISA ist die Durchführung einer Immunreaktion (Antigen-Antikörper-Reaktion) an einer Festphase, gekoppelt mit einer spezifischen Enzymreaktion (hier Streptavidin-HRP). Dabei kann ein Antigen (hier VEGF) nicht nur nachgewiesen, sondern auch quantifiziert werden. Als Festphase werden polystyrolbeschichtete Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet.

Grundsätzlich lässt sich zwischen einem direkten und indirekten (Sandwich-ELISA) ELISA unterscheiden. Bei dem direkten ELISA binden Antigene durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen an die Polystyroloberfläche der Mikrotiterplatte. Nach Blockieren freier Bindungsstellen auf der Polystyroloberfläche mittels BSA erfolgt im nächsten Schritt die Zugabe eines spezifischen Antikörpers. Dies führt zur Bindung von Antigenen, welche nun mittels einer Enzymreaktion und durch Zugabe von Substrat (Farbreaktion) nachgewiesen und photometrisch gemessen werden können. Durch Hinzuziehen einer Standardkurve (Standard-Lösung mit bekannter Antigenkonzentration) kann das gesuchte Antigen (hier VEGF) quantifiziert werden. Neben diesem direkten ELISA kann der Test auch als Sandwich-ELISA indirekt durchgeführt werden. Dabei wird die Platte zuerst mit einem spezifischen Antikörper belegt (Capture Antibody). Nach Zugabe und Bindung des Antigens kann die Detektion mit einem zweiten spezifischen Antikörper (Detection Antibody) erfolgen. Der weitere Ablauf unterscheidet sich nicht von dem des direkten ELISA. Die indirekte Methode ist insbesondere für solche Antigene sinnvoll, welche nur sehr schlecht an die Polystyroloberfläche binden. In dieser Arbeit wurde der Sandwich-ELISA durchgeführt, wobei das VEGF DuoSet von R&D Systems U.S.A. Verwendung fand. Nachfolgend wird der Sandwich-ELISA beschrieben:

- (1) Beschichtung der Mikrotiterplatte mit einem monoklonalen Antikörper (Maus) gegen humanes VEGF (Capture Antibody).
- (2) Freie Bindungsstellen auf der Mikrotiterplatte (d.h. nicht durch Capture Antibody besetzte Stellen) werden durch Blockpuffer abgesättigt.
- (3) Proben und Standard-Lösung werden aufgetragen: humanes VEGF bindet an den oberflächengebundenen Antikörper.

- (4) Ein biotinylierter polyklonaler Antikörper (Ziege) gegen humanes VEGF wird hinzugegeben (Detection Antibody). Dadurch bildet sich ein „Sandwich“ zwischen VEGF und den Antikörpern aus.
- (5) Zugabe von mit Meerrettich-Peroxidase (HRP = **H**orse**R**adish **P**eroxidase) konjugiertem Streptavidin. Dieses bindet an die biotinylierte Seite des Detection Antibody.
- (6) Zugabe von Substratlösung: $\text{H}_2\text{O}_2 + 3,3',5,5'$ -Tetramethylbenzidin (Chromogen) bindet an die Peroxidase. Das Substrat wird enzymatisch umgewandelt und es entsteht ein blau-violetter, löslicher Farbstoff. Die Intensität der Farblösung ist proportional zu der VEGF-Menge.
- (7) Die Reaktionskinetik wird durch Schwefelsäure gestoppt und es erfolgt die Messung der Absorption bei 450/570nm Wellenlänge. Anhand der Standardkurve wird die gemessene Absorption quantifiziert.

2.2.3.3. Durchführung des ELISA

- **Präparation der Mikrotiterplatten:**

A: Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Primärantikörper (Capture Antibody)

Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit dem Primärantikörper erfolgte in einer Konzentration von $1\mu\text{g/ml}$, aufgenommen in sterilfiltriertem 1xPBS. In jede Vertiefung wurden $100\mu\text{l}$ Antikörperlösung pipettiert. Anschließend wurde die Platte sofort mit einer Abdeckfolie verschlossen und bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgezogen.

B: Waschen

Nachdem die Antikörperlösung abgezogen wurde erfolgte ein dreimaliges Waschen der Mikrotiterplatten mit $400\mu\text{l}$ Waschpuffer pro Well, um nicht gebundene Antikörper bzw. in nachfolgenden Schritten benutzten Blockpuffer, Standardlösung und Proben, Sekundärantikörper sowie Streptavidin-HRP zu entfernen.

C: Blocken

Zum Absättigen freier Bindungsstellen der Polystyroloberfläche wurden pro Well 300µl des Blockpuffers pipettiert. Die Platten wurden unmittelbar danach mit einer Abdeckfolie verschlossen und der Ansatz bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Blockpuffer wieder abgesaugt und die Platten wie unter B beschrieben gewaschen.

- **Durchführung des Assays:**

D: Standard und Proben auftragen

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe für den Standard hergestellt. Die Ausgangskonzentration der Standardlösung betrug 4000pg/ml und wurde durch 1:2-Verdünnungen mit Reagent Diluent auf 31,25pg/ml gebracht. Die zu untersuchenden Proben wurden im Vortexer kurz gemischt und anschließend jeweils 100µl Standard bzw. Probe in die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten aufgetragen. Zur Bestimmung der Leerwerte wurden in die jeweiligen Vertiefungen alle verwendeten Substanzen mit Ausnahme der Proben und Standards aufgetragen. Der Ansatz wurde mit Abdeckfolie verschlossen und bei Raumtemperatur über zwei Stunden inkubiert. Vor dem nächsten Arbeitsschritt wurde die Platte erneut, wie unter B beschrieben, gewaschen.

E: Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Detection Antibody)

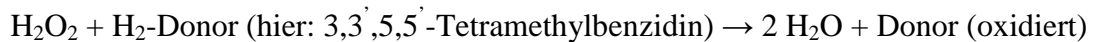
Der biotinylierte polyklonale (Ziegen) Antikörper gegen humanes VEGF wurde in einer Konzentration von 50ng/ml eingesetzt, aufgenommen in sterilfiltriertem Reagent Diluent. Pro Well wurden 100µl Antikörperlösung eingesetzt, die Platte mit einer Folie abgedeckt und über zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor dem nächsten Arbeitsschritt wurde die Platte, wie unter B beschrieben, gewaschen.

F: Auftragen und Inkubation des Peroxidase-Konjugats

Mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin wurde vor Gebrauch in Reagent Diluent 1:200 verdünnt und bis zur Verwendung lichtgeschützt aufbewahrt. Pro Well wurden 100µl Streptavidin-HRP-Lösung pipettiert, der Ansatz mit Abdeckfolie und Alufolie lichtgeschützt verschlossen und dann für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte dann der letzte Waschgang wie unter B beschrieben.

G: Enzymatische Farbreaktion, photometrische Messung

Für die enzymatische Farbreaktion wurden die beiden Komponenten des Substrat Solution Kits unmittelbar vor Gebrauch in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Pro Well wurden 100µl der Lösung eingesetzt, mit Abdeckfolie und Alufolie lichtgeschützt verschlossen und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte im Rahmen der enzymatischen Reaktion die Katalyse folgender Reaktion:



Der Peroxidase wird H_2O_2 als Substrat angeboten, so dass die nun frei werdenden Protonen das farblose Chromogen (Tetramethylbenzidin) zu einem blau-violetten Endprodukt unter Bildung von H_2O oxidieren.

Die Reaktionskinetik wurde durch Zugabe von 2N Schwefelsäure abgestoppt, hierbei bildete sich ein stabiler gelber Farbkomplex. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 450/570nm gemessen, wobei die gemessene Absorption direkt proportional zu der VEGF-Menge der jeweiligen Probe ist. Die gemessene VEGF-Menge (pg/ml) wurde dann in Relation zu der bereits durch den MTT-Assay ermittelten Zellzahl gesetzt.

2.2.4. Proteinchemische Methoden

- **Versuchsaufbau:**

Analysiert wurden die genannten vier Schilddrüsenkarzinomzelllinien (Hth74, C643, FTC-133, TPC-1). Zunächst wurden Stimulationsversuche mit jeder Zelllinie durchgeführt, ein Zellysate gewonnen und aus diesem die Proteine mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden dann auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Per Immunoblotting wurden dann die einzelnen membrangebundenen und zytoplasmatischen Proteine identifiziert und qualifiziert.

2.2.4.1. Stimulationsversuche für Western Blot-Analysen

Für die Stimulationsversuche der Schilddrüsenkarzinomzellen wurde zunächst die jeweilige Zelllinie passagiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Aussaat von 2 bis 3×10^6 Zellen in FGM-Medium mit nachfolgender Inkubation über 24 Stunden. Am nächsten Tag wurde FGM durch H5-Mangelmedium ersetzt und der Ansatz für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach insgesamt 48 Stunden Inkubation erfolgte der Stimulationsversuch mit Gefitinib-ZD1839 bzw. Vandetanib-ZD6474 und EGF. Fünf Ansätze wurden mit aufsteigenden Endkonzentrationen von Gefitinib-ZD1839 bzw. Vandetanib-ZD6474 inkubiert (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM). Ein Ansatz wurde nur mit H5 inkubiert, ein weiterer mit H5 + EGF (Endkonzentration für EGF = 40 ng/ml) und als Kontrolle diente ein dritter Ansatz mit H5 + EGF und DMSO (Endkonzentration für DMSO = 5µM). Das alte Medium wurde zunächst abgesaugt und durch frisches H5-Medium ersetzt. Zu sechs der acht Ansätze wurde dann jeweils 600µl DMSO, Gefitinib-ZD1839 bzw. Vandetanib-ZD6474 pipettiert und alle Ansätze wurden dann für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Mit Ausnahme des nur mit H5-Medium inkubierten Ansatzes erfolgte anschließend die fünfzehnminütige Aktivierung mit 300µl EGF.

2.2.4.2. Herstellung des Zelllysates

Nach Stimulation der Zellen mit EGF erfolgte die Herstellung des Zelllysates. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS (w/o Ca^{2+} , Mg^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst und zum Abstoppen des Trypsinvorganges in 12ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann in 15ml Greiner-Röhrchen pipettiert und bei 1500 Upm für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Zentrifugats vorsichtig abgesaugt und das Pellet umgehend auf Eis gelegt. Je nach Größe des Pellets wurde dieses mit 10 bis 40µl RIPA-Puffer + Proteaseinhibitoren versetzt.

1ml RIPA:

10µl PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)
30µl Aprotinin
10µl Othovanadate

Das Zentrifugat (Pellet) wurde anschließend mithilfe einer 200µl-Pipette suspendiert, mit 1µl PMSF versetzt und die Ansätze anschließend für 60 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde die Suspension in 1ml Eppendorf-Cups überführt und diese bei 4°C in der Kühlzentrifuge für 20 Minuten bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde als Lysat abpipettiert und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

2.2.4.3. BCA-Protein Assay

Die BCA-Reaktion (Bicinchoninsäure = 2,2'-Bichinolin-4,4'-dicarbonsäure) kommt bei der quantitativen kolorimetrischen Bestimmung von Proteinen zum Einsatz. Hierbei reagieren zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) quantitativ mit Proteinen zu einwertigen Kupferionen (Cu^+). Dabei entsteht ein Komplex aus Kupferionen und Protein (Biuret-Reaktion). Die einwertigen Kupferionen bilden mit Bicinchoninsäure einen violetten Farbkomplex aus, der photometrisch gemessen werden kann.

In dieser Arbeit wurde das BCA-Protein Assay Kit der Firma Pierce verwendet, welches aus Reagenz A (BCA), Reagenz B (Kupferlösung) und einem Proteinstandard besteht. Aus Lösung A und B wurde in einem Verhältnis von 50:1 ein Reagenzgemisch angesetzt. In einer 96-Well Mikrotiterplatte wurde für die Proteinstandardreihe und die zu messenden Proben (Zelllysate) jeweils 200µl Reagenzgemisch vorgelegt. Die Proteinstandardreihe wurde durch Verdünnen der Stocklösung mit RIPA-Puffer hergestellt und bestand aus vier verschiedenen Konzentrationen (0,5mg/ml, 1mg/ml, 1,5mg/ml, und 2mg/ml). Zu 200µl Reagenzgemisch wurden 10µl je Standard und 2,5µl je Probe (Verdünnungsfaktor 4) hinzupipettiert und anschließend die Ansätze gut gemischt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes gegen die Standardkurve im Spektralphotometer (Emax; Molecular Devices) bei 570nm.

2.2.4.4. Western Blot

2.2.4.4.1. Prinzip der Western Blot-Analyse

Der Western Blot ist eine Methode, bei der in einer Trägermatrix (in der Regel ein Polyacrylamid-Gel) elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf eine geeignete Membran (hier: Nitrocellulose) übertragen werden. Die Übertragung ist das eigentliche „blotting“. Beim Blotting wird eine identische Kopie des Gels erzeugt, indem ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld die Proteine auf die Membran transferiert und dort immobilisiert. Die Bindung der Proteinmoleküle an Nitrocellulose erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Mit Hilfe des Western Blots lassen sich so spezifische Antigene durch mono- bzw. polyklonale Antikörper eindeutig identifizieren. Synonym findet sich daher in der Literatur häufig auch der Begriff Immunoblot (Burnette, 1981). Bevor die mittels Blottingtechnik hergestellten Membranen mit Antikörpern inkubiert werden können (Nachweisreaktion), müssen sie unter Verwendung eines Blockierungsreagenz vorbehandelt werden. Das Blockieren dient der Absättigung überschüssiger Bindungsstellen auf der Membran, um so eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern. Bei den hier durchgeführten Proteinblots wurde eine in Maleinsäure gepufferte 10%ige Casein-Lösung verwendet (Western Blocking Reagent, Roche). Im nächsten Schritt kann nun die Nachweisreaktion erfolgen, bei der die Membran zunächst mit dem Primär- und dann mit dem Sekundärantikörper inkubiert wird. Der Primärantikörper bindet direkt an die transferierten Proteine. Der Sekundärantikörper ist gegen konstante Bereiche des Primärantikörpers gerichtet und konjugiert mit einem Enzym, einem Radionuklid oder Fluoreszenzfarbstoff, worüber die Bindung sichtbar gemacht wird. Die Bindung des Sekundärantikörpers verstärkt das Primärantikörpersignal, da mehr als ein Sekundärantikörper an den Primärantikörper binden kann. Zur direkten Visualisierung des geblotteten Proteins muss der Sekundärantikörper entweder mit einem Radionuklid oder Fluoreszenzfarbstoff versehen werden. Zur indirekten Visualisierung muss der Sekundärantikörper mit einem Enzym konjugiert werden, welches ein weiteres Substrat benötigt. In dieser Arbeit wurde ein enzymkonjugierter Sekundärantikörper verwendet, an den ein Substrat (Amersham ECL; GE Healthcare, UK) gebunden wurde, das durch enzymatische Umwandlung Licht emittiert (Chemilumineszenz). Dieser Effekt wird zur

Belichtung eines Röntgenfilms genutzt und ermöglicht so den optischen Nachweis der Proteine auf der Membran.

2.2.4.4.2. Durchführung der SDS-Gelelektrophorese

A: Gelherstellung

Zunächst wurden alle verwendeten Glasplatten, Abstandshalter und Kämmen mit Ethanol gereinigt. Um möglichst homogene Gele zu erhalten, wurden die einzelnen Komponenten bei der Gelherstellung nach jedem Schritt vermischt.

	Trenngel 7,5%	Sammelgel 4%
Aqua bidest	4,9 ml	6,1ml
Acrylamid/Bis	2,5ml	1,3ml
Trenngelpuffer (1,5M Tris, pH 8,8)	2,5ml	--
Sammelgelpuffer (0,5M Tris, pH 6,8)	--	2,5ml
SDS 10%	0,1ml	0,1ml
<i>Polymerisation:</i>		
25% APS (Ammoniumpersulfat)	50µl	50µl
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	5µl	10µl

Die Oberkante der Trenngele wurde zum Schutz vor Austrocknung mit Aqua bidest beschichtet. Nach Polymerisation der Trenngele wurden die Sammelgele gegossen und passende Kämmen eingesetzt. Nach Polymerisation der Sammelgele (etwa 45 Minuten) wurden die Kämmen vorsichtig entfernt, die Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Running-Buffer (500ml) aufgefüllt.

B: Proben vorbereiten, Elektrophorese

Die bei -80°C gelagerten Lysate wurden langsam auf Eis aufgetaut und anschließend Probenvolumen für 50µg Protein in Eppendorf-Cups pipettiert. Das Probenvolumen wurde mit Aqua bidest auf 10µl aufgefüllt, danach wurden pro Cup 10µl 2 x Sample Buffer hinzupipettiert. Anschließend wurden alle Proben einschließlich des Proteinmarkers für drei Minuten bei 95°C denaturiert. In die Kammern des Sammelgels wurden schließlich mittels Loading Tips 20µl Probe aufgetragen, wobei die beiden äußeren Kammern jeweils mit Proteinmarker versehen wurden. Zunächst wurde eine

Spannung von 85V an die Elektrophoreseapparatur angelegt bis die Proteine das Trenngel erreichten (sichtbar am Sample Buffer). Anschließend wurde die Spannung auf 115V erhöht bis der Sample Buffer das untere Ende des Gels erreichte (etwa eine Stunde).

C: Western Blot (Semi-Dry-Blot)

Vier Filterkartons und zwei 9 x 7cm große Nitrocellulosemembranen wurden für 30 Minuten in frisch angesetzter Transferpufferlösung äquilibriert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entfernt, die beiden Gelphasen getrennt und anschließend das Trenngel für etwa 10 Minuten in der Transferpufferlösung äquilibriert. Nachdem die Elektrodenplatten der Blotting Apparatur mit Aqua bidest gleichmäßig benetzt wurden, erfolgte der Zusammenbau des Semi-Dry-Blots. Auf einem Filterkarton wurde die Nitrocellulosemembran aufgelegt, dann folgte das Gel und den Abschluss bildete wiederum ein Filterkarton. Nach jeder Lage wurden entstandene Luftblasen mit einem angefeuchteten Glasstab vorsichtig aus dem Sandwich entfernt und dann die Kammer geschlossen. Zunächst wurde eine Spannung von 10V über 20 Minuten angelegt, gefolgt von einer Spannung von 15V über weitere 20 Minuten. Nach dem Blotten erfolgte zunächst ein kurzer Waschgang der Nitrocellulosemembran in PBS, dann wurden gemäß der jeweiligen Molekulargewichte der zu identifizierenden Proteine Streifen aus der Membran geschnitten.

<u>Protein</u>	<u>Molekulargewicht [kDa]</u>
t-VEGF-R2	150/200
p-VEGF-R2	200
t-EGF-R, p-EGF-R	170
t-Akt, p-Akt	60
t-MAPK, p-MAPK	42/44
β-Actin	42

Anschließend wurden die zugeschnittenen Streifen in 1,5% Blockierungsreagenz (TBS + Western Blocking Reagent, Roche Diagnostics) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.4.4.3. Nachweisreaktion/Immunoblot

A: Bindung des Primärantikörpers

Nachdem durch ein Blockierungsreagenz unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt wurden und anschließend die Membranstreifen kurz in TBS gespült wurden, konnte die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgen. Antikörper der Firma Cell Signaling wurden in 5% BSA-Lösung (TTBS + BSA) verdünnt. Die Inkubation erfolgte auf einem Rotationsschüttler bei 4°C über Nacht. Die Antikörper der Firmen Santa Cruz, Abcam und Sigma wurden in 1,5% WB-Reagenz (TTBS + WB) gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

<u>Protein</u>	<u>Verdünnung</u>
t-VEGF-R2	1:200
p-VEGF-R2	1:1000
t-EGF-R	1:1000
p-EGF-R	1:500
t-Akt	1:750
p-Akt	1:750
t-MAPK	1:750
p-MAPK	1:750
β-Actin	1:3000

Nach Bindung der Primärantikörper wurden die Membranstreifen dreimal für fünf Minuten in frisch angesetzter 0,05% Tween + TBS-Lösung gewaschen.

B: Bindung des Sekundärantikörpers

Nach dem letzten Waschgang mit 0,05% TTBS-Lösung erfolgte die Inkubation der Membranstreifen mit den Sekundärantikörpern über 40 Minuten bei Raumtemperatur. Hierzu wurden die Membranstreifen auf einer eben austarierten Oberfläche platziert und dann mit Antikörperlösung benetzt. Alle Sekundärantikörper wurden in einer 1,5% WB-Reagenz-Lösung (TTBS + WB) 1:2000 verdünnt. Nach Bindung der Sekundärantikörper wurden die Membranstreifen dreimal für fünf Minuten in frisch

angesetzter 0,05% Tween + TBS-Lösung und anschließend zweimal für fünf Minuten in TBS gewaschen.

C: Detektion

Die gewaschenen Membranstreifen wurden nun für eine Minute mit einem 1:1 Gemisch von Reagenz 1 und 2 des Amersham ECL Westernblotting Detection Kit (GE Healthcare, UK) inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zwischen Filterpapier getrocknet. Die Membranstreifen wurden dann durch eine Plastikfolie geschützt in einer Filmkassette mit Klebestreifen fixiert. Im Dunkelraum wurde nun ein Röntgenfilm eingelegt, der zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten durch die Membran belichtet wurde. Anschließend erfolgte die Filmentwicklung im Optimax (Protec GmbH, Deutschland).

2.2.4.4.4. Western Blot-Stripping

Die Entfernung der Primär- und Sekundärantikörper nach Durchführung des Immunoblots war bei den Membranen erforderlich, an denen aufgrund eines ähnlichen Molekulargewichtes von β -Actin und MAPK keine β -Actin Färbung durchgeführt werden konnte. Hierzu wurde Stripping Puffer (siehe 2.1.5.2.) im Wasserbad auf 50°C erwärmt und mit der Membran unter leichtem Schütteln für 30 Minuten inkubiert. Nach drei Waschgängen der Membran in TBS konnte schließlich die β -Actin Färbung wie unter 2.2.4.4.3. beschrieben erfolgen.

2.2.5. Statistik

Für die statistische Auswertung und die graphische Darstellung wurden Microsoft Excel[®] und SPSS 15.0 verwendet. Mittelwert und Standardabweichung wurden für alle Messpunkte der Zellversuche bestimmt. Mittels Kolmogorov-Smirnov-Test (K-S-Test) wurden die Daten auf Normalverteilung untersucht und dann paarweise Mittelwertvergleiche durchgeführt.

Falls eine Normalverteilung der Daten vorliegt, stellt der T-Test für paarige Stichproben den optimalen Test dar. Eine Logarithmierung der Daten führt im Allgemeinen zu einer noch besseren Annäherung an die Normalverteilung. In Messreihen bei denen der Wert Null vorkommt, für den man bekanntlicherweise keinen Logarithmus bilden kann, wurden die Werte nicht verändert. Auf diese Weise wurde ein einheitliches Vorgehen gewährleistet. Da in den Versuchsreihen zur VEGF-Sekretion der Zelllinie Hth74 keine Normalverteilung vorliegt, wurde auf den T-Test verzichtet. Entsprechend wurde die nichtparametrische Variante (Wilcoxon-Test) durchgeführt und in der Folge für alle VEGF-Experimente verwendet. Der Wilcoxon-Test hat weniger Power als der T-Test, kann aber auch bei nicht normalverteilten Daten verwendet werden.

Wegen des explorativen Charakters der Untersuchung wurde keine alpha-Korrektur für multiples Testen durchgeführt. Es werden nominale p-Werte angegeben.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

- keine Signifikanz (kS) entspricht $p > 0,05$
- signifikant (*) entspricht $p < 0,05$
- sehr signifikant (**) entspricht $p < 0,01$
- höchst signifikant (***) entspricht $p < 0,001$

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse zur Proliferation

3.1.1. *Effekt von EGF auf die Proliferation*

Der Einfluss von ZD1839 und ZD6474 auf die Zellproliferation verschiedener Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms wurde mit und ohne gleichzeitige EGF-Stimulation untersucht (siehe 2.2.2.1.). In Abbildung 3.1 ist die Wirkung von EGF auf die Zellproliferation dargestellt. Sowohl bei den anaplastischen Karzinomen, als auch bei der follikulären Zelllinie führte eine zusätzliche Stimulation mit EGF zu einer geringfügigen Reduktion der Zellproliferation und zwar um 11,8% bei C643 ($p = 0,22$) sowie um 8% bei Hth74 ($p = 0,26$) und um 4,9% bei FTC-133 ($p = 0,26$). Bei der papillären Variante TPC-1 führte eine simultane Stimulation mit EGF zu einer Zunahme der Zellproliferation um 8,9% ($p = 0,1$). Alle Ergebnisse liegen im Streubereich der jeweiligen Standardabweichungen und weisen keine statistische Signifikanz auf. Ein Effekt von EGF (Endkonzentration 20ng/ml) auf die Zellproliferation konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht nachgewiesen werden.

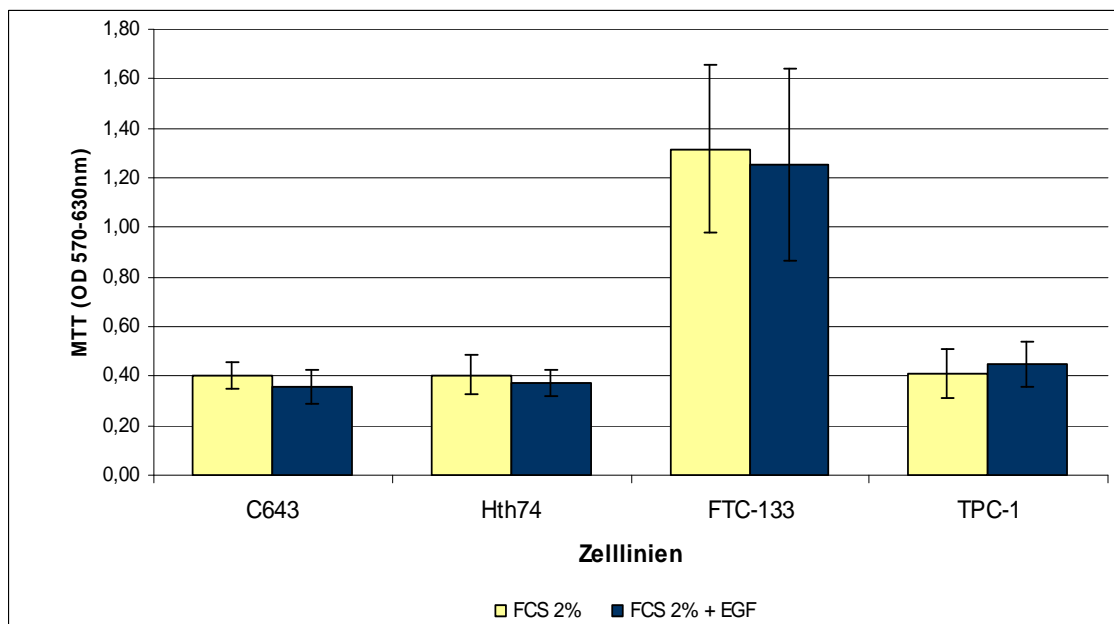


Abb. 3.1: Effekt von EGF auf die Zellproliferation nach 144 Stunden

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung am Endpunktmesswert nach 144 Stunden Inkubationszeit. FCS2%: dient als „Nullwert“ unbehandelter Zellen. FCS2% + EGF: mit EGF (20ng/ml) stimulierte Zellen.

3.1.2. Einfluss von ZD1839 auf die Proliferation

Die Versuchsreihen zur Zellproliferation erstreckten sich über insgesamt 144 Stunden. Kolorimetrische Messungen zur Bestimmung der Zellzahl wurden nach 24, 96 und 144 Stunden durchgeführt. Dabei konnte für alle Zelllinien eine zeit- und dosisabhängige Reduktion der Zellzahl unter ZD1839-Einwirkung nachgewiesen werden. In der nachfolgenden Abbildung wird dies exemplarisch anhand der Zelllinie Hth74 demonstriert.

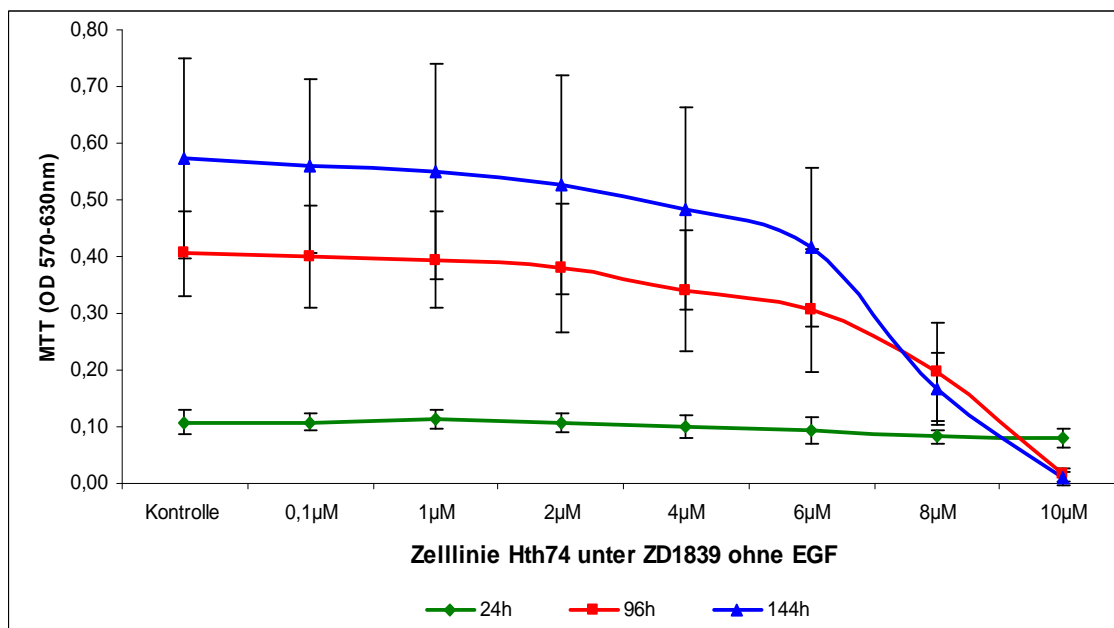


Abb. 3.2: Zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion der Zelllinie Hth74 unter ZD1839 in Abwesenheit von EGF

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Messwerte nach 24, 96 und 144 Stunden Inkubation mit ZD1839 in Abwesenheit von EGF als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt ist die Zelllinie Hth74, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

Die nachstehenden Erläuterungen beziehen sich auf die Endpunktmesswerte nach 144 Stunden. Dies gilt auch für die ermittelten IC₅₀-Werte.

Bei den anaplastischen Zelllinien C643 und Hth74 sowie der papillären Variante TPC-1 zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl. Die ermittelten IC₅₀-Werte betragen bei der Zelllinie TPC-1 6,80µM, bei Hth74 7,05µM und bei C643 7,95µM. Auch die folliculäre Zelllinie FTC-133 zeigte eine dosisabhängige Zellzahlreduktion, jedoch ließ sich hier eine zweiphasige Dosis-Wirkungskurve beobachten. So zeigte sich

ein erneuter Anstieg der Zellzahl bei einer Dosis zwischen $6\mu\text{M}$ und $8\mu\text{M}$, während die maximale Zellzahlreduktion von 48% bereits bei $4\mu\text{M}$ erreicht wurde.

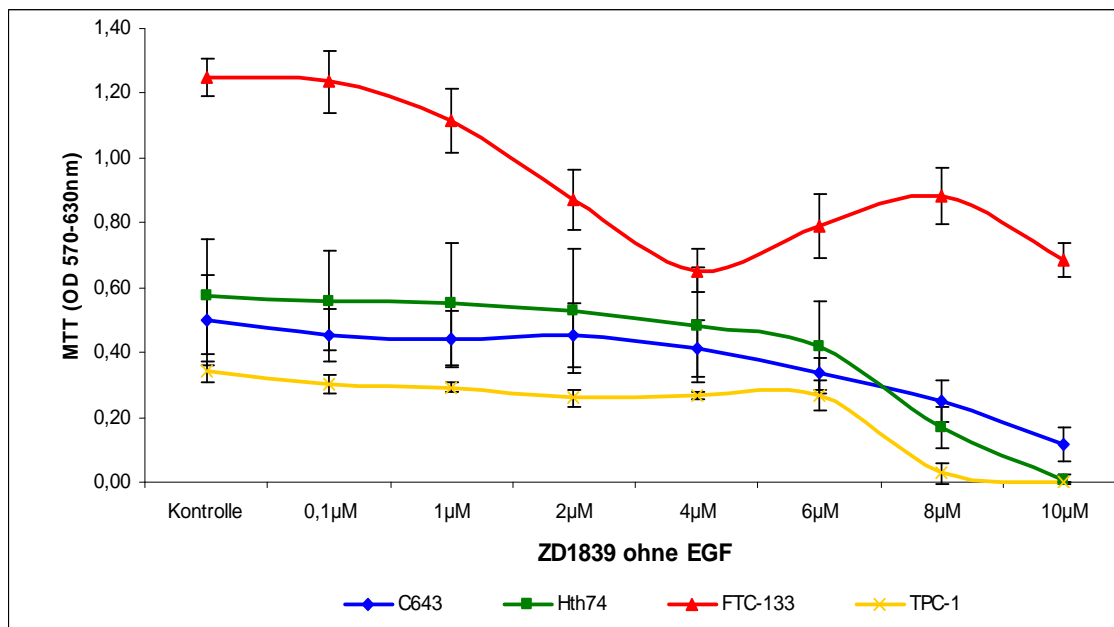


Abb. 3.3: Effekt von ZD1839 in Abwesenheit von EGF auf die Zellproliferation nach 144 Stunden

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Endpunktmesswerte nach 144 Stunden Inkubation mit ZD1839 in Abwesenheit von EGF als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt sind die Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

Analog zu den unstimulierten Versuchsreihen zeigten die mit EGF stimulierten Zellen ebenfalls eine dosisabhängige Reduktion der Zellzahl (ohne Abbildung). Die mit EGF stimulierte Zelllinie C643 wies im Vergleich zu unstimulierten Zellen allerdings ein durchweg schlechteres Ansprechen auf ZD1839 auf. Im Mittel lag die Zellzahlreduktion um 7,2% niedriger und die halbmaximale Zellzahlreduktion wurde erst bei einer Konzentration von $8,51\mu\text{M}$ ZD1839 erreicht (ohne EGF $7,95\mu\text{M}$). Die Zelllinien Hth74 und TPC-1 zeigten in beiden Versuchsreihen nahezu gleiche Ansprechraten auf ZD1839. Die IC50-Werte unter EGF-Stimulation betragen für Hth74-Zellen $6,95\mu\text{M}$ und für TPC-1-Zellen $6,79\mu\text{M}$. Die folliculäre Variante FTC-133 zeigte ebenso wie in der Versuchsreihe ohne EGF-Stimulation einen zweiphasigen Kurvenverlauf mit erneutem Zellzahlanstieg zwischen $6\mu\text{M}$ und $8\mu\text{M}$ und einer maximalen Zellzahlreduktion um 43% bei $10\mu\text{M}$ ZD1839.

Zwecks besserer Übersicht und nominaler Vergleichbarkeit sind in Tabelle 3.1 die jeweiligen prozentualen Zellzahlreduktionen von unstimulierten und stimulierten Zellen abgebildet. Des Weiteren sind die jeweiligen Signifikanzniveaus angegeben.

Zelllinie und prozentuale Reduktion der Zellzahl								
	C643		Hth74		FTC-133		TPC-1	
ZD1839	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF
0,1µM	9,6 ^{kS}	1,4 ^{kS}	2,1 ^{kS}	24,2 [*]	1,1 ^{kS}	3,6 ^{kS}	11,2 ^{***}	12,3 ^{***}
1µM	12,1 [*]	4 ^{kS}	3,9 [*]	0,8 ^{kS}	10,8 ^{**}	23,3 ^{***}	14,1 ^{***}	27,9 ^{***}
2µM	10,2 ^{kS}	6,3 ^{kS}	7,9 [*]	6,4 ^{kS}	30,3 ^{***}	27,9 ^{***}	23,9 ^{***}	33,5 ^{***}
4µM	17,8 [*]	6,3 ^{kS}	15,3 ^{**}	16,6 [*]	47,9 ^{***}	33 ^{***}	21 ^{***}	35,9 ^{***}
6µM	33,2 ^{**}	22,9 [*]	27,2 ^{**}	26,3 ^{**}	36,6 ^{***}	27,3 ^{***}	21,9 ^{**}	30,7 ^{***}
8µM	50,4 ^{***}	40,2 ^{**}	70,8 ^{***}	76,3 ^{**}	29,1 ^{***}	26,5 ^{***}	92 ^{***}	79,9 ^{***}
10µM	76,4 ^{***}	77,9 ^{***}	98,5 ^{***}	98,9 ^{***}	45,1 ^{***}	43,2 ^{***}	100 ^{***}	100 ^{***}

Tab. 3.1: Prozentuale Reduktion der Zellzahl unter ZD1839 ±EGF nach 144 Stunden

Angegeben ist die prozentuale Reduktion der Zellzahl unter steigender Dosis von ZD1839 (0,1µM bis 10µM) der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1 in Ab- und Anwesenheit von EGF (±EGF) am Endpunktmesswert von 144 Stunden. Die Werte unterhalb von ±EGF geben ausgehend vom Kontrollwert die Zellzahlreduktion (%) im Verhältnis zur steigenden Konzentration von ZD1839 an. Die jeweiligen Signifikanzniveaus sind mit kS oder * gekennzeichnet (kS = keine Signifikanz, * = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant).

3.1.3. Einfluss von ZD6474 auf die Proliferation

Analog den Versuchen zu ZD1839 zeigten sich sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von EGF in allen untersuchten Zelllinien dosisabhängige Zellzahlreduktionen. Abbildung 3.4 stellt exemplarisch die zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion anhand der Zelllinie C643 dar.

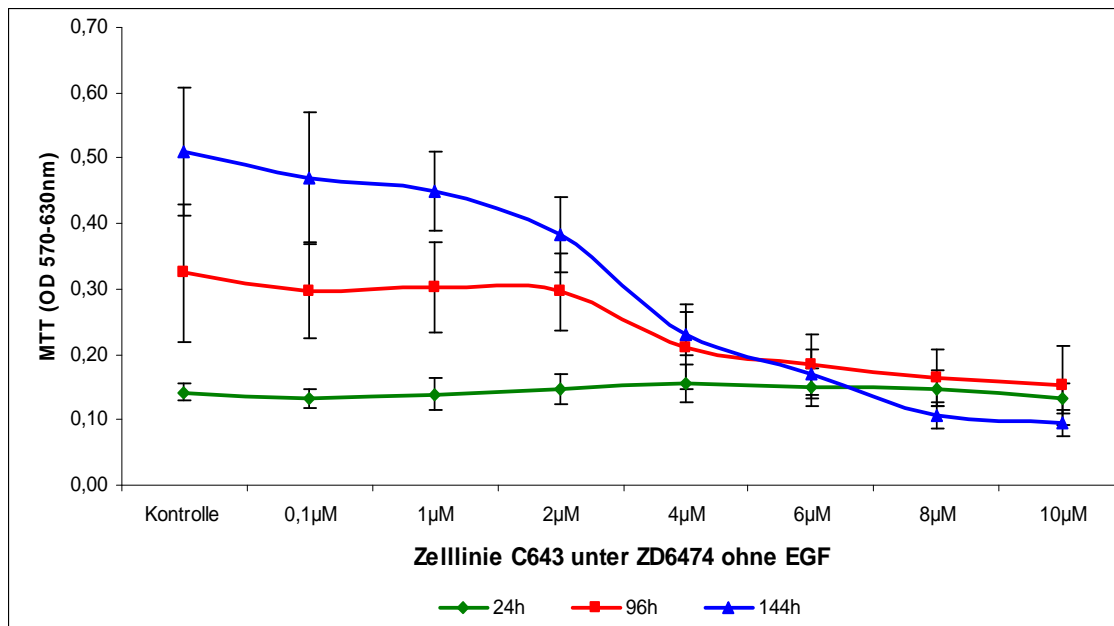


Abb. 3.4: Zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion der Zelllinie C643 unter ZD6474 in Abwesenheit von EGF

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Messwerte nach 24, 96 und 144 Stunden Inkubation mit ZD6474 in Abwesenheit von EGF als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt ist die Zelllinie C643, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

Bei allen Zelllinien konnte insgesamt eine hohe Ansprechrate der Zellzahl auf ZD6474 beobachtet werden. Unter gleichzeitiger Stimulation mit EGF zeigten alle Zelllinien eine geringere Zellzahlreduktion (siehe Tabelle 3.2), was sich auch aus den deutlich höheren IC₅₀-Werten ableiten lässt. Die ermittelten IC₅₀-Werte für ZD6474 betragen bei der Zelllinie C643 3,69µM ohne EGF und 5,50µM mit EGF, bei Hth74 4,61µM ohne EGF und 5,36µM mit EGF. Um bei den differenzierten Karzinomzelllinien eine Reduktion der Zellzahl um 50% unter gleichzeitiger EGF-Stimulation zu erreichen, musste die Konzentration von ZD6474 verdoppelt werden. So betrug die IC₅₀ bei der Zelllinie TPC-1 ohne EGF 0,62µM, mit EGF 1,37µM. Bei der Zelllinie FTC-133 betrug die IC₅₀ ohne EGF 1,93µM und 4,06µM mit EGF. Abbildung 3.5 zeigt exemplarisch

den Effekt von ZD6474 ohne EGF-Stimulation. Tabelle 3.2 gibt die jeweiligen prozentualen Zellzahlreduktionen von unstimulierten und stimulierten Zellen wieder. Des Weiteren sind die jeweiligen Signifikanzniveaus angegeben

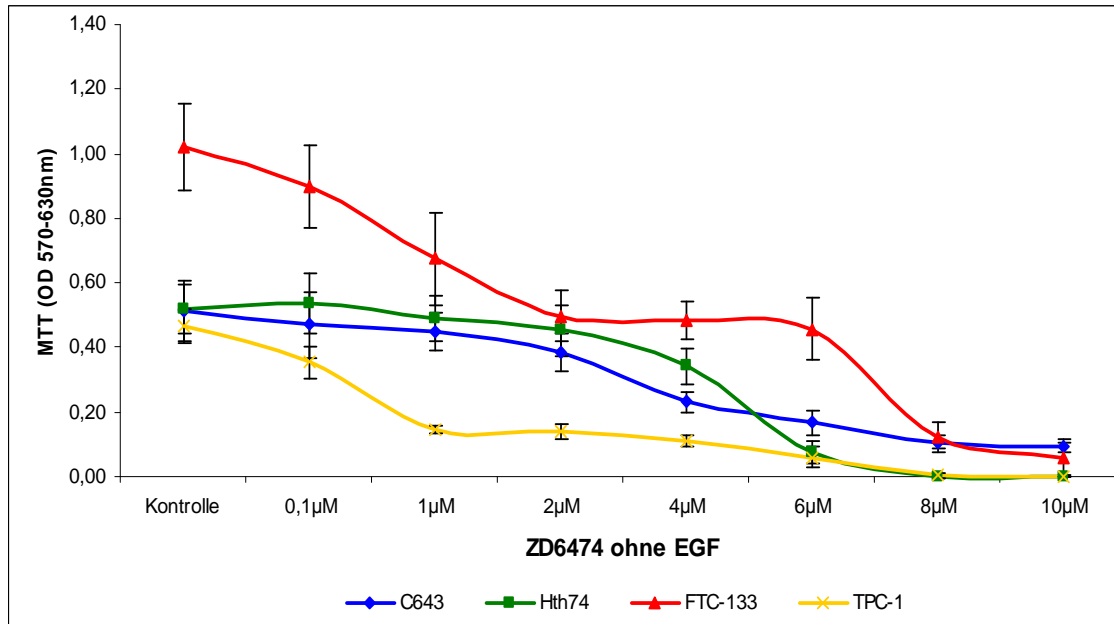


Abb. 3.5: Effekt von ZD6474 in Abwesenheit von EGF auf die Zellproliferation nach 144 Stunden

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Endpunktmesswerte nach 144 Stunden Inkubation mit ZD6474 in Abwesenheit von EGF als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt sind die Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

Zelllinie und prozentuale Reduktion der Zellzahl									
		C643		Hth74		FTC-133		TPC-1	
ZD6474	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	
0,1µM	8 ^{kS}	7,1 [*]	+3 ^{kS}	+2,9 ^{kS}	12,1 ^{**}	3,7 ^{kS}	24,2 ^{***}	4,8 [*]	
1µM	12,2 ^{kS}	4,1 ^{kS}	6,2 ^{kS}	+28,9 ^{**}	33,9 ^{***}	26,8 ^{**}	68,8 ^{***}	39 ^{***}	
2µM	25 [*]	9,5 [*]	12,9 [*]	+28,2 [*]	51,2 ^{***}	37,3 ^{**}	69,9 ^{***}	69,2 ^{***}	
4µM	54,6 ^{***}	39,6 ^{***}	34,4 ^{***}	4,9 ^{kS}	52,6 ^{***}	48,8 ^{***}	76,4 ^{***}	67,2 ^{***}	
6µM	66,9 ^{***}	53,4 ^{***}	85,6 ^{***}	71 ^{***}	55,2 ^{***}	55,9 ^{**}	87 ^{***}	83 ^{***}	
8µM	79 ^{***}	68 ^{***}	100 ^{***}	99,8 ^{***}	87,9 ^{***}	86,5 ^{***}	99 ^{***}	99,4 ^{***}	
10µM	81,3 ^{***}	76,3 ^{***}	100 ^{***}	100 ^{***}	94,5 ^{***}	95,2 ^{***}	100 ^{***}	100 ^{***}	

Tab. 3.2: Prozentuale Reduktion der Zellzahl unter ZD6474 ±EGF nach 144 Stunden

Angegeben ist die prozentuale Reduktion der Zellzahl unter steigender Dosis von ZD6474 (0,1µM bis 10µM) der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1 in Ab- und Anwesenheit von EGF (±EGF) am Endpunktmesswert von 144 Stunden. Die Werte unterhalb von ±EGF geben ausgehend vom Kontrollwert die Zellzahlreduktion (%), bzw. bei einem Pluszeichen (+) die Zellzahlzunahme (%) im Verhältnis zur steigenden Konzentration von ZD6474 an. Die jeweiligen Signifikanzniveaus sind mit kS oder * gekennzeichnet (kS = keine Signifikanz, * = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant).

3.1.4. Einfluss der Kombinationsbehandlung auf die Proliferation

Ausgehend von den Einzelsubstanzversuchen wurden bei den Kombinationsversuchen Konzentrationen eingesetzt, die den gemittelten IC50 Werten für ZD1839 und ZD6474 entsprachen.

Alle vier Zelllinien zeigten in den Kombinationsversuchen eine höhere Zellzahlreduktion im Vergleich zu den Einzelsubstanzversuchen. So konnten bei den anaplastischen Zelllinien sowohl in den höheren als auch in den niedrigeren Konzentrationsbereichen additive Effekte beobachtet werden. Die im Folgenden genannten prozentual höheren Zellzahlreduktionen beziehen sich hierbei nicht auf die Kontrollwerte, sondern stehen in direktem Bezug zu der Zellzahlreduktion in den Einzelsubstanzversuchen. Die Zelllinie C643 zeigte dabei im Bereich der niedrigen Konzentrationen (6 μ M ZD1839 und 2 μ M ZD6474) eine um 40,2% höhere Zellzahlreduktion in Abwesenheit von EGF und eine um 57,2% höhere Zellzahlreduktion in Anwesenheit von EGF. Dabei erreichte die Kombination von 6 μ M ZD1839 und 2 μ M ZD6474 im Vergleich zu der äquimolaren Lösung von 8 μ M ZD1839 eine wesentlich stärkere Inhibition der Zellzahlreduktion (siehe Abbildung 3.6). Im Bereich der hohen Konzentrationen (8 μ M ZD1839 und 5 μ M ZD6474) konnte in Abwesenheit von EGF eine um 39,4% und in Anwesenheit von EGF um 58,1% höhere Zellzahlreduktion beobachtet werden. Bei der Zelllinie Hth74 ließ sich in den niedrigen Konzentrationsbereichen eine um 66,4% höhere Zellzahlreduktion in Abwesenheit von EGF und eine um 78,1% höhere Zellzahlreduktion in Anwesenheit von EGF verzeichnen. Auch hier zeigte die zu 8 μ M ZD1839 äquimolare Lösung eine um 20,9% bzw. 32,5% (\pm EGF) höhere Zellzahlreduktion. In den hohen Konzentrationsbereichen lagen die Werte entsprechend bei 34,6% bzw. 56,1% (\pm EGF).

Bei der Zelllinie FTC-133 konnten lediglich in den hohen Konzentrationsbereichen additive Effekte beobachtet werden, wohingegen die Kombination niedriger Konzentrationen nur geringe synergistische Effekte aufwies. Die Ergebnisse der Zelllinie TPC-1 sind als nicht verwertbar anzusehen, da sich hier eine vollständige Hemmung der Zellproliferation in den hohen Konzentrationsbereichen zeigte. Die in den Einzelsubstanzversuchen ermittelten IC50-Werte für ZD1839 und ZD6474 wurden kumulativ deutlich überstiegen, so dass am ehesten von einem zytotoxischen Effekt ausgegangen werden muss. Hierzu wurden jedoch keine gesonderten Untersuchungen durchgeführt (z.B. Zytotoxizitäts-Assay).

Abbildung 3.6 stellt exemplarisch den Einfluss der untersuchten Substanzen auf die Proliferation der anaplastischen Zelllinien C643 und Hth74 in Abwesenheit von EGF dar.

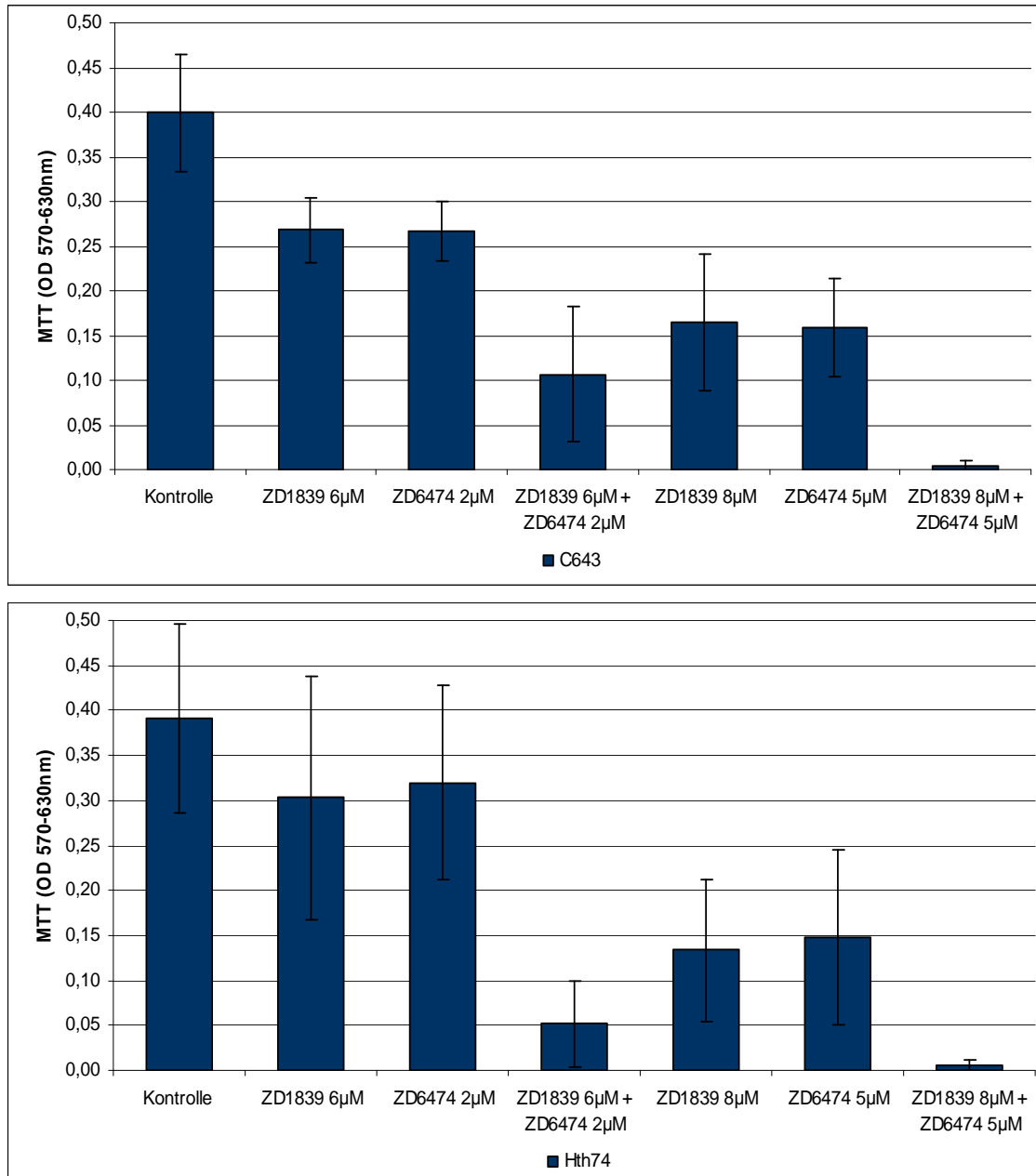


Abb. 3.6: Effekt von ZD1839 und ZD6474 sowie deren Kombination auf unstimulierte C643 (obere Grafik) und Hth74-Zellen (untere Grafik) nach 144 Stunden

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay: Mittelwert aus 3 Versuchsreihen mit jeweils Dreifachbestimmungen. Abgebildet sind Endpunktmesswerte nach 144 Stunden Inkubation mit ZD1839 und ZD6474 sowie deren Kombination in Abwesenheit von EGF als Mittelwerte optischer Dichtewerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt sind die Zelllinien C643 und Hth74, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) behandelte Zellen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle Zelllinien sowohl unter ZD1839 als auch unter ZD6474 eine zeit- und dosisabhängige Zellzahlreduktion aufwiesen. Der Effekt von ZD1839 war weitgehend unabhängig von der Ab- bzw. Anwesenheit von EGF. Im Gegensatz dazu war der Effekt von ZD6474 in Anwesenheit von EGF deutlich geringer ausgeprägt. Dies spiegelt sich in unterschiedlichen IC₅₀-Werten wider (siehe Tabelle 3.3). Insgesamt wiesen alle Zelllinien eine höhere Sensitivität gegenüber ZD6474 auf. Als Besonderheit konnte bei FTC-133 eine zweiphasige Dosiswirkungskurve unter Inkubation mit ZD1839 beobachtet werden.

Die Kombination von ZD1839 und ZD6474 führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer gesteigerten Inhibition der Zellproliferation. Hierbei zeigte die zu 8µM ZD1839 äquimolare Lösung von ZD1839 (6µM) und ZD6474 (2µM) in der Kombination einen durchweg stärkeren Effekt auf die Zellzahlreduktion. Die höhere Sensitivität gegenüber simultaner EGF- und VEGF-Inhibition zeigten hierbei die anaplastischen Zelllinien.

	mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀)			
	ZD1839 -EGF	ZD1839 +EGF	ZD6474 -EGF	ZD6474 +EGF
C643	7,95µM	8,51µM	3,69µM	5,50µM
Hth74	7,05µM	6,95µM	4,61µM	5,36µM
FTC-133	∅	∅	1,93µM	4,06µM
TPC-1	6,80µM	6,79µM	0,62µM	1,37µM

Tab. 3.3: Zelllinienabhängige IC₅₀-Werte unter Inkubation mit ZD1839 bzw. ZD6474 in Ab- und Anwesenheit von EGF (±EGF)

3.2. Ergebnisse zur VEGF-Sekretion

3.2.1. Effekt von EGF auf die VEGF-Sekretion

Analog zu den Zellproliferationsversuchen wurde der Einfluss von ZD1839 und ZD6474 auf die VEGF-Sekretion verschiedener Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms (siehe 2.2.3.) mit und ohne gleichzeitige EGF-Stimulation untersucht. Abbildung 3.7 zeigt die Wirkung von EGF auf die VEGF-Sekretion. Bei allen Zelllinien führte die Stimulation der Zellen mit EGF zu einer Steigerung der VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl. Eine signifikante Zunahme zeigte die anaplastische Zelllinie Hth74, die basal nur minimale Mengen an VEGF produzierte, unter EGF-Stimulation jedoch einen Anstieg um 729% verzeichnete ($p = 0,01$). Ebenso konnte bei der folliculären Zelllinie FTC-133 eine signifikante Zunahme der VEGF-Sekretion um 72,9% ($p = 0,002$) beobachtet werden. Die Zelllinien C643 und TPC-1 zeigten unter Stimulation mit EGF eine erhöhte VEGF-Sekretion von bis zu 5,9% bzw. 7,3%, welche allerdings ohne statistische Relevanz war ($p = 0,79$ bzw. $p = 0,45$).

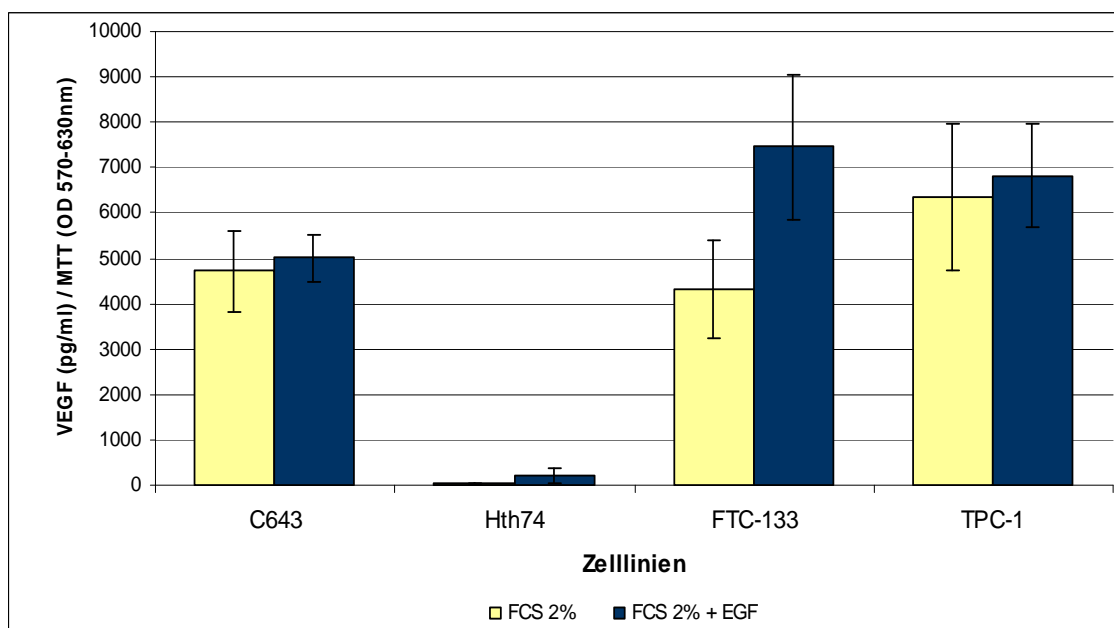


Abb. 3.7: Effekt von EGF auf die VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit und Bestimmung der VEGF-Menge im Mediumüberstand mittels ELISA. Abgebildet sind VEGF-Werte in Relation zur Zellzahl [VEGF (pg/ml) / MTT (OD 570-630nm)]. FCS2%: dient als „Nullwert“ un behandelter Zellen. FCS2% + EGF: mit EGF stimulierte Zellen.

3.2.2. Beeinflussung der VEGF-Sekretion durch den TKI ZD1839

Eine dosisabhängige Reduktion der basalen und EGF-induzierten VEGF-Sekretion konnte nur bei der Zelllinie TPC-1 erreicht werden, wobei eine Reduktion der VEGF-Sekretion um 50% nicht erreicht wurde. Die EGF-induzierte VEGF-Sekretion konnte bei allen Zelllinien durch ZD1839 inhibiert werden. Die VEGF-Sekretion der Zelllinie Hth74 konnte bereits mit $0,1\mu\text{M}$ ZD1839 um 33% reduziert werden. Die ermittelte IC₅₀ betrug $0,33\mu\text{M}$. Bereits Konzentrationen von $1\mu\text{M}$ und höher bewirkten hier eine vollständige Hemmung der VEGF-Sekretion (siehe Abbildung 3.8). Bei den Zelllinien C643 und FTC-133 konnte eine signifikante Reduktion der VEGF-Sekretion nur in den höheren Konzentrationsbereichen von ZD1839 erreicht werden. Die prozentuale Reduktion lag hier zwischen 22% und 38%.

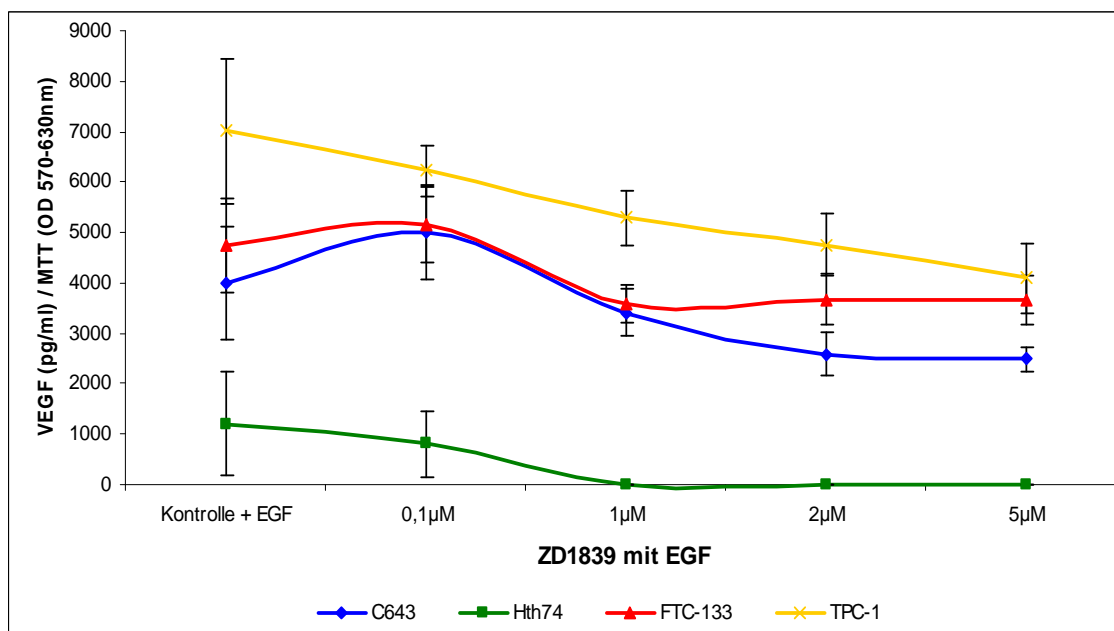


Abb. 3.8: Effekt von ZD1839 auf die EGF-induzierte VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit und Bestimmung der VEGF-Menge im Mediumüberstand mittels ELISA. Berechnung der Relation von VEGF zur Zellzahl. Abgebildet sind VEGF-Werte in Relation zur Zellzahl (pg/ml) nach Inkubation mit ZD1839 in Anwesenheit von EGF als Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt sind die Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) und EGF behandelte Zellen.

Abbildung 3.9 zeigt die dosisabhängige VEGF-Reduktion in Ab- und Anwesenheit von EGF. Eine Reduktion auf Werte (VEGF pg/ml) unterhalb der basalen VEGF-Spiegel (gelbe Balken) wurde nicht erreicht, jedoch konnte die EGF-induzierte Mehrsekretion von VEGF vollständig aufgehoben werden.

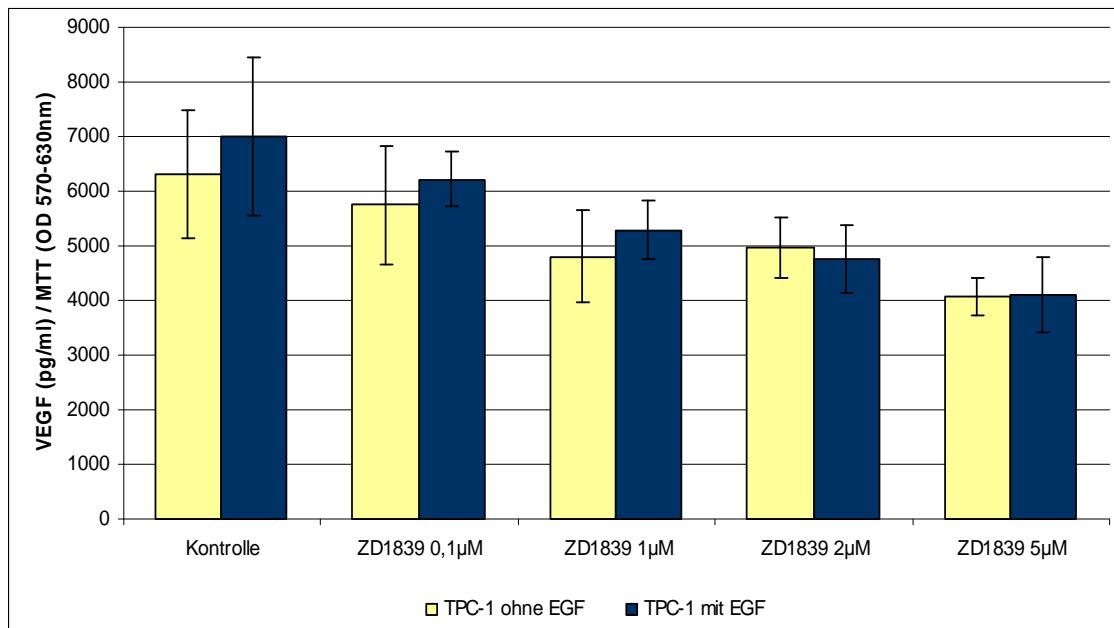


Abb. 3.9: Effekt von ZD1839 auf die basale und EGF-induzierte VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl
 kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit und Bestimmung der VEGF-Menge im Mediumüberstand mittels ELISA. Berechnung der Relation von VEGF zur Zellzahl. Abgebildet sind VEGF-Werte in Relation zur Zellzahl (pg/ml) nach Inkubation mit ZD1839 in Abwesenheit von EGF (gelbe Balken) und Anwesenheit von EGF (blaue Balken) als Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt ist die Zelllinie TPC-1, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) bzw. DMSO und EGF behandelte Zellen.

Tabelle 3.4 zeigt die jeweilige prozentuale Reduktion von basaler und EGF-stimulierter VEGF-Sekretion. Des Weiteren sind die jeweiligen Signifikanzniveaus angegeben.

Zelllinie und prozentuale Reduktion von VEGF in Relation zur Zellzahl								
	C643		Hth74		FTC-133		TPC-1	
ZD1839	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF
0,1µM	33,7*	+25,6*	n.b.	33,1*	9,7*	+8,8 ^{kS}	8,9 ^{kS}	11,2 ^{kS}
1µM	32,6 ^{kS}	14,9 ^{kS}	n.b.	99,9*	1,5 ^{kS}	24,2**	23,8*	24,6**
2µM	17,1 ^{kS}	35**	n.b.	99,9*	+28,8*	22,4*	21,3*	32,1**
5µM	31,2 ^{kS}	37,7**	n.b.	100*	+9,3 ^{kS}	22,9*	35,5*	41,5**

Tab. 3.4: Prozentuale Reduktion von VEGF in Relation zur Zellzahl unter ZD1839 ±EGF

Angegeben ist die prozentuale Reduktion der VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl unter steigender Dosis von ZD1839 (0,1µM bis 5µM) der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1 in Ab- und Anwesenheit von EGF (±EGF). Die Zahlenwerte geben ausgehend vom Kontrollwert prozentuale Abweichungen an. Werte ohne Vorzeichen geben eine Reduktion der VEGF-Sekretion an. Mit einem Pluszeichen gekennzeichnete Werte entsprechen einer prozentualen Zunahme der VEGF-Sekretion. Nicht berechnet wurde die basale VEGF-Reduktion bei Hth74 aufgrund nur minimalster Sekretion (n.b.). Die jeweiligen Signifikanzniveaus sind mit kS oder * gekennzeichnet (kS = keine Signifikanz, * = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant).

3.2.3. Beeinflussung der VEGF-Sekretion durch den TKI ZD6474

Unter basalen Bedingungen zeigte sich nur bei der Zelllinie TPC-1 eine dosisabhängige Reduktion der VEGF-Sekretion. Die ermittelte IC₅₀ betrug 4,23µM. Die EGF-induzierte VEGF-Sekretion konnte hingegen bei allen Zelllinien durch ZD6474 dosisabhängig gehemmt werden (siehe Abbildung 3.10). Die höchste Sensitivität zeigte auch hier die Zelllinie Hth74 mit einer maximal erreichten prozentualen Hemmung von 76,3% bei einer Konzentration von 2µM ZD6474. Die ermittelte IC₅₀ betrug 1,06µM. Eine halbmaximale Inhibition (IC₅₀) der EGF-induzierten VEGF-Sekretion konnte für die Zelllinien C643, FTC-133 und TPC-1 unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht erzielt werden.

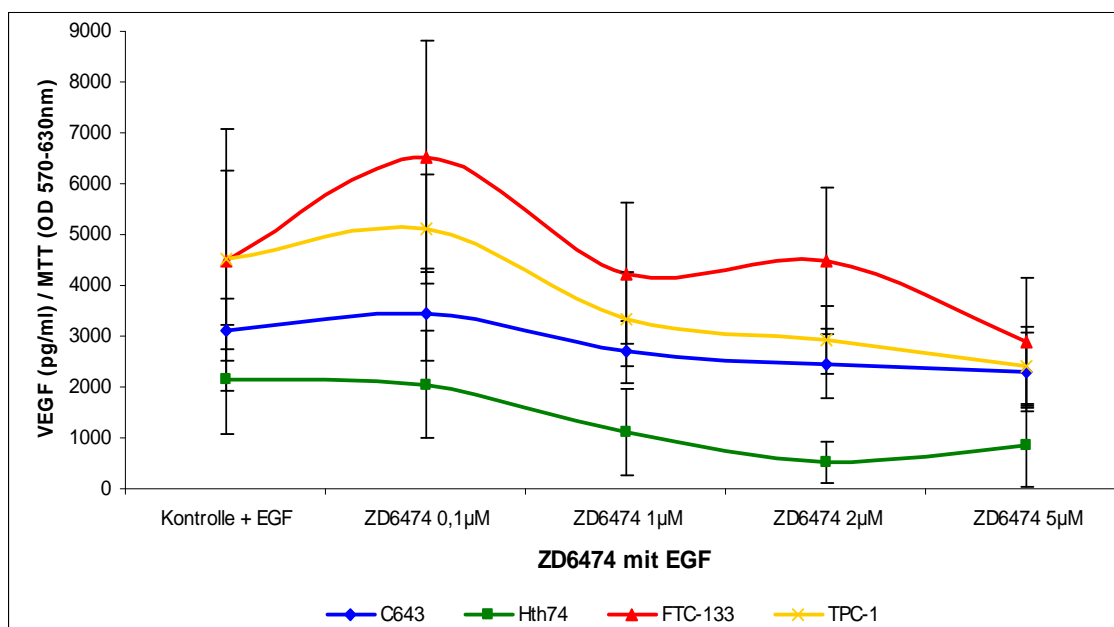


Abb. 3.10: Effekt von ZD6474 auf die EGF-induzierte VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit und Bestimmung der VEGF-Menge im Mediumüberstand mittels ELISA. Berechnung der Relation von VEGF zur Zellzahl. Abgebildet sind VEGF-Werte in Relation zur Zellzahl (pg/ml) nach Inkubation mit ZD6474 in Anwesenheit von EGF als Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt sind die Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) und EGF behandelte Zellen.

Analog zu den Versuchen mit ZD1839 zeigte sich gemessen an der Endkonzentration von 5µM ZD6474 eine Reduktion der EGF-induzierten Mehrsekretion von VEGF auf die basalen Werte. Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch anhand der Zelllinie C643 die dosisabhängige VEGF-Reduktion in Ab- und Anwesenheit von EGF. Eine Reduktion auf Werte (VEGF pg/ml) unterhalb der basalen VEGF-Spiegel (gelbe Balken) konnte

nicht erzielt werden. Die EGF-induzierte Mehrsekretion wurde ab einer Konzentration von 1µM ZD6474 vollständig aufgehoben.

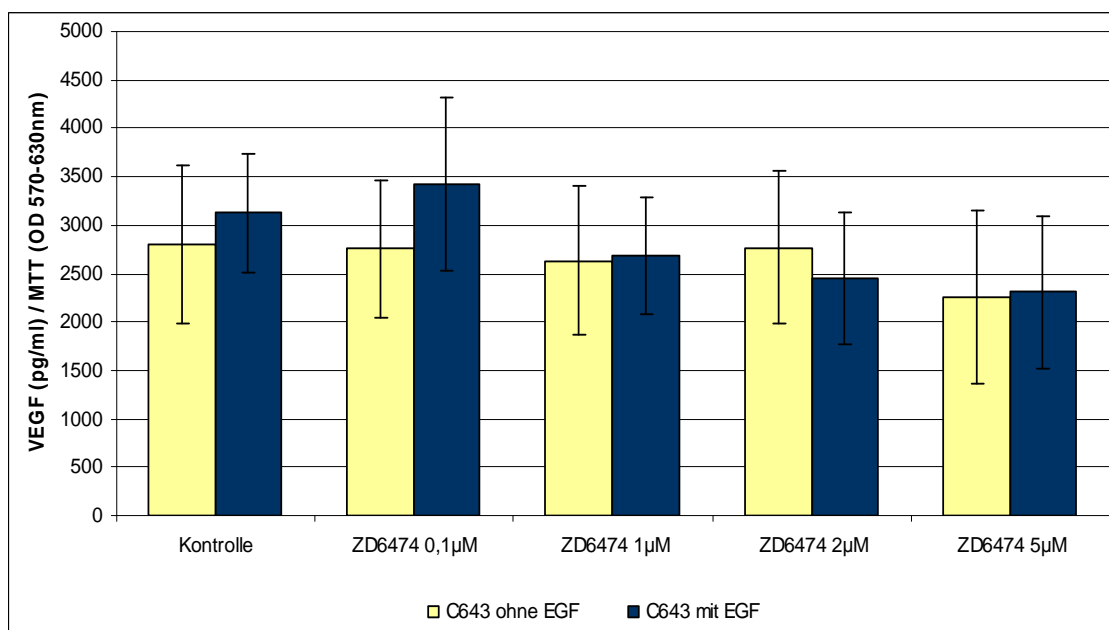


Abb. 3.11: Effekt von ZD6474 auf die basale und EGF-induzierte VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit und Bestimmung der VEGF-Menge im Mediumüberstand mittels ELISA. Berechnung der Relation von VEGF zur Zellzahl. Abgebildet sind VEGF-Werte in Relation zur Zellzahl (pg/ml) nach Inkubation mit ZD6474 in Abwesenheit von EGF (gelbe Balken) und Anwesenheit von EGF (blaue Balken) als Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt ist die Zelllinie C643, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) bzw. DMSO und EGF behandelte Zellen.

Zelllinie und prozentuale Reduktion von VEGF in Relation zur Zellzahl								
	C643		Hth74		FTC-133		TPC-1	
ZD6474	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF
0,1µM	1,7 ^{kS}	+9,6 ^{kS}	12,5 ^{kS}	4,9 ^{kS}	+16,4 [*]	+45,2 ^{kS}	17,4 ^{kS}	+13,2 ^{kS}
1µM	6 ^{kS}	14,1 [*]	0,5 ^{kS}	48,4 ^{**}	+40,8 [*]	6,1 ^{kS}	50,1 ^{**}	25,9 [*]
2µM	1,2 ^{kS}	21,6 [*]	+51,8 [*]	76,2 ^{**}	+122,1 ^{**}	0,4 ^{kS}	40,2 [*]	35,2 ^{**}
5µM	19,4 [*]	26,3 [*]	+358,8 [*]	60,9 ^{**}	+54,4 ^{**}	35,8 [*]	53,4 ^{**}	46,8 ^{**}

Tab. 3.5: Prozentuale Reduktion von VEGF in Relation zur Zellzahl unter ZD6474 ±EGF

Angegeben ist die prozentuale Reduktion der VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl unter steigender Dosis von ZD6474 (0,1µM bis 5µM) der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1 in Ab- und Anwesenheit von EGF (±EGF). Die Zahlenwerte geben ausgehend vom Kontrollwert prozentuale Abweichungen an. Werte ohne Vorzeichen geben eine Reduktion der VEGF-Sekretion an. Mit einem Pluszeichen gekennzeichnete Werte entsprechen einer prozentualen Zunahme der VEGF-Sekretion. Die jeweiligen Signifikanzniveaus sind mit kS oder * gekennzeichnet (kS = keine Signifikanz, * = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant).

3.2.4. Beeinflussung der VEGF-Sekretion durch ZD1839/ZD6474

Im Gegensatz zu den Zellproliferationsversuchen konnten mit der Kombination aus ZD1839 und ZD6474 keine additiven bzw. synergistischen, inhibitorischen Effekte auf die VEGF-Sekretion bei den anaplastischen und follikulären Zelllinien erzielt werden. Konnten die Einzelsubstanzen unter basalen Bedingungen eine signifikante Reduktion der VEGF-Sekretion bei C643-Zellen erzielen, kam es unter simultaner Inkubation der Zellen mit ZD1839 und ZD6474 sogar zu einer Zunahme der VEGF-Sekretion, welche jedoch ohne statistische Signifikanz war. Mit EGF stimulierte FTC-133 Zellen zeigten ebenfalls eine um 10% geringere Reduktion der VEGF-Sekretion in den Kombinationsversuchen. Exemplarisch abgebildet ist die Zelllinie C643 unter basalen Bedingungen und unter EGF-induzierter VEGF-Sekretion (siehe Abbildung 3.12).

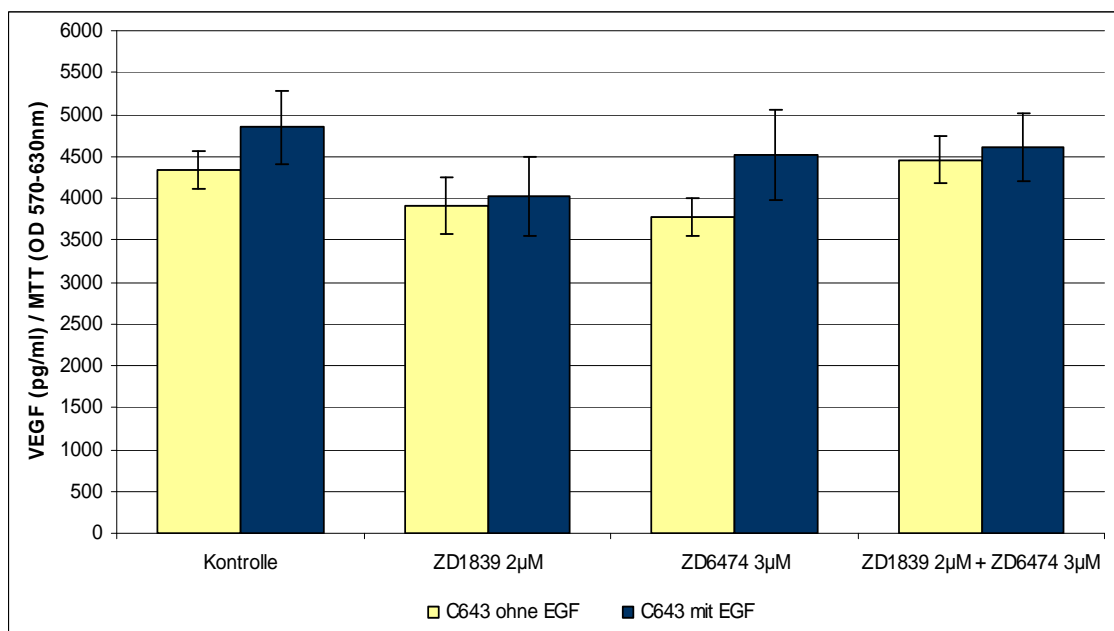


Abb. 3.12: Effekt von ZD1839 und ZD6474 sowie deren Kombination auf die basale und EGF-induzierte VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit und Bestimmung der VEGF-Menge im Mediumüberstand mittels ELISA. Berechnung der Relation von VEGF zur Zellzahl. Abgebildet sind VEGF-Werte in Relation zur Zellzahl (pg/ml) nach Inkubation mit ZD1839 und ZD6474 sowie deren Kombination in Abwesenheit von EGF (gelbe Balken) und Anwesenheit von EGF (blaue Balken) als Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt ist die Zelllinie C643, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) bzw. DMSO und EGF behandelte Zellen.

Einzig bei den mit EGF stimulierten TPC-1 Zellen ließ sich in den Kombinationsversuchen ein synergistischer Effekt auf die Inhibition der VEGF-Sekretion beobachten. Im Vergleich zu den Einzelsubstanzen erzielte die Kombination

von ZD1839 und ZD6474 eine um 18,7% höhere Reduktion der VEGF-Sekretion (siehe Abbildung 3.13).

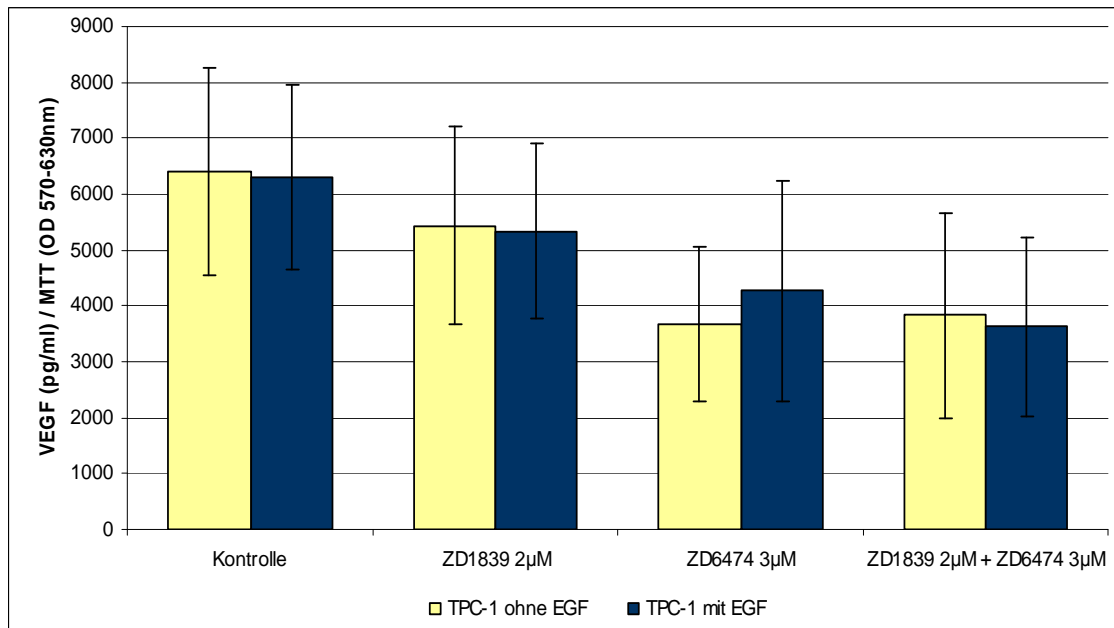


Abb. 3.13: Effekt von ZD1839 und ZD6474 sowie deren Kombination auf die basale und EGF-induzierte VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl

kolorimetrische Messung lebender Zellen mittels MTT-Assay nach 48 Stunden Inkubationszeit und Bestimmung der VEGF-Menge im Mediumüberstand mittels ELISA. Berechnung der Relation von VEGF zur Zellzahl. Abgebildet sind VEGF-Werte in Relation zur Zellzahl (pg/ml) nach Inkubation mit ZD1839 und ZD6474 sowie deren Kombination in Abwesenheit von EGF (gelbe Balken) und Anwesenheit von EGF (blaue Balken) als Mittelwerte mit jeweiliger Standardabweichung. Dargestellt ist die Zelllinie TPC-1, Kontrolle: mit DMSO (Trägerlösung) bzw. DMSO und EGF behandelte Zellen.

In Tabelle 3.6 ist die jeweilige prozentuale Reduktion von basaler und EGF-stimulierter VEGF-Sekretion dargestellt.

Zelllinie und prozentuale Reduktion von VEGF in Relation zur Zellzahl								
	C643		Hth74		FTC-133		TPC-1	
ZD1839/ZD6474	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF	-EGF	+EGF
ZD1839 2 μ M	10 ^{**}	17,1 ^{**}	43,5 ^{kS}	99,6 ^{**}	+13,2 [*]	41,1 ^{**}	15,2 ^{**}	15,4 ^{**}
ZD6474 3 μ M	13 ^{**}	6,8 ^{kS}	77,5 [*]	96,6 ^{**}	+40,2 ^{**}	6 ^{kS}	42,8 ^{**}	32,4 ^{**}
Kombination	+2,8 ^{kS}	5,1 ^{kS}	+197,1 [*]	98,7 ^{**}	+45,7 ^{**}	30,1 ^{**}	40,2 ^{**}	42,5 ^{**}

Tab. 3.6: Prozentuale Reduktion von VEGF in Relation zur Zellzahl unter ZD1839 und ZD6474 sowie deren Kombination \pm EGF

Angegeben ist die prozentuale Reduktion der VEGF-Sekretion in Relation zur Zellzahl unter 2 μ M ZD1839 und 3 μ M ZD6474 bzw. deren Kombination der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1 in Ab- und Anwesenheit von EGF (\pm EGF). Die Zahlenwerte geben prozentuale Abweichungen ausgehend vom Kontrollwert an. Werte ohne Vorzeichen geben eine Reduktion der VEGF-Sekretion an. Mit einem Pluszeichen gekennzeichnete Werte entsprechen einer prozentualen Zunahme der VEGF-Sekretion. Die jeweiligen Signifikanzniveaus sind mit kS oder * gekennzeichnet (kS = keine Signifikanz, * = signifikant, ** = sehr signifikant, *** = höchst signifikant).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass allein die Zelllinie TPC-1 sowohl unter ZD1839 als auch unter ZD6474 eine dosisabhängige Reduktion der basalen und der stimulierten VEGF-Sekretion aufwies. In allen Zelllinien konnte die EGF-induzierte Mehrsekretion von VEGF durch beide Substanzen auf die basalen Spiegel reduziert werden. Insgesamt zeigte die Zelllinie Hth74 die höchste Sensitivität. Ihre VEGF-Sekretion konnte durch beide Substanzen als einzige um mehr als 50% reduziert werden.

Die Kombination von ZD1839 und ZD6474 führte bei den Zelllinien C643, Hth74 und FTC-133 zu keiner gesteigerten Inhibition der VEGF-Sekretion. Einzig die zur VEGF-Sekretion stimulierten TPC-1 Zellen konnten durch die Kombination von ZD1839 und ZD6474 verstärkt inhibiert werden.

3.3. Western Blot-Analysen

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der Western Blot-Analysen vorgestellt. Untersucht wurde die Expressierung, Funktionalität bzw. Aktivität der unter 2.2.4.4.2. beschriebenen Proteine. Unterschieden wurde zwischen der inaktiven, nicht phosphorylierten Form (z.B. EGF-R-total) und dem phosphorylierten, aktivierten Rezeptor (z.B. phospho-EGF-R). Im Anhang findet sich eine übersichtliche Darstellung sämtlicher Western Blot-Analysen mit den zugehörigen β -Actin-Färbungen.

3.3.1. Rezeptorexprimierung und Aktivität unter ZD1839

3.3.1.1. Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R)

Im Gegensatz zu den differenzierten Zelllinien zeigte sich der EGF-Rezeptor (EGF-R-total) in den anaplastischen Zelllinien nur schwach exprimiert. Die Stimulation mit EGF bewirkte bei allen Zelllinien eine verstärkte Expressierung, also eine liganden-induzierte Hochregulation des nicht phosphorylierten EGF-Rezeptors. Der EGF-Rezeptor ließ sich in allen Zelllinien durch ZD1839 dosisabhängig „downregulieren“. Die anaplastischen Zelllinien zeigten dabei ein höheres Ansprechen auf ZD1839 als die differenzierten Karzinome.

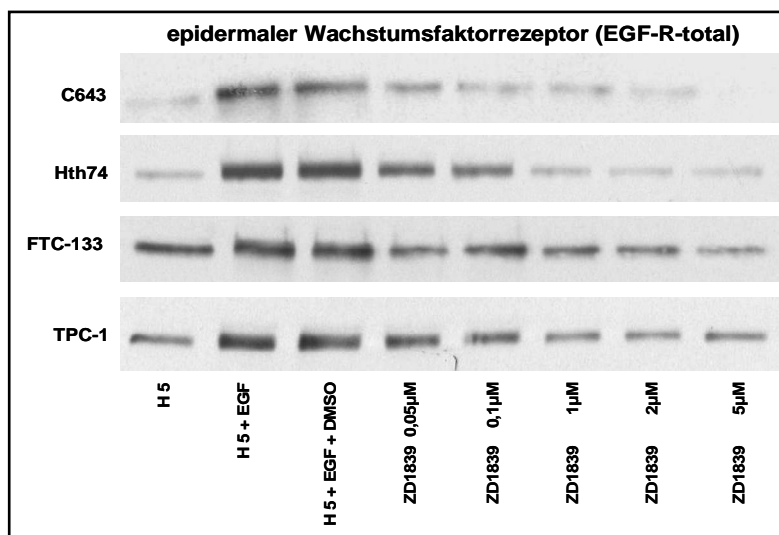


Abb. 3.14: EGF-R-total unter ZD1839

Abgebildet ist die Expression des EGF-Rezeptors der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1, Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

Die Aktivität der EGF-Rezeptoren (phospho-EGF-R) ließ sich durch Stimulation mit extern hinzugefügtem EGF in allen untersuchten Zelllinien steigern, bzw. wurde bei den Zelllinien C643, Hth74 und FTC-133 erst durch EGF induziert. Umgekehrt gelang auch die dosisabhängige Inhibition phosphorylierter EGF-Rezeptoren. Der stärkste Effekt zeigte sich bei der Zelllinie C643, bei der die Aktivität des EGF-Rezeptors bereits ab einer Konzentration von 0,05µM ZD1839 vollständig gehemmt werden konnte.

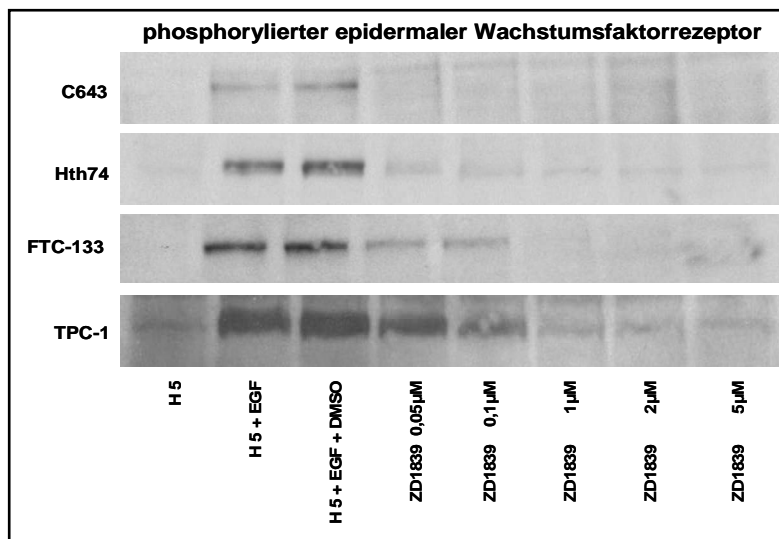


Abb. 3.15: phosphorylierter EGF-Rezeptor unter ZD1839

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten EGF-Rezeptoren der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

3.3.1.2. *Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor (VEGF-R)*

Der VEGF-Rezeptor (VEGF-R-total) zeigte sich auf allen Tumorzellen exprimiert. Eine Stimulation mit EGF führte zu keiner verstärkten Expressierung. Ebenso lässt sich der VEGF-Rezeptor durch ZD1839 nicht downregulieren (ohne Abbildung).

Die Stimulation der Zelllinien C643, FTC-133 und TPC-1 mit extern hinzugefügtem EGF führte zu einer verstärkten Aktivierung des VEGF-Rezeptors (phospho-VEGF-R). Bei der Zelllinie Hth74 wurde hingegen erst durch externe EGF-Stimulation eine Aktivierung des VEGF-Rezeptors erzielt. Im Vergleich zu den Zelllinien C643, FTC-133 und TPC-1 konnte sie durch den Einsatz von ZD1839 dosisabhängig am stärksten gehemmt werden (siehe Abbildung 3.16).

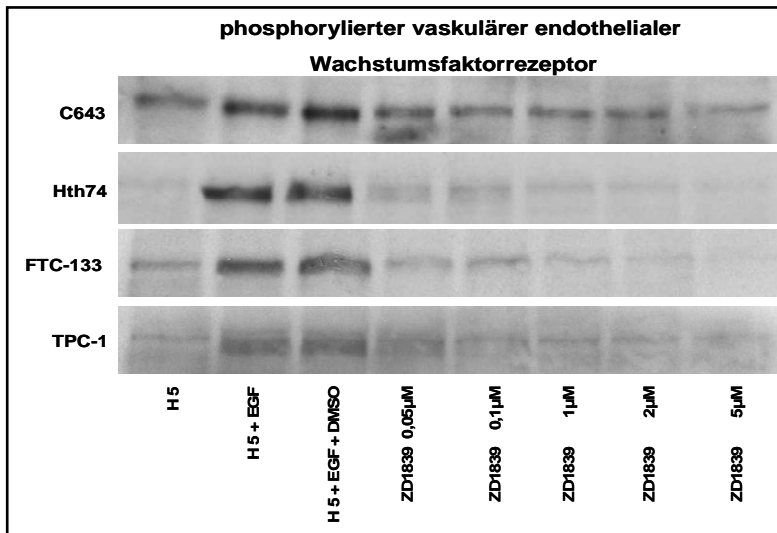


Abb. 3.16: phosphorylierter VEGF-Rezeptor unter ZD1839

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten VEGF-Rezeptoren der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

3.3.1.3. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase-B (Akt)

Die Proteinkinase B (Akt) war unbeeinflusst von gleichzeitiger EGF-Stimulation in allen Zelllinien exprimiert. ZD1839 führte bei der Zelllinie Hth74 dosisabhängig zu leicht verminderter Expression der Proteinkinase B (Akt), während alle übrigen Zelllinien unbeeinflusst blieben.

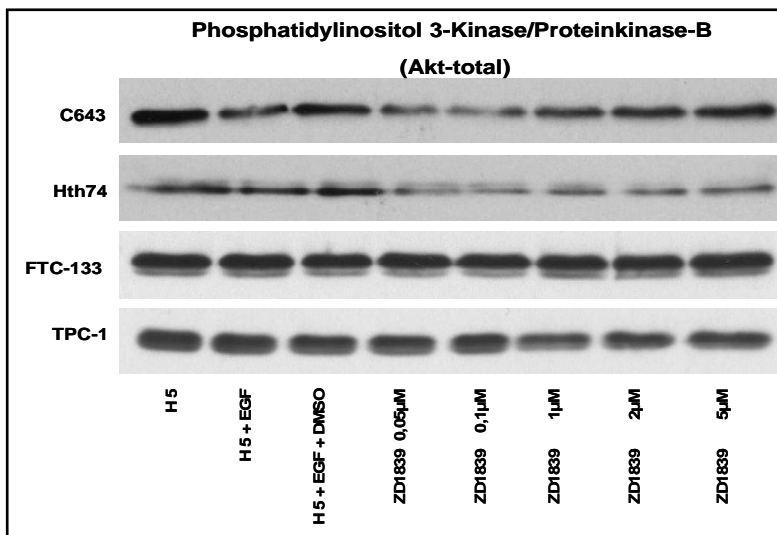


Abb. 3.17: Akt-total unter ZD1839

Abgebildet ist die Expression der nicht-phosphorylierten Akt der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

Eine schwache Zunahme der phosphorylierten Proteinkinase B (Akt) unter gleichzeitiger Stimulation mit externem EGF zeigte sich bei den Zelllinien Hth74 und TPC-1, während alle anderen Zelllinien eine unveränderte Aktivität von phospho-Akt zeigten. Eine schwache Hemmung der Aktivierung von Akt durch ZD1839 wurde zelllinien- und dosisabhängig beobachtet (siehe Abbildung 3.18). Bei der Zelllinie FTC-133 war kein Effekt nachweisbar.

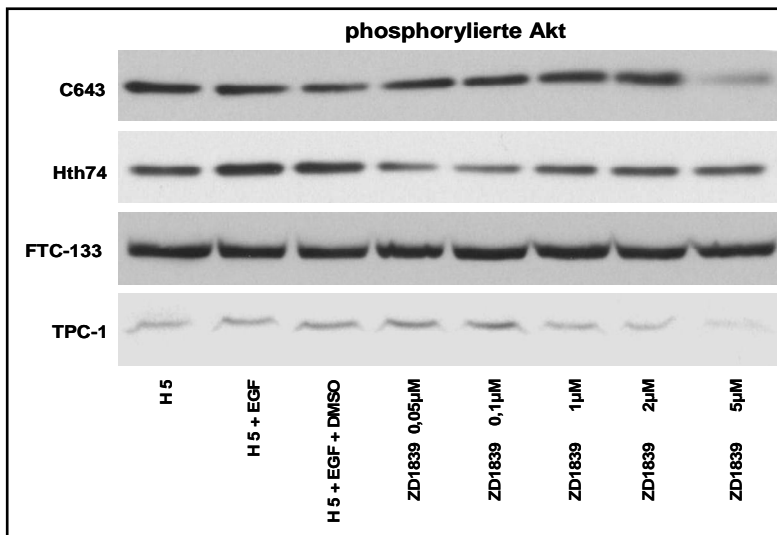


Abb. 3.18: phosphorylierte Akt unter ZD1839

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten Akt der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 (0,05 μM, 0,1 μM, 1 μM, 2 μM und 5 μM).

3.3.1.4. Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Die MAP-Kinase zeigte sich unabhängig von der Stimulation mit EGF in allen Zelllinien exprimiert. Eine „Downregulation“ durch ZD1839 konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abbildung). Die Stimulation mit EGF führte bei den Zelllinien C643, FTC-133 und TPC-1 zu einer leicht verstärkten Aktivierung der MAP-Kinase, die sich dosisabhängig inhibieren ließ.

ZD1839 bewirkt ab 0,1 μM eine Inhibition bei C643 und eine jeweils stärker werdende Inhibition ab 0,05 μM bei FTC-133 und TPC-1. Unabhängig von EGF zeigt die phosphorylierte MAP-Kinase in Hth74-Zellen eine hohe Aktivität, die durch ZD1839 nicht gehemmt werden konnte (siehe Abbildung 3.19).

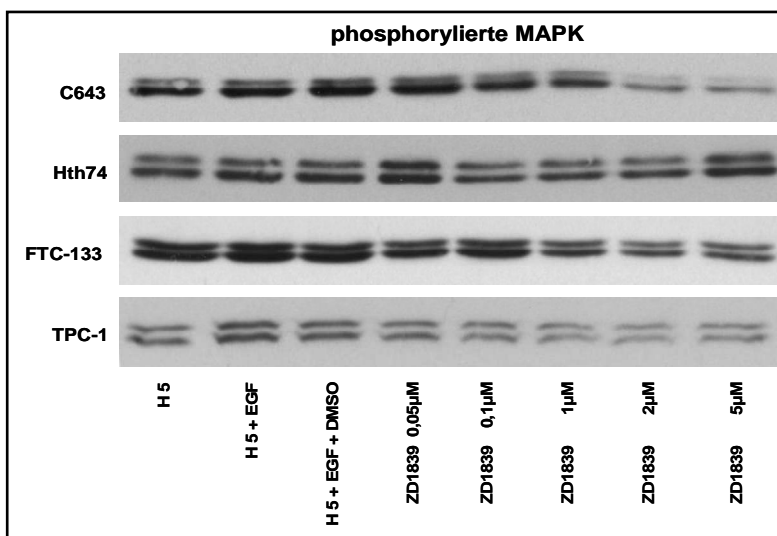


Abb. 3.19: phosphorylierte MAPK unter ZD1839

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten MAP-Kinase der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 (0,05 μM, 0,1 μM, 1 μM, 2 μM und 5 μM).

3.3.2. Rezeptorexprimierung und Aktivität unter ZD6474

3.3.2.1. Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (EGF-R)

Analog den Versuchen zu ZD1839 zeigte sich der EGF-Rezeptor (EGF-R-total) in den anaplastischen Zelllinien nur schwach exprimiert. Durch Stimulation mit EGF kam es jedoch zu einer verstärkten Expressierung. Die Stimulation der differenzierten Zellen zeigte ebenfalls eine schwache Hochregulierung des EGF-Rezeptors. Unter ZD6474 kam es bei den anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien zu einer Downregulation. Die höchste Sensitivität zeigte dabei die Zelllinie Hth74.

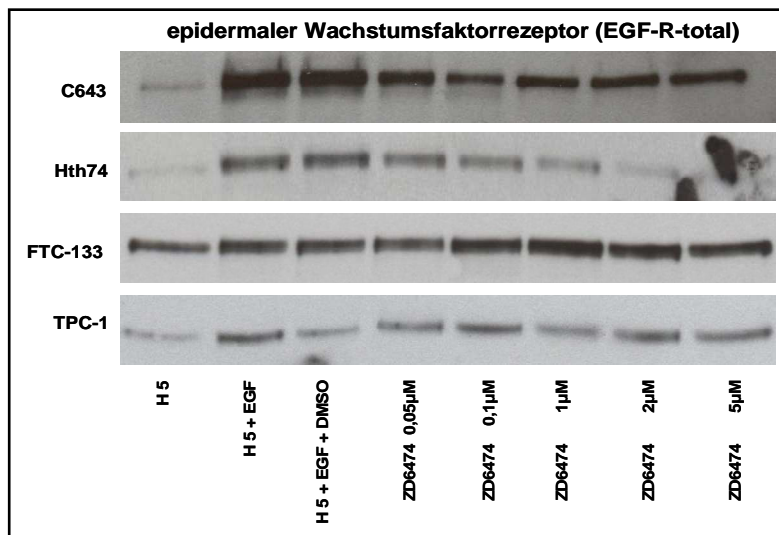


Abb. 3.20: EGF-R-total unter ZD6474

Abgebildet ist die Expression des EGF-Rezeptors der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD6474 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

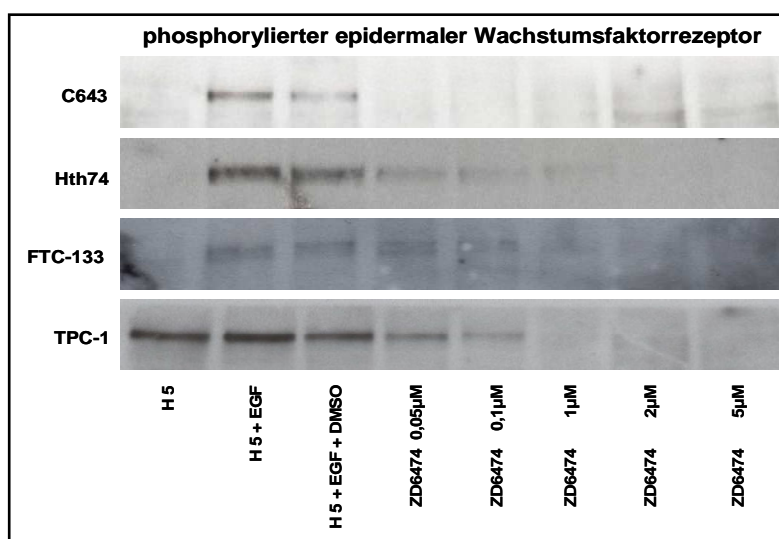


Abb. 3.21: phosphorylierter EGF-Rezeptor unter ZD6474

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten EGF-Rezeptoren der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD6474 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

Die Aktivität der EGF-Rezeptoren (phospho-EGF-R) ließ sich durch Stimulation mit extern hinzugefügtem EGF in allen untersuchten Zelllinien steigern, bzw. wurde bei den

Zelllinien C643, Hth74 und FTC-133 erst durch EGF induziert. In den oben genannten Zelllinien gelang umgekehrt auch eine dosisabhängige Hemmung beginnend bei $0,05\mu\text{M}$. Der stärkste Effekt zeigte sich bei der Zelllinie C643, deren phospho-EGF-R bereits ab einer Konzentration von $0,05\mu\text{M}$ ZD6474 vollständig gehemmt werden konnte.

3.3.2.2. *Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktorrezeptor (VEGF-R)*

Der VEGF-Rezeptor (VEGF-R-total) zeigte sich auf allen Zelllinien exprimiert. Eine Stimulation mit EGF führte zu keiner verstärkten Expressierung. Ebenso ließ sich der VEGF-Rezeptor durch ZD6474 nicht downregulieren (ohne Abbildung).

Die Stimulation der Zelllinien C643, FTC-133 und TPC-1 mit extern hinzugefügtem EGF führte zu einer verstärkten Aktivierung des VEGF-Rezeptors (phospho-VEGF-R). Bei der Zelllinie Hth74 wurde hingegen erst durch externe EGF-Stimulation eine Aktivierung des VEGF-Rezeptors erzielt. Bei allen Zelllinien konnte ebenfalls eine dosisabhängige Hemmung der Rezeptoraktivität durch ZD6474 nachgewiesen werden. Dabei traten deutliche Sensitivitätsunterschiede auf. Die höchste Sensitivität zeigte Hth74 gefolgt von FTC-133, C643 und TPC-1.

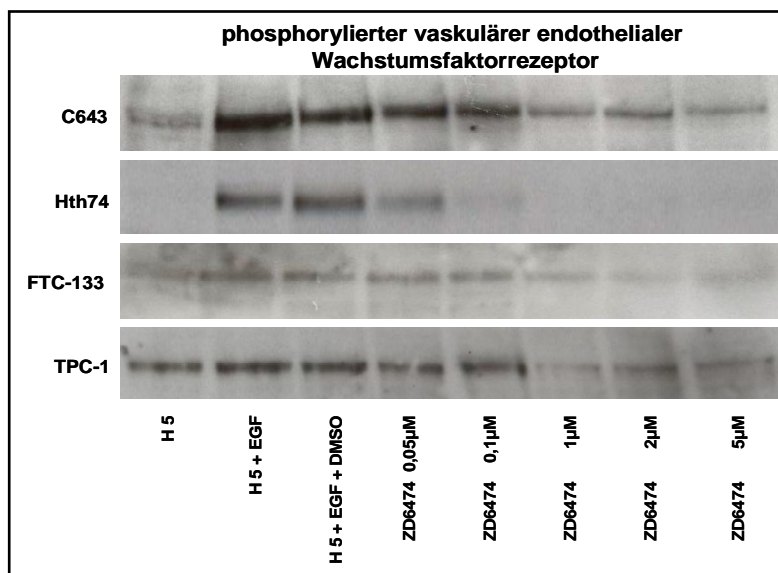


Abb. 3.22: phosphorylierter VEGF-Rezeptor unter ZD6474

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten VEGF-Rezeptoren der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD6474 ($0,05\mu\text{M}$, $0,1\mu\text{M}$, $1\mu\text{M}$, $2\mu\text{M}$ und $5\mu\text{M}$).

3.3.2.3. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase-B (Akt)

Die Proteinkinase B (Akt) war unbeeinflusst von der Stimulation mit EGF in allen Zelllinien exprimiert. Eine Downregulation durch ZD6474 ließ sich nicht nachweisen (ohne Abbildung).

Analog zu den Versuchen mit ZD1839 zeigte sich nur bei den Zelllinien Hth74 und TPC-1 eine Zunahme der phosphorylierten Proteinkinase B (Akt) unter gleichzeitiger Stimulation mit externem EGF. Eine Inhibierung von Akt konnte bei den Zelllinien C643 und Hth74 ab 2µM ZD6474 beobachtet werden. Die Zelllinie TPC-1 zeigte die höchste Sensitivität. Hier kam es zu einer dosisabhängigen Aktivitätsminderung. Bei der Zelllinie FTC-133 blieb Akt hingegen vollkommen unbeeinflusst.

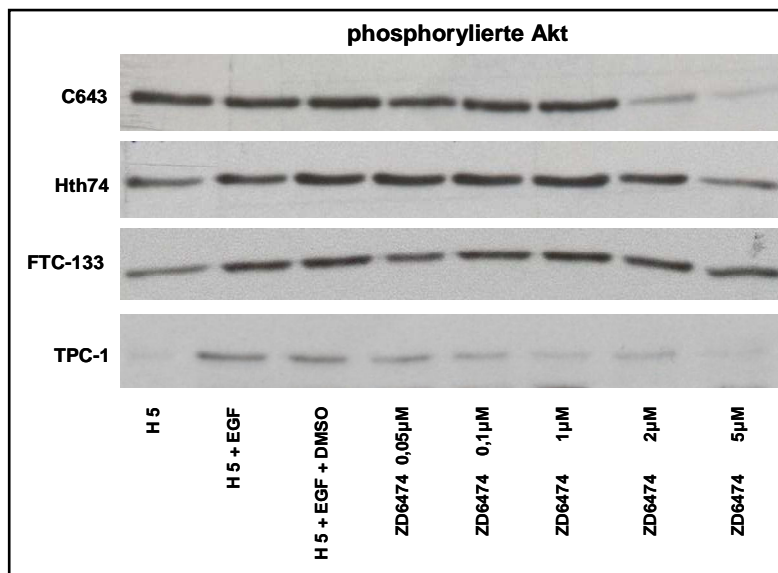


Abb. 3.23: phosphorylierte Akt unter ZD6474

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten Akt der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD6474 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

3.3.2.4. Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)

Die MAP-Kinase zeigte sich unabhängig von der Stimulation mit EGF in allen Zelllinien exprimiert. Eine Downregulation durch ZD6474 konnte nicht nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

Die Stimulation mit EGF führte bei den Zelllinien C643, FTC-133 und TPC-1 zu einer verstärkten Aktivierung der MAP-Kinase. Eine dosisabhängige Inhibierung konnte bei den Zelllinien C643 und TPC-1 beobachtet werden. Die MAPK der FTC-133 Zellen wurde durch 5 μ M ZD6474 nur schwach inhibiert. Unabhängig von EGF zeigte die MAP-Kinase in Hth74-Zellen eine hohe Aktivität, die durch den Tyrosinkinaseinhibitor ZD6474 nicht beeinflussbar war.

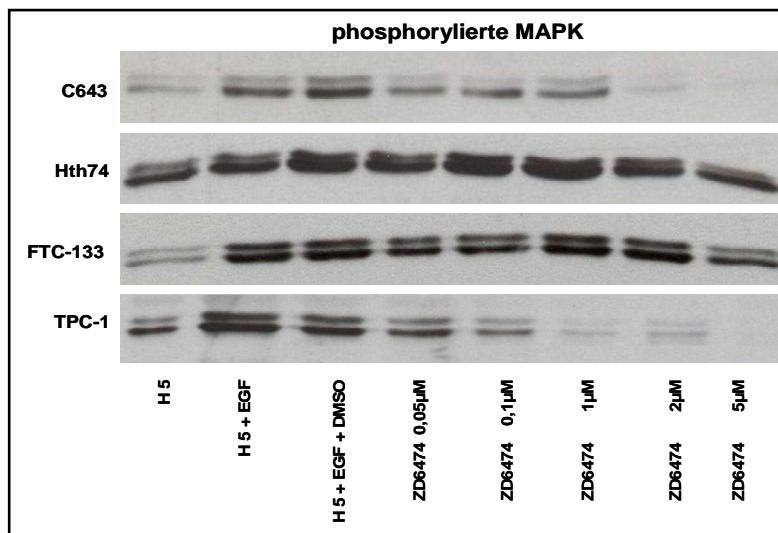


Abb. 3.24: phosphorylierte MAPK unter ZD6474

Abgebildet ist die Aktivität der phosphorylierten MAP-Kinase der Zelllinien C643, Hth74, FTC-133 und TPC-1. Legende: H5 = Leerwert, H5 + EGF = mit EGF behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO = Kontrollwert, in aufsteigender Konzentration ZD6474 (0,05 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 5 μ M).

4. Diskussion

Zellproliferation und Neoangiogenese stellen entscheidende Prozesse in der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen dar. Anhand der vorliegenden Arbeit sollten antitumorale Effekte zweier Tyrosinkinaseinhibitoren an verschiedenen Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms (papillär, follikulär und anaplastisch) untersucht werden. Als Substanzen wurden der Tyrosinkinaseinhibitor ZD1839 mit primärer Wirkung am EGF-Rezeptor und der MAP-Kinase (Albanell et al., 2001) sowie der duale Tyrosinkinaseinhibitor ZD6474 mit primärer Wirkung am VEGF- und EGF-Rezeptor eingesetzt (Wedge et al., 2002). Die Evaluation beider Substanzen erfolgte durch in vitro-Untersuchungen. Mittels MTT-Assay wurde untersucht inwieweit beide Substanzen die Zellproliferation hemmen. Durch ELISA-Messungen wurde die VEGF-Sekretion der Schilddrüsenkarzinomzelllinien (VEGF als proangiogener Faktor) unter Einwirkung von ZD1839 und ZD6474 gemessen. Basierend auf den Ergebnissen der Einzelsubstanzversuche wurden beide Tyrosinkinaseinhibitoren auch in Kombination getestet. Von besonderem Interesse war dabei die Frage, ob diese Kombination zu einer verstärkten Hemmung der Zellproliferation und VEGF-Sekretion führt oder ob es sogar zu antagonistischen Effekten kommt.

Alle in vitro-Versuche wurden sowohl unter gleichzeitiger externer EGF-Stimulation als auch ohne zusätzliche EGF-Stimulation durchgeführt. Es sollte geprüft werden, ob gleichzeitige EGF-Stimulation zu gesteigerter Proliferation und VEGF-Sekretion führt und inwieweit die inhibitorischen Effekte von ZD1839 und ZD6474 beeinflusst werden. Ausgehend von den Ergebnissen dieser Experimente wurden mittels Western Blot-Analysen die Wirkung von ZD1839 und ZD6474 auf die Expression und Aktivität der membrangebundenen EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie nachgeschalteter zytoplasmatischer Signaltransduktionswege (PI3-Kinase/Akt-Signalweg und MAP-Kinase) untersucht. Analog den Versuchen zur Proliferation und VEGF-Sekretion sollte untersucht werden, ob durch gleichzeitige EGF-Stimulation die Expression und Aktivität (Phosphorylierung) der untersuchten Rezeptoren verändert wird.

4.1. Zellproliferation

4.1.1. EGF-Effekt auf die Zellproliferation und Wirkung der TKI

Alle Experimente zur Zellproliferation wurden unter basalen Bedingungen und unter simultaner EGF-Stimulation mit einer Endkonzentration von 20ng/ml durchgeführt. Bei allen untersuchten Zelllinien zeigte die gleichzeitige Stimulation mit EGF keine statistisch signifikante Ab- oder Zunahme der Zellproliferation. Gemessen an der mittleren inhibitorischen Konzentration zeigte ZD6474 bei gleichzeitiger Inkubation mit EGF eine schlechtere Wirksamkeit gegenüber allen untersuchten Zelllinien. ZD1839 als primärer EGF-R-Inhibitor zeigte nur bei der Zelllinie C643 unter gleichzeitiger EGF-Stimulation eine geringere antiproliferative Wirkung. Untersuchungen mit ZD1839 an zwei anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinien mit unterschiedlicher Expression des EGF-Rezeptors zeigten unter Stimulation mit 1nM EGF voneinander abweichende Ergebnisse. In der OCUT-2-Zelllinie mit schwacher Expressierung des EGF-Rezeptors führte die EGF-Stimulation nicht zu einer Steigerung der Zellproliferation und ZD1839 zeigte keine signifikante Zellzahlreduktion. ACT-1-Zellen mit EGF-Rezeptor-Überexprimierung zeigten unter EGF-Stimulation hingegen eine Steigerung der Zellproliferation und komplette Inhibition der liganden-induzierten Proliferation durch ZD1839 (Nobuhara et al., 2005).

Eine mögliche Erklärung für die geringere Sensitivität EGF-stimulierter Zelllinien gegenüber den Tyrosinkinaseinhibitoren könnte darin bestehen, dass Ligandenbindung (EGF) zu Internalisierung von zellmembrangebundenen Rezeptoren führt. Bereits 1976 beschrieben Carpenter und Cohen die Internalisierung und den lysosomalen Abbau von EGF nach Bindung an den EGF-Rezeptor auf Fibroblasten. Dieselbe Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass Bindung von EGF an den EGF-Rezeptor zu einer beschleunigten Internalisierung führt (Stoscheck und Carpenter, 1984). Diese Beobachtung konnte schliesslich als regulatorischer Feedback-Mechanismus der Signaltransduktion verstanden werden (Wells et al., 1990). Befindet sich die Zelle im Gleichgewicht, so wird der EGF-Rezeptor im selben Maße internalisiert und lysosomal abgebaut wie endosomal an die Zelloberfläche recycelt. Wird die Zelle hingegen hohen Wachstumsfaktorkonzentrationen ausgesetzt (z.B. EGF) kann dies zu gesteigerter Rezeptorinternalisierung führen (Sorkin, 2001; Wiley et al., 1991). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Inkubation mit hohen Konzentrationen von EGF je

nach Zelllinie zu einer geringeren Sensitivität gegenüber den untersuchten Tyrosinkinaseinhibitoren führt. Es ist anzunehmen, dass hierbei die Internalisierung von EGF-Rezeptoren eine Rolle spielen könnte und dadurch nachgeschaltete Signaltransduktionswege im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus beeinflusst werden. Des Weiteren findet eine Downregulation von membrangebundenen EGF-Rezeptoren statt, was gleichermaßen einen Verlust der Zielstruktur von Tyrosinkinaseinhibitoren bedeutet. Eine Studie an Kolonkarzinomzelllinien untersuchte den Effekt von Cetuximab (monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor) und Gefitinib (ZD1839) in Ab- und Anwesenheit von 10nM EGF. Hier konnte gezeigt werden, dass beide EGF-Rezeptorantagonisten unter simultaner Stimulation der Zellen mit EGF eine schlechtere Wirksamkeit aufwiesen (Solmi et al., 2008). Die Übertragung der Ergebnisse auf weitere Studien ist allerdings nur eingeschränkt möglich, da Zellproliferationsassays häufig nur unter simultaner EGF-Stimulation in physiologischen Mengen (1-2ng/ml) durchgeführt werden.

Wie bereits unter 1.2. beschrieben stellt die Zellproliferation nur eine biologische Wirkung des epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) dar. Über den EGF-Rezeptor weitergeleitete Signale via Ras/Raf/MEK/MAPK oder Phosphatidylinositol 3-Kinase/Proteinkinase-B können auch in einer Abnahme der Apoptoseaktivität resultieren und somit ebenfalls zu einer geringeren Sensitivität gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren führen. Welcher Faktor nun letztlich für die geringere inhibitorische Aktivität von ZD1839 und ZD6474 unter simultaner EGF-Stimulation verantwortlich ist kann anhand dieser Studie nicht beantwortet werden.

4.1.2. Wirkung der TKI auf die Zellproliferation

Beide Tyrosinkinaseinhibitoren führten zu einer zeit- und dosisabhängigen Zellzahlreduktion in allen untersuchten Zelllinien. Gemessen an den IC₅₀-Werten zeigte ZD6474 den stärkeren antiproliferativen Effekt. Eine Reduktion der Zellzahl um 50% wurde je nach Zelllinie zwischen 0,62µM und 5,36µM erzielt. Die höchste Sensitivität zeigte die papilläre Variante TPC-1 gefolgt, von FTC-133 und den anaplastischen Karzinomzelllinien. Bezogen auf die Zellproliferation erreichte ZD1839 zelllinienabhängig die IC₅₀ bei Konzentrationen zwischen 6,79µM und 8,51µM, wobei die höchste Sensitivität auch hier TPC-1-Zellen, gefolgt von den anaplastischen Zelllinien zeigten. Bei der folliculären Variante FTC-133 wurde die Reduktion der

Zellzahl um 50% nicht erreicht. Als Besonderheit zeigte ZD1839 eine zweiphasige Dosiswirkungskurve (siehe 4.1.3.).

Andere Studien zu ZD1839 und ZD6474 zeigten je nach Tumorentität übereinstimmende, aber auch abweichende Ergebnisse bezogen auf die IC50-Werte. Bei der anaplastischen Zelllinie Kat-4 erreichte ZD1839 die IC50 bei einer Konzentration von 8,36 μ M (Schiff et al., 2004).

Die hier gefundene hohe Sensitivität von TPC-1-Zellen gegenüber ZD6474 könnte durch eine Mutation im RET-Protoonkogen bedingt sein, die typischerweise beim medullären Schilddrüsenkarzinom auftritt. Allerdings konnte diese Mutation auch bei papillären Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden (RET/PTC), so auch in der hier untersuchten Zelllinie TPC-1 (Ishizaka et al., 1990). ZD6474 konnte das RET-Onkoprotein (RET/PTC-3) mit einer IC50 von 0,1 μ M effektiv inhibieren, wohingegen ZD1839 keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität der RET-Onkoproteine zeigte (Carlomagno et al., 2002). Das durch das RET-Gen kodierte Onkoprotein (Rezeptor mit Tyrosinkinaseaktivität) ist in Signaltransduktionswege involviert, die unter anderem für die Zellproliferation und Regulation der VEGF-Sekretion zuständig sind (Hwang et al., 2003). Bei Karzinomen des Ovars, des Gastrointestinaltraktes (Kolon, Magen) und beim NSCLC zeigte ZD6474 antiproliferative Wirkung mit vergleichbarer Sensitivität wie die hier untersuchten differenzierten Schilddrüsenkarzinomzelllinien. Die ermittelten IC50-Werte reichten hier von 0,5 μ M bis 1 μ M (Ciardiello et al., 2003). Deutlich schlechtere Ansprechraten auf ZD1839 und ZD6474 zeigten verschiedene Zelllinien von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches. Gemessen an der Zellproliferation erreichte ZD6474 die mittlere inhibitorische Konzentration zwischen 4,4 μ M und 26,4 μ M. Die Sensitivität gegenüber ZD1839 zeigte sich noch geringer ausgeprägt, hier lagen die IC50-Werte zwischen 41,6 μ M und 85 μ M (Sano et al., 2007). Eine weitere Studie an fünf verschiedenen Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms zeigte eine hohe Sensitivität für beide Tyrosinkinaseinhibitoren. Die gemessenen IC50-Werte für ZD1839 reichten von 0,67 μ M bis 10,1 μ M und für ZD6474 von 0,58 μ M bis 5,02 μ M (Giannelli et al., 2008). Eine Vielzahl von Studien belegt, dass die hier untersuchten Tyrosinkinaseinhibitoren eine gute in vitro-Wirksamkeit auch bei aggressiven Tumorentitäten aufweisen. Dabei finden sich Hinweise, dass die Kombination von EGF- und VEGF-Rezeptorantagonisten den antitumoralen Effekt erhöht. Diese Studien fokussieren allerdings vornehmlich auf Karzinome des Kopf-Halsbereiches, des Gastrointestinaltraktes sowie auf das Mamma- und

Bronchialkarzinom (Caponigro et al., 2005; Kim et al., 2009; Martinelli et al., 2010). Die vorliegende Studie konnte als erste zeigen, dass die Kombination zweier Tyrosinkinaseinhibitoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen (EGF- und VEGF-Rezeptor) zu synergistischen bzw. additiven antiproliferativen Effekten am Schilddrüsenkarzinom führt (Vgl. 3.1.4.). So wiesen äquimolare Lösungen von ZD1839 und ZD6474 gegenüber der Einzelsubstanz eine deutlich höhere Inhibition des Zellwachstums auf. Eine Studie aus dem Jahr 2006 untersuchte die Wirksamkeit eines monoklonalen Antikörpers gegen den EGF-Rezeptor (Cetuximab) in Kombination mit einem „small molecule“ (ZD1839 oder ZD6474). Zunächst wurde die antiproliferative Wirkung der jeweiligen Einzelsubstanzen nachgewiesen, danach erfolgten Kombinationsversuche. Untersucht wurde der Effekt an sechs verschiedenen Tumorentitäten, nämlich am Kolon-, Ösophagus-, Magen- und Pankreaskarzinom aus dem Bereich des Gastrointestinaltraktes sowie am Mamma- und am nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom. Beide Kombinationen (Cetuximab + ZD1839 und Cetuximab + ZD6474) zeigten eine Potenzierung des antiproliferativen Effekts von Cetuximab, der als monoklonaler Antikörper an der Ligandenbindungsstelle des EGF-Rezeptors mit spezifischen Wachstumsfaktoren konkurriert (kompetitive Hemmung). Somit konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung eines Rezeptors (EGF-R) auf zwei verschiedenen Ebenen (extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne und zytoplasmatische katalytische Kinasedomäne) in einem effektiveren antitumoralen Effekt resultiert (Morelli et al., 2006). Letztlich kann aufgrund der Komplexität von Signaltransduktionskaskaden und auto- bzw. parakrinen Aktivierungsmechanismen nicht exakt gesagt werden, ob duale Inhibition nur den spezifischen Rezeptor hemmt. Vielmehr ist davon auszugehen, dass duale Inhibition nachgeschaltete Signalwege und auto- sowie parakrine Stimulationsmechanismen insgesamt effektiver hemmt. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Mamma-Epithelzellen, die Her2-(ErbB2)-Rezeptoren mit aktivierender Mutation in der Kinasedomäne exprimieren, höhere Level an TGF- β -1 (Zytokin) exprimieren und so über autokrine Stimulation eine TGF- β -1-vermittelte Signalwirkung initiieren (z.B. Zellwachstum und -proliferation). Des Weiteren induziert die mutierte Form des Her2-Rezeptors TGF- α - und Amphiregulin-Expression und führt somit über parakrine Stimulation zu einer EGFR-Aktivierung. Die mutierten Her2-Rezeptoren zeigen ein geringeres Ansprechen auf Trastuzumab (spezifischer monoklonaler Antikörper gegen den Her2-Rezeptor) und weisen eine Resistenz gegenüber EGFR-Inhibitoren auf. Die Studie konnte nachweisen, dass eine kombinierte

Inhibition mit Trastuzumab (Inhibition der nach intrazellulär weitergeleiteten Signale) und Cetuximab (Inhibition der parakrinen Stimulation) eine höhere Effizienz gegenüber der Monotherapie aufweist (Wang et al., 2010).

Primäre oder erworbene Resistenz von EGF-Rezeptoren gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren wie z.B. Erlotinib (selektiver EGF-R-Inhibitor) und ZD1839 ist bisher noch nicht komplett verstanden. Die primäre Resistenz ist unter anderem mit K-RAS oder aktivierenden Mutationen im PI3K/Akt-Signaltransduktionsweg verbunden. Anhand von Endothelzellen, die den EGF-Rezeptor exprimieren, konnte in einem Melanom Xenograft Modell unter Behandlung mit ZD1839 eine Verschiebung der EGFR-abhängigen Proliferation zugunsten einer zunehmenden VEGFR-abhängigen Proliferation beobachtet werden (Amin et al., 2008). Eine aktuelle Studie zeigt, dass die duale Inhibition mittels VEGFR- und EGFR-Inhibitor (ZD6474, Bevacizumab + Erlotinib) die erworbene oder primäre Resistenz aufheben kann. Hierbei wies der duale Inhibitor ZD6474 die gleiche antiproliferative Wirkung auf wie die Kombination von Bevacizumab (monoklonaler Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor) und Erlotinib (Naumov et al., 2009). In Tumorzellen die eine Resistenz gegenüber Erlotinib entwickeln, zeigte sich ZD6474 im Vergleich zu Bevacizumab jedoch deutlich überlegen.

Die vorliegende Literatur und die Ergebnisse der eigenen Studie verdeutlichen, dass multimodale antitumorale Konzepte sowohl die Kombination von monoklonalen Antikörpern mit Tyrosinkinaseinhibitoren als auch die Kombination von „small molecules“ umfassen sollte. Der synergistische Effekt niedriger Dosierungen führt wahrscheinlich zu einer besseren Verträglichkeit. Resistenzen gegenüber Tyrosinkinaseinhibitoren können aufgehoben oder kompensiert werden. Des Weiteren kann die hohe Signaldiversität vermittelt über autokrine und parakrine Stimulationsmechanismen sowie „crosstalk“ (Garcia-Sainz et al., 2010) durch den Einsatz von Kombinationstherapien reduziert werden.

4.1.3. Zweiphasige Dosiswirkungskurve durch ZD1839

Wie bereits unter 3.1.2. beschrieben zeigte ZD1839 bei der Zelllinie FTC-133 eine zweiphasige Dosiswirkungskurve mit einer maximalen Hemmung der Zellproliferation bei 4 μ M und 10 μ M. Diese Eigenschaft wurde bisher vornehmlich bei endogenen Inhibitoren der Angiogenese beschrieben (Endostatin, Angiostatin, Thrombospondin) und anhand von Endothelzellen demonstriert. Hier zeigte sich eine optimale Hemmung der Endothelzellproliferation und -migration in niedrigen und hohen Konzentrationsbereichen von z.B. Endostatin. Die Effekte konnten sowohl in vitro als auch in vivo nachgewiesen werden (Benelli et al., 2003; Celik et al., 2005; Motegi et al., 2002). Eine lineare Dosiswirkungskurve vorausgesetzt, wird in der medikamentösen Krebstherapie üblicherweise die maximal verträgliche Wirkstoffdosis eingesetzt. Bei Vorliegen einer zweiphasigen Dosiswirkungskurve könnte eine zwischen den Wirkmaxima gewählte Dosierung fehlende Wirksamkeit vortäuschen. Die Tatsache das ZD1839 eine zweiphasige Dosiswirkungskurve nur bei der follikulären Schilddrüsenkarzinomzelllinie FTC-133 aufweist macht deutlich, dass einheitliche Medikamentendosierungen nicht für jede Tumorentität gleich wirksam sein müssen. Ob der oben beschriebene Effekt auf FTC-133-Zellen auch in vivo nachzuweisen ist muss in weiteren Experimenten untersucht werden. Der Mechanismus zur Ausbildung einer zweiphasigen Dosiswirkungskurve durch ZD1839 bleibt derzeit ungeklärt und muss durch weitere Studien evaluiert werden.

4.2. VEGF-Sekretion

4.2.1. EGF-Effekt auf die VEGF-Sekretion

Alle in dieser Studie untersuchten Zelllinien zeigten, wie unter 3.2.1. beschrieben, eine basale Sekretion des vaskulär endothelialen Wachstumsfaktors. Die höchste basale Sekretion zeigte hier die papilläre Zelllinie TPC-1, gefolgt von der follikulären Zelllinie FTC-133 und den anaplastischen C643- und Hth74-Zellen. Die Stimulation mit 10ng/ml EGF führte in allen Zelllinien zu einer gesteigerten VEGF-Sekretion. Eine andere Studie der eigenen Arbeitsgruppe untersuchte die basale VEGF-Sekretion an einer größeren Zahl verschiedener Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms. Je nach Histiotyp zeigten sich teilweise deutliche Unterschiede in der basalen VEGF-Sekretion, die durch

zusätzliche EGF-Stimulation um das bis zu 20-fache gesteigert werden konnte und somit die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigt (Hoffmann et al., 2007). Fakt ist, dass der VEGF-Rezeptor nicht nur auf tumorassoziierten Endothelzellen exprimiert wird, sondern auch auf Epithelzellen des Schilddrüsenkarzinoms und anderen Tumorentitäten. Der vaskulär endotheliale Wachstumsfaktor scheint hierbei im Sinne eines autokrinen Loop in der frühen Karzinogenese des Schilddrüsenkarzinoms eine wichtige Rolle zu spielen (höhere VEGF-Level in differenzierten Karzinomen). Mit zunehmender Dedifferenzierung (geringere VEGF-Level) scheinen jedoch andere Wachstumsfaktoren wie z.B. EGF eine entscheidendere Rolle in der weiteren Tumorigenese zu spielen (Maity et al., 2000; Vieira et al., 2005). Die VEGF-Sekretion wird durch EGF-Stimulation erhöht, des Weiteren wird die Migration von Endothelzellen über autokrine Aktivierung des EGF-Rezeptors gesteigert (Semino et al., 2006).

4.2.2. Hemmung der VEGF-Sekretion durch ZD1839 und ZD6474

Wie bereits unter 3.2. ausführlich beschrieben konnte die basale VEGF-Sekretion durch beide Tyrosinkinaseinhibitoren nur in der Zelllinie TPC-1 dosisabhängig reduziert werden. Die IC₅₀ wurde mit den hier gewählten Endkonzentrationen von ZD1839 und ZD6474 nicht erreicht. Die durch EGF-stimulierte VEGF-Sekretion konnte in Abhängigkeit von Zelllinie und TKI um etwa 10% bis 47% bzw. nahezu 100% (Hth74) inhibiert werden. Bezogen auf die EGF-induzierte Mehrsekretion von VEGF konnte diese durch beide Substanzen gehemmt werden. Die Kombination beider TKI führte einzig bei der Zelllinie TPC-1 zu einem synergistischen Effekt mit einer um 18,7% erhöhten VEGF-Reduktion im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. Als Besonderheit zeigte vor allem die Zelllinie FTC-133 eine Zunahme der basalen VEGF-Sekretion unter Inkubation mit ZD1839 und ZD6474.

Eine Studie an vier hochmalignen Harnblasenkarzinomzelllinien untersuchte die Wirkung von ZD1839 auf die VEGF-Sekretion. Zwei der untersuchten Zelllinien (253JB-V und UMUC-13) zeigten eine dosisabhängige Reduktion der VEGF-Sekretion, während die Zelllinien KU-7 und UMUC-3 eine gleichbleibende VEGF- bzw. zunehmende VEGF-Sekretion zeigten. Die Zelllinien 253JB-V und UMUC-13 wurden anschließend mit verschiedenen Inhibitoren zytoplasmatischer Signaltransduktionswege behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des PI3K/Akt-

Signaltransduktionsweges gegenüber der Inhibition des MAPK-Signalweges zu einer stärkeren Reduktion der VEGF-Sekretion führte. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte man nachweisen, dass ZD1839 die Phosphorylierung von Akt signifikant inhibierte (Kassouf et al., 2008). Ciardiello wiederum zeigte, dass bei Kolonkarzinomzelllinien mit einer Resistenz gegenüber ZD1839 eine erhöhte Aktivierung der MAP-Kinase konsekutiv in einer erhöhten VEGF-Sekretion resultiert und hier der Akt-Signaltransduktionsweg eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint (Ciardiello et al., 2004). Unabhängig von simultaner EGF-Stimulation und konsekutiv erhöhter VEGF-Sekretion sind nachgeschaltete zytoplasmatische Signaltransduktionswege wie der PI3K/Akt- und der MAPK-Signalweg maßgeblich an der Regulation der VEGF-Expression beteiligt. Des Weiteren scheint der VEGF-Rezeptorstatus in Hinblick auf die Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren eine Rolle zu spielen. So konnte an MS-1-L-Zellen des kleinzelligen Bronchialkarzinoms mit fehlender VEGFR-2-Expression gezeigt werden, dass Inkubation mit ZD6474 zu signifikant erhöhter VEGF-Sekretion führt und eine Reduktion des Tumolvolumens oder der Mikrogefäßanzahl in vivo nicht nachzuweisen ist (Sasaki et al., 2008). Neoangiogenese ist, wie oben erwähnte präklinische Studien zeigen, ein multifaktorieller Prozess mit hoher Signaldiversität und autokrinen Aktivierungsmechanismen, der nicht allein abhängig von VEGF ist. Inwieweit die Ergebnisse der oben genannten Studien therapeutische Relevanz besitzen muss letztlich noch nachgewiesen werden. Mittlerweile werden mehrere Tyrosinkinaseinhibitoren und monoklonale Antikörper in der antiangiogenen Therapie eingesetzt. Bereits 2004 wurde Bevacizumab (monoklonaler Antikörper der durch Bindung an VEGF das Andocken an den VEGF-Rezeptor verhindert) in der Therapie des metastasierten kolorektalen Karzinoms zugelassen. Durch direkte Bindung an VEGF scheint somit eine erhöhte VEGF-Expression, wie sie z.B. durch TKI verursacht werden kann, kein klinisches Problem darzustellen. Zu den seit 2006 zugelassenen Tyrosinkinaseinhibitoren gehört unter anderem Sorafenib (Therapie des hepatozellulären Karzinoms und bei fortgeschrittenen Nierenzellkarzinomen) und Sunitinib (Therapie des Nierenzellkarzinoms und von gastrointestinalen Stromatumoren). ZD6474 ist derzeit Gegenstand mehrerer Phase II- und III-Studien in der antiangiogenen Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms (NSCLC). Weitere Studien untersuchen ausserdem die Wirkung verschiedener monoklonaler Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren in Phase II- und III-Studien. Einen Überblick laufender und

bereits abgeschlossener Studien in der antiangiogenen Therapie geben Eichholz et al., 2010 sowie Scagliotti und Govindan, 2010.

Die Ergebnisse der eigenen Studie zeigen, dass ZD1839 und ZD6474 in den hier untersuchten Schilddrüsenkarzinomzelllinien die ligandeninduzierte- und partiell auch die basale VEGF-Sekretion hemmen können. Zusammen mit den Ergebnissen der Western Blot-Analysen (Vgl. 3.3.1.2. und 3.3.2.2.), die eine dosisabhängige Inhibition des phosphorylierten VEGF-Rezeptors in allen untersuchten Zelllinien nachweisen konnten, stellen ZD1839 und ZD6474 potente Inhibitoren von Signaltransduktionskaskaden (siehe auch 4.3.) der Neoangiogenese dar.

4.3. Western Blot-Analysen

Die transmembranösen EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie die zytosolische Akt und MAP-Kinase ließen sich in allen untersuchten Zelllinien nachweisen. Einzig der EGF-Rezeptor zeigte sich auf den anaplastischen Tumorzellen im Vergleich zu den differenzierten Zellen schwächer exprimiert. Des Weiteren wurde nach EGF-Stimulation einzig beim EGF-Rezeptor eine erhöhte Expression bei allen Zelllinien beobachtet. EGFR-Überexprimierung konnte in mehreren Tumorentitäten (NSCLC, Kopf-Hals-Tumoren, Mammakarzinome, Harnblasenkarzinome) nachgewiesen werden und korrelierte dort mit aggressiverem Tumorverhalten. Bezüglich der Überexprimierung des EGF-Rezeptors in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen bestehen in der Literatur stark abweichende Angaben, welche von normaler bis hoher EGFR-Exprimierung reichen. Aktivierende Mutationen im EGF-Rezeptor wurden bei den in folgenden Studien untersuchten anaplastischen, papillären, follikulären, und medullären Schilddrüsenkarzinomen nicht nachgewiesen (Cheifetz et al., 1994; Elliott et al., 2008; Lee et al., 2007; Makinen et al., 1988). Eine Studie an 25 anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen einschließlich drei wenig differenzierter Karzinome (intermediärer Differenzierungsgrad zwischen anaplastisch und differenziert) zeigte, dass 40% der untersuchten Tumore eine erhöhte EGF-R-Expression aufwiesen. Die Karzinome, die teilweise höher differenzierte Tumoranteile aufwiesen, zeigten interessanterweise zu 100% eine Überexprimierung des EGF-Rezeptors (Ensinger et al., 2004). Dasselbe Phänomen konnte McKay et al., 2002 auch bei kolorektalen Karzinomen beobachten: Tumoren mit höherem Differenzierungsgrad wiesen häufiger eine Überexprimierung des EGF-Rezeptors (in 87,5% der Fälle) auf als solche mit

zunehmender Dedifferenzierung (33,3% aller Fälle). Beide Studien zeigen, dass Verlust des Differenzierungsgrades mit einer verminderten Expression des EGF-Rezeptors einhergehen kann und bestätigen damit die eigenen Ergebnisse.

EGFR-Inhibitoren wie z.B. ZD1839 oder Cetuximab werden in der Literatur als geeignete Therapieoptionen bei Tumoren mit erhöhter EGFR-Expression postuliert. Die hier gefundenen Ergebnisse zeigen, dass gerade die anaplastischen Zelllinien (Hth74 und C643) mit schwacher Expression des EGF-Rezeptors durch ZD1839 dosisabhängig einer stärkeren Downregulation als die differenzierten Karzinome mit höherer EGFR-Expression unterliegen. Bei einer Zelllinie des Kolonkarzinom (Caco-2) wurde nachgewiesen, dass ZD1839 zu einer Verminderung der ErbB-2 mRNA führt (Giannopoulou et al., 2009). Diese Studie könnte die Theorie stützen, dass ZD1839 und möglicherweise auch ZD6474 zu einer verminderten EGFR mRNA-Expression in den hier untersuchten Zelllinien führt und somit auch zu einer Downregulation des Rezeptors auf der Zellmembran. Quantitative Untersuchungen wie z.B. die real time PCR (Polymerase Chain Reaction), welche eine verminderte EGFR mRNA nachweisen könnte, wurden in dieser Studie nicht durchgeführt.

Der phosphorylierte, aktivierte EGF-Rezeptor konnte unter basalen Bedingungen nur bei der Zelllinie TPC-1 nachgewiesen werden. Die Zelllinien C643, Hth74 und FTC-133 zeigten eine ligandeninduzierte-(EGF)-Aktivierung. Die bei manchen nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen nachgewiesene aktivierende EGFR-Mutation (Exon 18-21) mit konsekutiver Aktivierung nachfolgender Signaltransduktionswege konnte auch in papillären Schilddrüsenkarzinomen japanischer Patienten (Beschreiber der hier verwendeten Zelllinie TPC-1: Tanaka et al., 1987 Japan) gefunden werden. Wie bereits unter 1.3.1. geschildert zeigen nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome mit aktivierender EGFR-Mutation gegenüber nicht mutierten EGF-Rezeptoren eine vielfach höhere Sensitivität gegenüber EGFR-Inhibitoren wie z.B. ZD1839. Mehrere Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass EGFR-Mutanten eine liganden-unabhängige Tyrosinkinaseaktivität und anhaltende Aktivität nach Ligandenstimulation aufweisen. Zellen, die eine EGFR-Mutation aufweisen, induzieren Transkriptionsfaktoren, die anti-apoptotische Signalwege wie z.B. Akt aktivieren. Supprimierung dieser Überlebenssignale durch Inhibitoren führen zu rascher Apoptose, da diese Zellen abhängig von den ausgesendeten Signalen der mutierten EGF-Rezeptoren sind (Masago et al., 2009; Sordella et al., 2004). Die in der eigenen Studie gefundenen Ergebnisse könnten auf eine aktivierende EGFR-Mutation in der hier untersuchten Zelllinie TPC-1 hinweisen

und damit auch das durchweg höhere Ansprechen auf beide untersuchten Substanzen ZD1839 und ZD6474 im Vergleich zu den anderen Zelllinien erklären. Meireles et al., 2007 konnten diese aktivierende EGFR-Mutation in den entsprechenden „hot spot“ Regionen jedoch nicht nachweisen. Ein Zusammenhang zwischen RET-Mutationen und aktivierender EGFR-Mutation ist bisher nicht beschrieben, könnte aber eine Erklärung für liganden-unabhängige Phosphorylierung des EGF-Rezeptors sein. Es konnte gezeigt werden, dass intrazelluläre Signalwege wie der PI3K/Akt- und MAPK-Signalweg durch RET aktiviert werden (Asai et al., 2006). Unabhängig von einer EGFR-Mutation erklärt die ebenfalls bei TPC-1 gefundene Mutation im RET-Gen (siehe 4.1.2.) die in den Western Blot-Analysen gefundene liganden-unabhängige Aktivität von phospho-Akt und -MAPK. Der phosphorylierte VEGF-Rezeptor sowie pAkt und pMAPK ließen sich durch beide TKI dosisabhängig inhibieren, wobei ZD6474 die höhere Wirksamkeit erbrachte. Dieser Effekt war bei der Zelllinie TPC-1 am stärksten ausgeprägt.

Der phosphorylierte VEGF-Rezeptor zeigte ohne zusätzliche EGF-Stimulation Aktivität in den Zelllinien C643, FTC-133 und wie bereits erwähnt in der Zelllinie TPC-1. Die anaplastische Zelllinie Hth74 zeigte hingegen eine EGF-abhängige Aktivierung. Der Zusammenhang zwischen erhöhter VEGF-Sekretion und autokriner VEGFR-Stimulation wurde bereits unter 4.2. diskutiert. Die Ausprägung der in den Western Blot-Analysen gefundenen Banden des phosphorylierten VEGF-Rezeptors korrelierte in etwa mit der in den ELISA-Untersuchungen nachgewiesenen basalen VEGF-Sekretionen. Die Zelllinie Hth74, die basal eine nur sehr geringfügige VEGF-Sekretion in den ELISA-Untersuchungen aufwies, zeigte in den Western Blot-Analysen eine liganden-abhängige Phosphorylierung und konnte analog den Experimenten zur VEGF-Sekretion auch am stärksten durch beide Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt werden. Bezogen auf alle Zelllinien zeigte ZD6474 gegenüber ZD1839 eine etwas stärkere Inhibition der VEGFR-Phosphorylierung. Die Ergebnisse stützen die in der eigenen Arbeitsgruppe gefundenen Untersuchungen mit AEE788. Im Vergleich zu der reinen EGFR-Inhibition durch den monoklonalen EGFR-Antikörper Cetuximab, zeichnet sich dieser ebenfalls duale Tyrosinkinaseinhibitor durch eine stärkere Inhibition der VEGF-Sekretion und Zellproliferation aus (Hoffmann et al., 2007). Des Weiteren lassen die gefundenen Ergebnisse vermuten, dass auch ZD1839 einen dualen Tyrosinkinaseinhibitor darstellt.

Die in vorliegender Studie untersuchten nachgeschalteten zytoplasmatischen Effektorproteine wie die MAP- und Proteinkinase B (Akt) zeigten sich in allen

Zelllinien liganden-unabhängig phosphoryliert. Eine Aktivitätssteigerung durch EGF ließ sich zelllinienabhängig beobachten. Beide hier untersuchten Tyrosinkinaseinhibitoren zeigten nur geringfügige hemmende Wirkung auf die phosphorylierten Effektoren. Einzig bei der Zelllinie FTC-133 blieb die phosphorylierte Proteinkinase B (Akt) nach Behandlung mit ZD1839 und ZD6474 gänzlich unbeeinflusst (siehe 3.3.1.3. und 3.3.2.3.). Der Verlust der Proteinexpression des Tumorsuppressorgens PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) korreliert invers mit dem Aktivitätsstatus von Akt (phosphorylierte Form). Die in dieser Arbeit verwendeten FTC-133 Zellen weisen einen vollständigen Verlust der PTEN-Proteinexpression mit konsekutiver Aktivierung von Akt auf. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die Nichtansprechbarkeit von Akt in FTC-133 Zellen darstellen (Weng et al., 2001).

Wie bereits unter 1.1.2.3. erwähnt, wird über Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 und den Ras/Raf-MAPK- und PI3K/Akt-Signaltransduktionswegen in anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen berichtet. In vielen Studien sind Mutationsanalysen von zellmembranebundenen Rezeptoren nicht einbezogen. Eine große Studie untersuchte 51 anaplastische und 64 follikuläre Schilddrüsenkarzinome auf die erwähnten Mutationen, schloss unter anderem auch Analysen zum EGF-, PDGF- und VEGF-Rezeptor mit ein. Mindestens eine genetische Alteration konnte in 95,8% der anaplastischen und 93,2% der follikulären Karzinome gefunden werden. Diese schlossen unter anderem Mutationen ein, die befähigt sind den PI3K/Akt- und MAPK-Signalweg gleichzeitig zu aktivieren (z.B. RAS-Mutationen). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Zunahme der Genkopien in Rezeptortyrosinkinasen (hier EGFR) zu aktivierter, also phosphorylierter Form der Proteinkinase B (Akt) und Erk1/2 (MAPK) führte (Liu et al., 2008).

Wie bereits beschrieben wurden für das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom aktivierende Mutationen im EGF-Rezeptor nachgewiesen. Amann et al. zeigten 2005 anhand verschiedener Zelllinien des NSCLC, dass eine Zunahme an Genkopien ohne gleichzeitige EGFR-Mutation ebenfalls zu einer höheren Sensitivität gegenüber ZD1839 führt. Western Blot-Analysen konnten dabei sowohl bei der aktivierenden EGFR-Mutation als auch bei den Zellen, die nur eine Zunahme der Genkopien aufwiesen, eine liganden-unabhängige Phosphorylierung von Akt und MAPK nachweisen. Wenngleich Meireles et al., 2007 in den hier untersuchten anaplastischen Zelllinien keine aktivierende Mutation im EGF-Rezeptor nachweisen konnte (C643 nicht auf EGFR-Mutation untersucht), wurden bei beiden Zelllinien Mutationen in H-

RAS und dem THRB-Gen und im Falle von C643 ebenfalls im p53-Gen gefunden. Mutationen im THRB-Gen (kodiert für T3-Bindungsrezeptoren) mit konsekutiver Mutation des Proteinproduktes können zur Ausbildung eines Schilddrüsenkarzinoms und Überaktivierung des PI3K/Akt-Signalweg führen (Guigon und Cheng, 2009). Inwiefern die gefundenen Mutationen in Zusammenhang mit der in dieser Studie nachgewiesenen liganden-unabhängigen Aktivierung zytoplasmatischer Proteine stehen bleibt unklar und muss durch weitere Experimente (z.B. Nachweis zunehmender Genkopien) verifiziert werden.

4.4. Ausblick

Intensive Forschungen im Bereich der Molekularbiologie haben zu einem besseren Verständnis der Tumorigenese geführt. Die enorme Vielzahl an komplexen biochemischen und physikalischen Vorgängen innerhalb der Zelle machen es jedoch extrem schwierig ein Patentrezept für die Bekämpfung maligner Erkrankungen zu finden. Mit der Entwicklung von monoklonalen Antikörpern und „small molecules“ wurde der Begriff der zielgerichteten Therapie geprägt. Dennoch dominiert unter den konservativen Therapieverfahren die konventionelle Chemotherapie die Behandlung von Krebserkrankungen. Aus der anfänglichen Euphorie neuer Therapieoptionen durch Tyrosinkinaseinhibitoren erwachsen therapieerschwerende Faktoren. Hierzu zählt die primäre oder sekundäre Resistenz gegenüber neueren Substanzen, so dass erneut „multimodale Therapiekonzepte“ entstanden. Im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie ermöglichen neuere Substanzen eine wesentlich zielgerichtetere Strategie, z.B. gegen einzelne Rezeptoren. In den letzten Jahren wurde jedoch deutlich, dass die gleichzeitige antitumorale Therapie auf verschiedenen Ebenen der zellulären Einheit weitaus effektiver ist. Anhand der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass wenig differenzierte Schilddrüsenkarzinome durch „small molecules“ in vitro gut zu kontrollieren sind. Dabei wurde ersichtlich, dass ein dualer Inhibitor gegen den EGF- und VEGF-Rezeptor über höhere antitumorale Fähigkeiten verfügt als ein EGFR-Inhibitor. Die Kombination der hier untersuchten Tyrosinkinaseinhibitoren führte sogar zu einer noch effektiveren Hemmung. Aufgrund der geringen Inzidenz des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms gibt es nur sehr wenige klinische Studien, in denen neuere Substanzen wie Tyrosinkinaseinhibitoren an betroffenen Patienten untersucht werden können. Eine weitere Erschwernis für das Rekrutieren von Patienten

wird durch das sehr aggressive Wachstum und die nur kurze Überlebensdauer bei Diagnosestellung bedingt. Am häufigsten treten anaplastische Schilddrüsenkarzinome im hohen Alter auf und entwickeln sich meist aus zuvor differenzierten Karzinomen. In zwei aktuellen Fallstudien zeigten jedoch zwei junge Patienten (26 jährige Frau und 32 jähriger Mann) ohne Anamnese bezüglich einer Knotenstruma oder Strahlenbelastung bereits ein anaplastisches Karzinom (Patel et al., 2009; Pichardo-Lowden et al., 2009). In einer Phase-II-Studie aus dem Jahr 2008 wurden 27 Patienten mit fortgeschrittenem Schilddrüsenkarzinom (Metastasen, Nichtansprechen auf eine Radiojodtherapie, anaplastische Karzinome und andere histologische Typen) mit ZD1839 therapiert. In 32% der Fälle zeigte sich eine Tumorreduktion, die gemessen an den RECIST-Kriterien (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) jedoch nicht einer partiellen Remission entsprach (Pennell et al., 2008). Die Kombinationstherapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren (Sorafenib), die an verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen wirken (VEGF-R, Raf-1, PDGFR etc.), konnte in einer Phase-I-Studie beim fortgeschrittenen metastasierten (verschiedene histologische Typen) sowie anaplastischen Schilddrüsenkarzinom eine hohe Rate an partieller Remission (RECIST) und prolongiertem stabilen Tumorleiden verzeichnen. Des Weiteren zeigte die zielgerichtete Therapie gegenüber der konventionellen Chemotherapie einen signifikant verlängerten stabilen Erkrankungszustand bis zu erneuter Progression, wobei das Ansprechen anaplastischer Karzinome gegenüber anderer histologischer Typen geringfügiger war (Tsimberidou et al., 2009). Mittlerweile werden eine Vielzahl von Tyrosinkinaseinhibitoren in klinischen Phase I- und II-Studien evaluiert, unter anderem ZD1839 mit Schwerpunkt auf papilläre und anaplastische Schilddrüsenkarzinome sowie ZD6474 mit Schwerpunkt auf medulläre und differenzierte Schilddrüsenkarzinome. Einen Überblick aktueller Substanzen und Studienergebnisse gibt Sherman, 2010. Anhand dieser Studien wird ersichtlich, dass Monotherapien keine guten klinischen Ergebnisse erzielen und dass die Kombinationstherapie erfolgsversprechender zu sein scheint, wobei allerdings keine Kombinationstherapie mit einem EGFR-Inhibitor durchgeführt wurde.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bereits mehrere Tyrosinkinaseinhibitoren in vivo untersucht, darunter Cetuximab, AEE788, ZD1839 und ZD6474. Unter diesen EGFR- und VEGFR-targetierenden Substanzen zeigte die Kombination von ZD1839 und ZD6474 den effektivsten antiproliferativen Effekt sowie die größte Reduktion des Tumolvolumens und der Gefäßdichte im Tumorgewebe (Daten noch nicht publiziert).

Der derzeitige Schwerpunkt der Untersuchungen liegt in der Kombination von EGFR- und VEGFR-Inhibitoren mit Substanzen, die aktivierte Signalwege beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom hemmen (z.B. Aurorakinasen, Serinkinasen).

5. Zusammenfassung

Das Schilddrüsenkarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der endokrinen Organsysteme. Für gut differenzierte Schilddrüsenkarzinome wie das papilläre oder follikuläre Karzinom existieren sehr gute Therapieoptionen, die ein 10-Jahresüberleben von bis zu 98% ermöglichen. Mit zunehmender Dedifferenzierung verschlechtern sich jedoch die Therapiemöglichkeiten, da die entsprechenden Tumorzellen ihre Fähigkeit zur Teilnahme am Jodstoffwechsel verlieren und somit einer Radiojodtherapie nicht mehr zugänglich sind. Als komplett entdifferenzierter Histiotyp steht am Ende das anaplastische Schilddrüsenkarzinom, welches zu den hoch aggressiven Tumoren zählt und mit nur schlechten Therapieoptionen und einer Überlebenszeit von wenigen Monaten nach Diagnosestellung einhergeht.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit zweier Tyrosinkinaseinhibitoren (ZD1839 und ZD6474) anhand verschiedener Histiotypen des Schilddrüsenkarzinoms *in vitro* evaluiert. Dabei wurde der Effekt auf die Zellproliferation, die VEGF-Sekretion sowie die Wirkung an membrangebundenen- und zytoplasmatischen Rezeptoren mit Tyrosinkinaseaktivität untersucht. Beide Substanzen wurden jeweils einzeln und in Kombination getestet. Gemessen an der Zellproliferation zeigten beide Substanzen einen starken antiproliferativen Effekt. Die Kombination beider Substanzen führte je nach Histiotyp sogar zu einer Verdoppelung der antiproliferativen Wirkung. In den Analysen zur VEGF-Sekretion konnten beide Substanzen die ligandeninduzierte VEGF-Sekretion um bis zu 100% reduzieren. Die Kombinationsversuche zeigten in diesen Versuchsreihen keine synergistischen Effekte. In den Western Blot-Analysen wurde nach Inkubation der Zellen mit ZD1839 bzw. ZD6474 eine Verminderung bzw. Hemmung der Aktivität der phosphorylierten membrangebundenen Rezeptoren (EGF-R und VEGF-R) beobachtet, wobei die nachgeschalteten zytoplasmatischen Rezeptoren je nach Histiotyp und Substanz aber ein geringeres Ansprechen aufwiesen. Des Weiteren ließ sich durch beide Substanzen eine dosisabhängige Downregulation des nicht-phosphorylierten EGF-Rezeptors erzielen.

ZD6474 wird in der Literatur als dualer Tyrosinkinaseinhibitor beschrieben. Die Ergebnisse dieser Studie weisen jedoch auch für ZD1839 auf eine Wirksamkeit am EGF- und VEGF-Rezeptor sowie auf nachgeschaltete zytoplasmatische Rezeptortyrosinkinasen hin. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Kombination zweier Tyrosinkinaseinhibitoren einen stärkeren antitumoralen Effekt aufweist. Die hier

gefundenen in vitro-Ergebnisse werden durch die in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführten in vivo-Untersuchungen gestützt. Diese bestätigen, dass die Kombination von ZD1839 und ZD6474 im Gegensatz zur Monotherapie die effektivere Therapieform darstellt.

Die Wirksamkeit von Tyrosinkinaseinhibitoren wurde bereits an mehreren Tumorentitäten in klinischen Studien nachgewiesen. Die hier gefundenen Ergebnisse in Zusammenschau mit den bereits durchgeführten in vivo-Studien eröffnen eine mögliche Therapieoption beim fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinom.

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

- Ain, K. B. (1999). "Anaplastic thyroid carcinoma: a therapeutic challenge." Semin Surg Oncol 16(1): 64-9.
- Albanell, J., F. Rojo, et al. (2001). "Pharmacodynamic studies with the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839." Semin Oncol 28(5 Suppl 16): 56-66.
- Amann, J., S. Kalyankrishna, et al. (2005). "Aberrant epidermal growth factor receptor signaling and enhanced sensitivity to EGFR inhibitors in lung cancer." Cancer Res 65(1): 226-35.
- Amin, D. N., D. R. Bielenberg, et al. (2008). "Targeting EGFR activity in blood vessels is sufficient to inhibit tumor growth and is accompanied by an increase in VEGFR-2 dependence in tumor endothelial cells." Microvasc Res 76(1): 15-22.
- Asai, N., M. Jijiwa, et al. (2006). "RET receptor signaling: dysfunction in thyroid cancer and Hirschsprung's disease." Pathol Int 56(4): 164-72.
- Benelli, R., M. Morini, et al. (2003). "Angiostatin inhibits extracellular HIV-Tat-induced inflammatory angiogenesis." Int J Oncol 22(1): 87-91.
- Blume-Jensen, P. and T. Hunter (2001). "Oncogenic kinase signalling." Nature 411(6835): 355-65.
- Boone, R. T., C. Y. Fan, et al. (2003). "Well-differentiated carcinoma of the thyroid." Otolaryngol Clin North Am 36(1): 73-90, viii.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem 112(2): 195-203.
- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science 296(5573): 1655-7.
- Caponigro, F., R. Formato, et al. (2005). "Monoclonal antibodies targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor with a focus on head and neck tumors." Curr Opin Oncol 17(3): 212-7.

-
- Carlomagno, F., D. Vitagliano, et al. (2002). "ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases." Cancer Res 62(24): 7284-90.
 - Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med 9(6): 653-60.
 - Carpenter, G. and S. Cohen (1976). "125I-labeled human epidermal growth factor. Binding, internalization, and degradation in human fibroblasts." J Cell Biol 71(1): 159-71.
 - Celik, I., O. Surucu, et al. (2005). "Therapeutic efficacy of endostatin exhibits a biphasic dose-response curve." Cancer Res 65(23): 11044-50.
 - Cheifetz, R. E., N. L. Davis, et al. (1994). "Differentiation of thyroid neoplasms by evaluating epithelial membrane antigen, Leu-7 antigen, epidermal growth factor receptor, and DNA content." Am J Surg 167(5): 531-4.
 - Ciardiello, F., R. Bianco, et al. (2004). "Antitumor activity of ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in human cancer cells with acquired resistance to antiepidermal growth factor receptor therapy." Clin Cancer Res 10(2): 784-93.
 - Ciardiello, F., R. Caputo, et al. (2003). "Antitumor effects of ZD6474, a small molecule vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase." Clin Cancer Res 9(4): 1546-56.
 - Ciardiello, F. and G. Tortora (2008). "EGFR antagonists in cancer treatment." N Engl J Med 358(11): 1160-74.
 - Cohen, S., G. Carpenter, et al. (1980). "Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity." J Biol Chem 255(10): 4834-42.
 - Crespo, P. and J. Leon (2000). "Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation." Cell Mol Life Sci 57(11): 1613-36.
 - D'Avanzo, A., P. Treseler, et al. (2004). "Follicular thyroid carcinoma: histology and prognosis." Cancer 100(6): 1123-9.
 - Downward, J. (1998). "Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt." Curr Opin Cell Biol 10(2): 262-7.
 - Downward, J. (1998). "Ras signalling and apoptosis." Curr Opin Genet Dev 8(1): 49-54.

-
- Eichholz, A., S. Merchant, et al. (2010). "Anti-angiogenesis therapies: their potential in cancer management." Onco Targets Ther **3**: 69-82.
 - Elliott, D. D., S. I. Sherman, et al. (2008). "Growth factor receptors expression in anaplastic thyroid carcinoma: potential markers for therapeutic stratification." Hum Pathol **39**(1): 15-20.
 - Engvall, E. and P. Perlmann (1972). "Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes." J Immunol **109**(1): 129-35.
 - Ensinger, C., G. Spizzo, et al. (2004). "Epidermal growth factor receptor as a novel therapeutic target in anaplastic thyroid carcinomas." Ann N Y Acad Sci **1030**: 69-77.
 - Fagin, J. A., K. Matsuo, et al. (1993). "High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas." J Clin Invest **91**(1): 179-84.
 - Ferrara, N. (1999). "Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor." J Mol Med **77**(7): 527-43.
 - Ferrara, N. (2005). "VEGF as a therapeutic target in cancer." Oncology **69** Suppl 3: 11-6.
 - Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.
 - Folkman, J. (1990). "What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?" J Natl Cancer Inst **82**(1): 4-6.
 - Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." Nat Med **1**(1): 27-31.
 - Garcia-Sainz, J. A., M. T. Romero-Avila, et al. (2010). "Dissecting how receptor tyrosine kinases modulate G protein-coupled receptor function." Eur J Pharmacol **648**(1-3): 1-5.
 - Giannelli, G., C. Sgarra, et al. (2008). "EGFR and VEGFR as potential target for biological therapies in HCC cells." Cancer Lett **262**(2): 257-64.
 - Giannopoulou, E., A. Antonacopoulou, et al. (2009). "Dual targeting of EGFR and HER-2 in colon cancer cell lines." Cancer Chemother Pharmacol **63**(6): 973-81.
 - Guigon, C. J. and S. Y. Cheng (2009). "Novel non-genomic signaling of thyroid hormone receptors in thyroid carcinogenesis." Mol Cell Endocrinol **308**(1-2): 63-9.

-
- Hanahan, D. and J. Folkman (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell 86(3): 353-64.
 - Heldin, C. H. (1995). "Dimerization of cell surface receptors in signal transduction." Cell 80(2): 213-23.
 - Heldin, N. E. and B. Westermark (1991). "The molecular biology of the human anaplastic thyroid carcinoma cell." Thyroidology 3(3): 127-31.
 - Herbst, R. S. (2002). "ZD1839: targeting the epidermal growth factor receptor in cancer therapy." Expert Opin Investig Drugs 11(6): 837-49.
 - Herbst, R. S., J. V. Heymach, et al. (2007). "Vandetanib (ZD6474): an orally available receptor tyrosine kinase inhibitor that selectively targets pathways critical for tumor growth and angiogenesis." Expert Opin Investig Drugs 16(2): 239-49.
 - Hoelting, T., A. Zielke, et al. (1994). "Aberrations of growth factor control in metastatic follicular thyroid cancer in vitro." Clin Exp Metastasis 12(4): 315-23.
 - Hoffmann, S., L. C. Hofbauer, et al. (2004). "Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors." J Clin Endocrinol Metab 89(12): 6139-45.
 - Hoffmann, S., A. Burchert, et al. (2007). "Differential effects of cetuximab and AEE 788 on epidermal growth factor receptor (EGF-R) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGF-R) in thyroid cancer cell lines." Endocrine 31(2): 105-13.
 - Hunter, T. (2000). "Signaling--2000 and beyond." Cell 100(1): 113-27.
 - Hwang, J. H., D. W. Kim, et al. (2003). "Activation of signal transducer and activator of transcription 3 by oncogenic RET/PTC (rearranged in transformation/papillary thyroid carcinoma) tyrosine kinase: roles in specific gene regulation and cellular transformation." Mol Endocrinol 17(6): 1155-66.
 - Imai, K. and A. Takaoka (2006). "Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer." Nat Rev Cancer 6(9): 714-27.
 - Ishizaka, Y., T. Ushijima, et al. (1990). "cDNA cloning and characterization of ret activated in a human papillary thyroid carcinoma cell line." Biochem Biophys Res Commun 168(2): 402-8.

-
- Kassouf, W., G. A. Brown, et al. (2008). "Is vascular endothelial growth factor modulation a predictor of the therapeutic efficacy of gefitinib for bladder cancer?" J Urol 180(3): 1146-53.
 - Kessler, T., M. Bayer, et al. (2010). "Compounds in clinical Phase III and beyond." Recent Results Cancer Res 180: 137-63.
 - Kim, E. M., C. Lobocki, et al. (2009). "A specific vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor enhances the antiproliferative effect of trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2 overexpressing breast cancer cell lines." Am J Surg 197(3): 331-6.
 - Kimura, E. T., M. N. Nikiforova, et al. (2003). "High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma." Cancer Res 63(7): 1454-7.
 - Krebs in Deutschland. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006.
 - Köhrle, J. (2004). "Guard your master: thyroid hormone receptors protect their gland of origin from thyroid cancer." Endocrinology 145(10): 4427-9.
 - Lee, D. H., G. K. Lee, et al. (2007). "Epidermal growth factor receptor status in anaplastic thyroid carcinoma." J Clin Pathol 60(8): 881-4.
 - Liu, Z., P. Hou, et al. (2008). "Highly prevalent genetic alterations in receptor tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase/akt and mitogen-activated protein kinase pathways in anaplastic and follicular thyroid cancers." J Clin Endocrinol Metab 93(8): 3106-16.
 - Luo, J., B. D. Manning, et al. (2003). "Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise." Cancer Cell 4(4): 257-62.
 - Maity, A., N. Pore, et al. (2000). "Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia." Cancer Res 60(20): 5879-86.
 - Makinen, T., F. Pekonen, et al. (1988). "Receptors for epidermal growth factor and thyrotropin in thyroid carcinoma." Acta Endocrinol (Copenh) 117(1): 45-50.

-
- Martinelli, E., T. Troiani, et al. (2010). "Synergistic Antitumor Activity of Sorafenib in Combination with Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Colorectal and Lung Cancer Cells." Clin Cancer Res **16**(20): 4990-5001.
 - Masago, K., R. Asato, et al. (2009). "Epidermal growth factor receptor gene mutations in papillary thyroid carcinoma." Int J Cancer **124**(11): 2744-9.
 - McCarty, M. F., J. Wey, et al. (2004). "ZD6474, a vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor with additional activity against epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, inhibits orthotopic growth and angiogenesis of gastric cancer." Mol Cancer Ther **3**(9): 1041-8.
 - McKay, J. A., L. J. Murray, et al. (2002). "Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases." Eur J Cancer **38**(17): 2258-64.
 - Meireles, A. M., A. Preto, et al. (2007). "Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines." Thyroid **17**(8): 707-15.
 - Morelli, M. P., T. Cascone, et al. (2006). "Anti-tumor activity of the combination of cetuximab, an anti-EGFR blocking monoclonal antibody and ZD6474, an inhibitor of VEGFR and EGFR tyrosine kinases." J Cell Physiol **208**(2): 344-53.
 - Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
 - Motegi, K., K. Harada, et al. (2002). "Evidence of a bi-phasic effect of thrombospondin-1 on angiogenesis." Histochem J **34**(8-9): 411-21.
 - Naumov, G. N., M. B. Nilsson, et al. (2009). "Combined vascular endothelial growth factor receptor and epidermal growth factor receptor (EGFR) blockade inhibits tumor growth in xenograft models of EGFR inhibitor resistance." Clin Cancer Res **15**(10): 3484-94.
 - Neel, B. G. and N. K. Tonks (1997). "Protein tyrosine phosphatases in signal transduction." Curr Opin Cell Biol **9**(2): 193-204.
 - Nobuhara, Y., N. Onoda, et al. (2005). "Efficacy of epidermal growth factor receptor-targeted molecular therapy in anaplastic thyroid cancer cell lines." Br J Cancer **92**(6): 1110-6.
 - Normanno, N., A. De Luca, et al. (2006). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer." Gene **366**(1): 2-16.

- Okabe, T., I. Okamoto, et al. (2009). "Addition of S-1 to the epidermal growth factor receptor inhibitor gefitinib overcomes gefitinib resistance in non-small cell lung cancer cell lines with MET amplification." Clin Cancer Res 15(3): 907-13.
- Olsson, A. K., A. Dimberg, et al. (2006). "VEGF receptor signalling - in control of vascular function." Nat Rev Mol Cell Biol 7(5): 359-71.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, et al. (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." Cell 79(2): 315-28.
- Pacini, F., M. Schlumberger, et al. (2006). "European consensus for the management of patients with differentiated thyroid carcinoma of the follicular epithelium." Eur J Endocrinol 154(6): 787-803.
- Pacini, F., T. Vorontsova, et al. (1997). "Post-Chernobyl thyroid carcinoma in Belarus children and adolescents: comparison with naturally occurring thyroid carcinoma in Italy and France." J Clin Endocrinol Metab 82(11): 3563-9.
- Patel, R. S., D. J. Enepekides, et al. (2009). "Cutaneous metastases in one of the youngest reported patients with anaplastic thyroid carcinoma." Thyroid 19(7): 781-3.
- Pennell, N. A., G. H. Daniels, et al. (2008). "A phase II study of gefitinib in patients with advanced thyroid cancer." Thyroid 18(3): 317-23.
- Pichardo-Lowden, A., S. Durvesh, et al. (2009). "Anaplastic thyroid carcinoma in a young woman: a rare case of survival." Thyroid 19(7): 775-9.
- Reiners Chr, Geling M, et al. (2005). „Epidemiologie des Schilddrüsenkarzinoms.“ Der Onkologe 1(11):11-19
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) (2010) „Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin“
- Sano, D., M. Kawakami, et al. (2007). "Antitumor effects of ZD6474 on head and neck squamous cell carcinoma." Oncol Rep 17(2): 289-95.
- Santarpia, L., A. K. El-Naggar, et al. (2008). "Phosphatidylinositol 3-kinase/akt and ras/raf-mitogen-activated protein kinase pathway mutations in anaplastic thyroid cancer." J Clin Endocrinol Metab 93(1): 278-84.
- Sasaki, T., S. Tanno, et al. (2008). "Administration of VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor increases VEGF production causing angiogenesis in human small-cell lung cancer xenografts." Int J Oncol 33(3): 525-32.

-
- Scagliotti, G. and R. Govindan (2010). "Targeting angiogenesis with multitargeted tyrosine kinase inhibitors in the treatment of non-small cell lung cancer." Oncologist **15**(5): 436-46.
 - Schiff, B. A., A. B. McMurphy, et al. (2004). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) is overexpressed in anaplastic thyroid cancer, and the EGFR inhibitor gefitinib inhibits the growth of anaplastic thyroid cancer." Clin Cancer Res **10**(24): 8594-602.
 - Schlessinger, J. (2000). "Cell signaling by receptor tyrosine kinases." Cell **103**(2): 211-25.
 - Schlumberger, M., F. Carlomagno, et al. (2008). "New therapeutic approaches to treat medullary thyroid carcinoma." Nat Clin Pract Endocrinol Metab **4**(1): 22-32.
 - Semino, C. E., R. D. Kamm, et al. (2006). "Autocrine EGF receptor activation mediates endothelial cell migration and vascular morphogenesis induced by VEGF under interstitial flow." Exp Cell Res **312**(3): 289-98.
 - Sherman, S. I. (2003). "Thyroid carcinoma." Lancet **361**(9356): 501-11.
 - Sherman, S. I. (2010). "Targeted therapy of thyroid cancer." Biochem Pharmacol **80**(5): 592-601.
 - Siemeister, G., G. Martiny-Baron, et al. (1998). "The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities." Cancer Metastasis Rev **17**(2): 241-8.
 - Solmi, R., M. Lauriola, et al. (2008). "Displayed correlation between gene expression profiles and submicroscopic alterations in response to cetuximab, gefitinib and EGF in human colon cancer cell lines." BMC Cancer **8**: 227.
 - Sordella, R., D. W. Bell, et al. (2004). "Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways." Science **305**(5687): 1163-7.
 - Sorkin, A. (2001). "Internalization of the epidermal growth factor receptor: role in signalling." Biochem Soc Trans **29**(Pt 4): 480-4.
 - Steeghs, N., J. W. Nortier, et al. (2007). "Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: an update of recent developments." Ann Surg Oncol **14**(2): 942-53.
 - Stoffel, A. (2010). "Targeted therapies for solid tumors: current status and future perspectives." BioDrugs **24**(5): 303-16.

-
- Stoscheck, C. M. and G. Carpenter (1984). "Down regulation of epidermal growth factor receptors: direct demonstration of receptor degradation in human fibroblasts." J Cell Biol 98(3): 1048-53.
 - Tai, D. and D. Poon (2010). "Molecular and other novel advances in treatment of metastatic epithelial and medullary thyroid cancers." J Oncol 2010.
 - Takeuchi, K. and F. Ito (2010). "EGF receptor in relation to tumor development: molecular basis of responsiveness of cancer cells to EGFR-targeting tyrosine kinase inhibitors." Febs J 277(2): 316-26.
 - Tanaka, J., T. Ogura, et al. (1987). "Establishment and biological characterization of an in vitro human cytomegalovirus latency model." Virology 161(1): 62-72.
 - Thatcher, N., A. Chang, et al. (2005). "Gefitinib plus best supportive care in previously treated patients with refractory advanced non-small-cell lung cancer: results from a randomised, placebo-controlled, multicentre study (Iressa Survival Evaluation in Lung Cancer)." Lancet 366(9496): 1527-37.
 - Tsimberidou, A. M., C. Vaklavas, et al. (2009). "Phase I clinical trials in 56 patients with thyroid cancer: the M. D. Anderson Cancer Center experience." J Clin Endocrinol Metab 94(11): 4423-32.
 - Vicentini, C., C. Festuccia, et al. (2003). "Prostate cancer cell proliferation is strongly reduced by the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in vitro on human cell lines and primary cultures." J Cancer Res Clin Oncol 129(3): 165-74.
 - Vieira, J. M., S. C. Santos, et al. (2005). "Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors in thyroid carcinomas of follicular origin: a potential autocrine loop." Eur J Endocrinol 153(5): 701-9.
 - Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nat Rev Cancer 2(7): 489-501.
 - Wang, S. E., Y. Yu, et al. (2010). "Oncogenic mutations regulate tumor microenvironment through induction of growth factors and angiogenic mediators." Oncogene 29(23): 3335-48.
 - Wedge, S. R., D. J. Ogilvie, et al. (2002). "ZD6474 inhibits vascular endothelial growth factor signaling, angiogenesis, and tumor growth following oral administration." Cancer Res 62(16): 4645-55.
 - Wells, A., J. B. Welsh, et al. (1990). "Ligand-induced transformation by a noninternalizing epidermal growth factor receptor." Science 247(4945): 962-4.

-
- Wells, A. (1999). "EGF receptor." Int J Biochem Cell Biol 31(6): 637-43.
 - Wells, S. A., Jr., J. E. Gosnell, et al. (2010). "Vandetanib for the treatment of patients with locally advanced or metastatic hereditary medullary thyroid cancer." J Clin Oncol 28(5): 767-72.
 - Weng, L. P., O. Gimm, et al. (2001). "Transient ectopic expression of PTEN in thyroid cancer cell lines induces cell cycle arrest and cell type-dependent cell death." Hum Mol Genet 10(3): 251-8.
 - Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human." Physiol Rev 79(1): 143-80.
 - Wiley, H. S., J. J. Herbst, et al. (1991). "The role of tyrosine kinase activity in endocytosis, compartmentation, and down-regulation of the epidermal growth factor receptor." J Biol Chem 266(17): 11083-94.
 - Williams, E. D., A. Abrosimov, et al. (2004). "Thyroid carcinoma after Chernobyl latent period, morphology and aggressiveness." Br J Cancer 90(11): 2219-24.
 - Wu, W., A. Onn, et al. (2007). "Targeted therapy of orthotopic human lung cancer by combined vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor receptor signaling blockade." Mol Cancer Ther 6(2): 471-83.
 - Zetter, B. R. (2008). "The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research." Nat Rev Cancer 8(8): 647-54.

6.2. Abbildungen zu Western Blot-Analysen und β -Actin-Färbungen

Folgend sind sämtliche Western Blot-Analysen mit zugehöriger β -Actin-Färbung abgebildet, die aufgrund der Übersichtlichkeit im Ergebnisteil nicht gezeigt wurden. Dargestellt sind die nicht phosphorylierten und phosphorylierten Rezeptoren, geordnet nach Zelllinie und Tyrosinkinaseinhibitor.

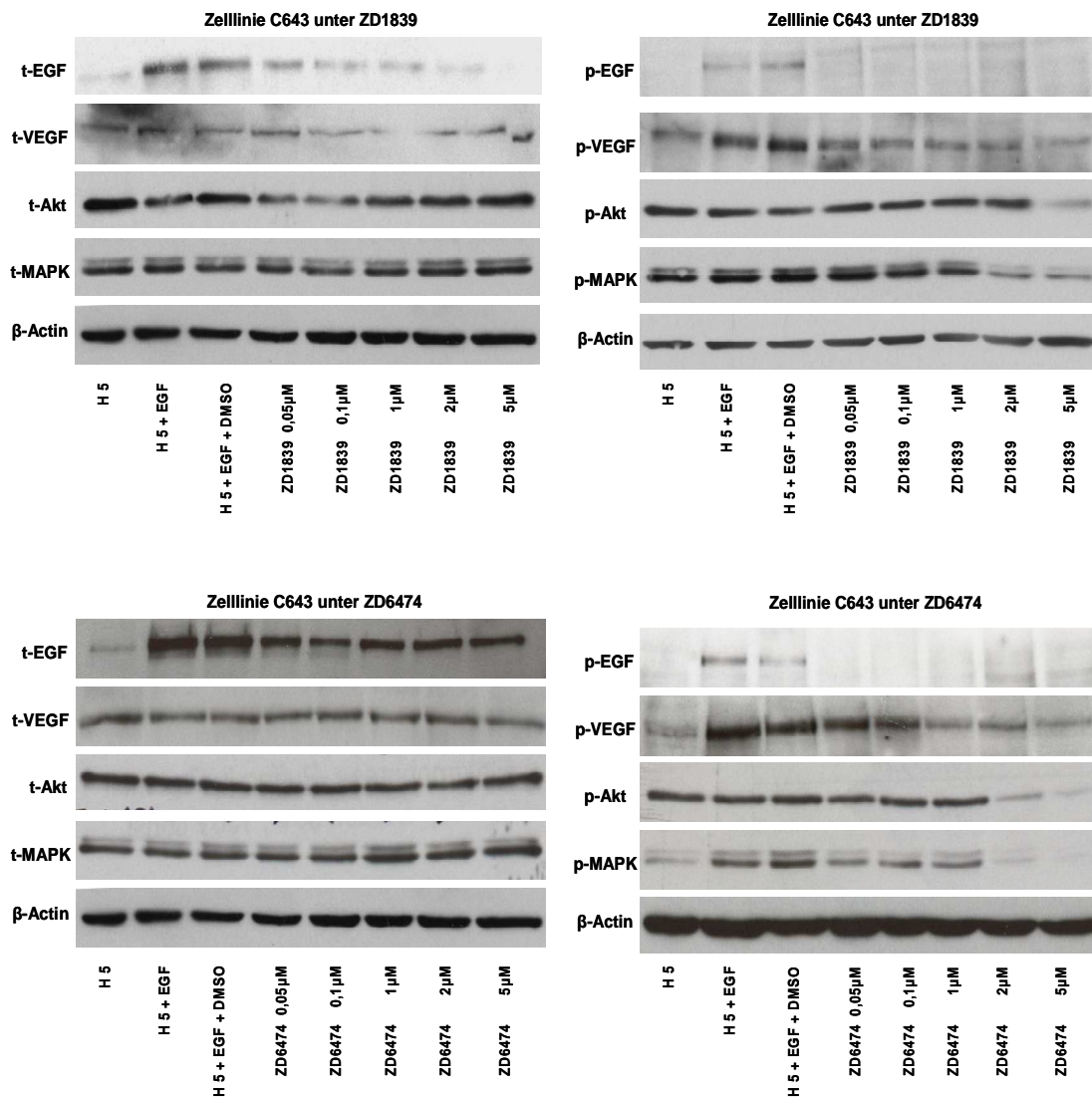


Abb. 6.1: Western Blot-Analysen der Zelllinie C643 unter ZD1839 und ZD6474

Abgebildet ist die Expression der membrangebundenen EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie der zytoplasmatischen Akt und MAPK in nicht-phosphorylierter Form unter ZD1839 (oben links) bzw. ZD6474 (unten links). Die phosphorylierten EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie die phosphorylierte Akt und MAPK unter ZD1839 und ZD6474 sind oben rechts bzw. unten rechts abgebildet. Legende: H5 entspricht unbehandelten Zellen = „Leerwert“, H5 + EGF = mit EGF (Endkonzentration 40ng/ml) behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO (Trägersubstanz) = Kontrollwert bzw. Nullwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 bzw. ZD6474 (0,05 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 5 μ M).

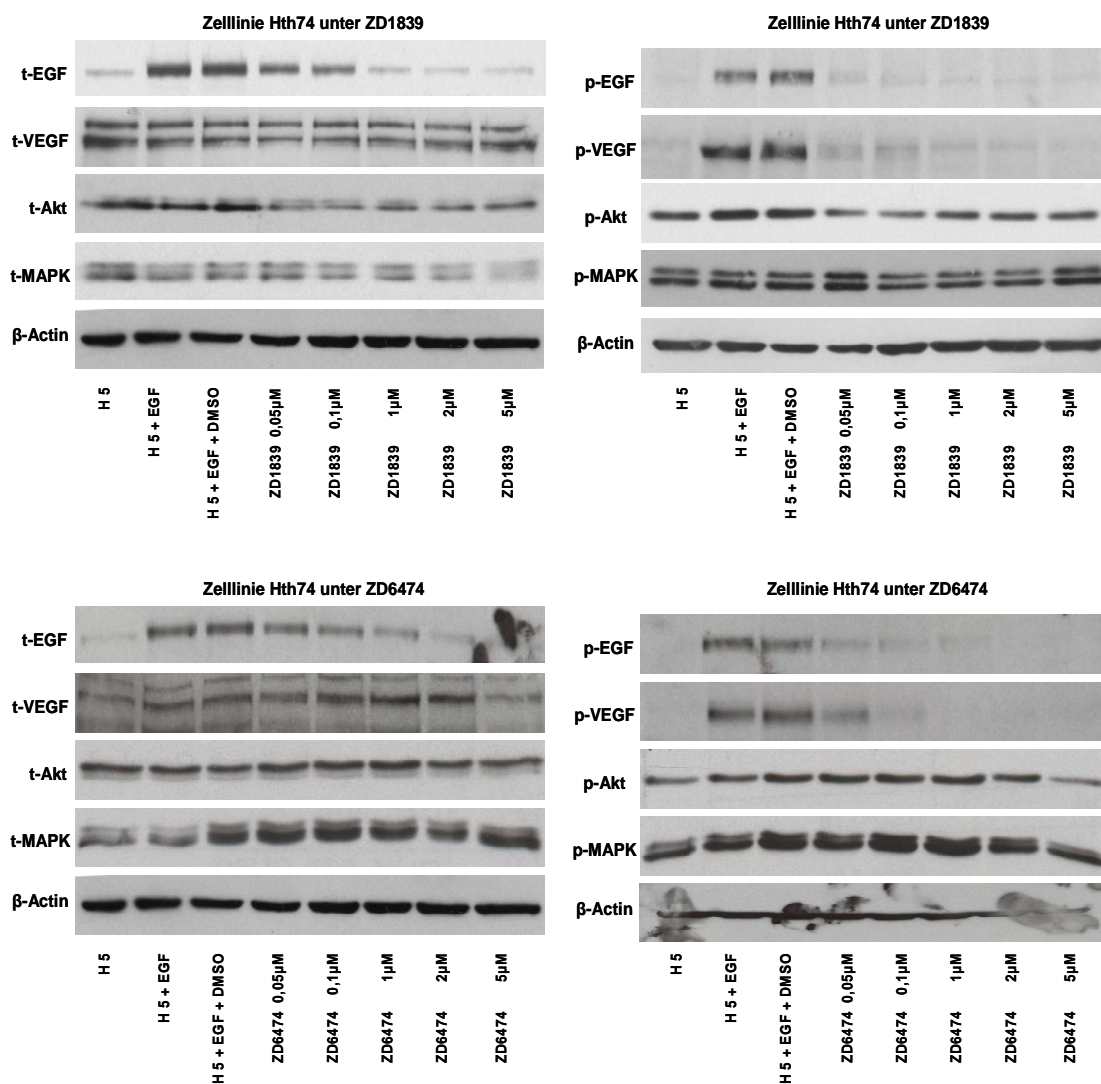


Abb. 6.2: Western Blot-Analysen der Zelllinie Hth74 unter ZD1839 und ZD6474

Abgebildet ist die Expression der membrangebundenen EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie der zytoplasmatischen Akt und MAPK in nicht-phosphorylierter Form unter ZD1839 (oben links) bzw. ZD6474 (unten links). Die phosphorylierten EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie die phosphorylierte Akt und MAPK unter ZD1839 und ZD6474 sind oben rechts bzw. unten rechts abgebildet. Legende: H5 entspricht unbehandelten Zellen = „Leerwert“, H5 + EGF = mit EGF (Endkonzentration 40ng/ml) behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO (Trägersubstanz) = Kontrollwert bzw. Nullwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 bzw. ZD6474 (0,05µM, 0,1µM, 1µM, 2µM und 5µM).

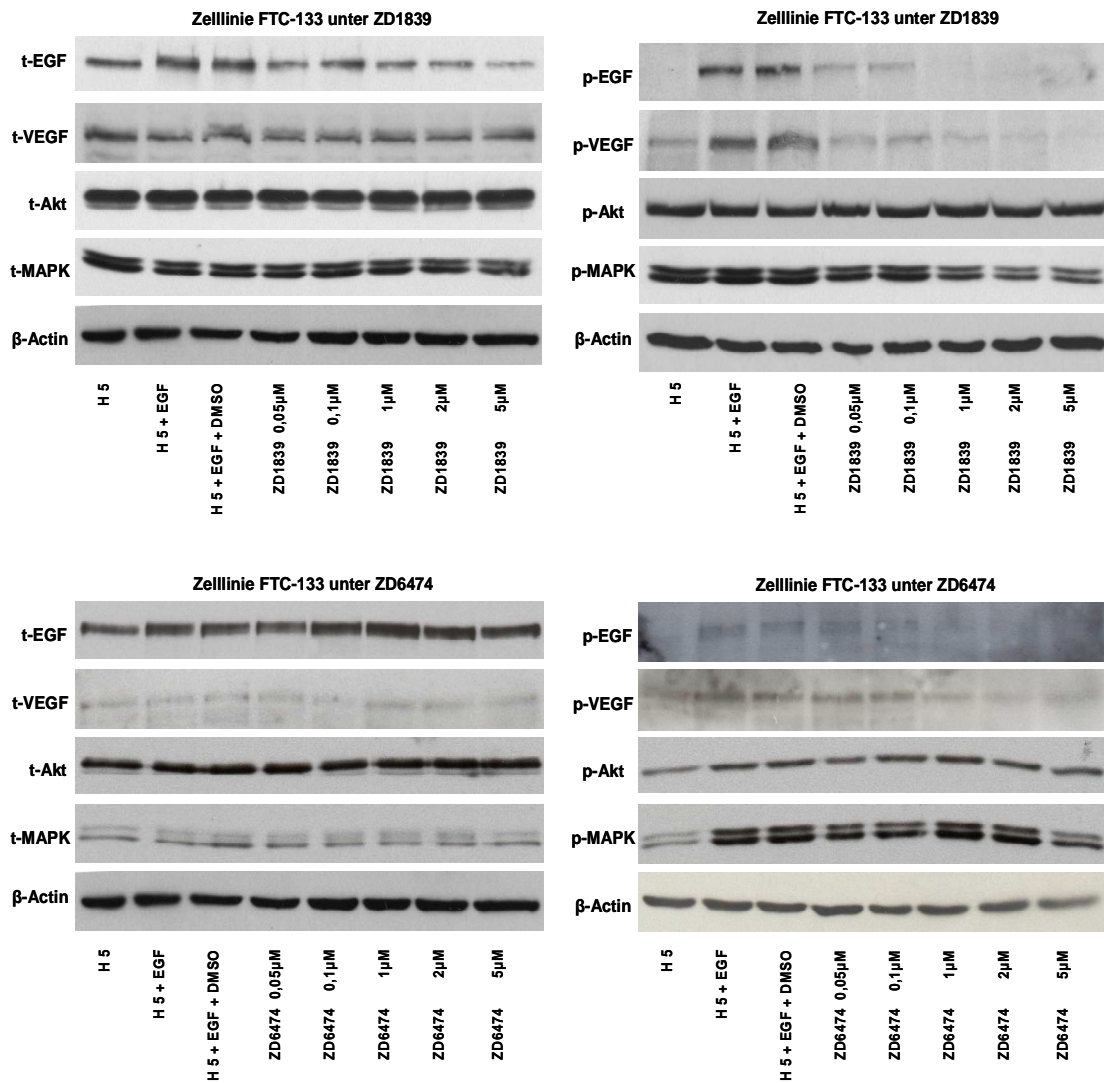


Abb. 6.3: Western Blot-Analysen der Zelllinie FTC-133 unter ZD1839 und ZD6474

Abgebildet ist die Expression der membrangebundenen EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie der zytoplasmatischen Akt und MAPK in nicht-phosphorylierter Form unter ZD1839 (oben links) bzw. ZD6474 (unten links). Die phosphorylierten EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie die phosphorylierte Akt und MAPK unter ZD1839 und ZD6474 sind oben rechts bzw. unten rechts abgebildet. Legende: H5 entspricht unbehandelten Zellen = „Leerwert“, H5 + EGF = mit EGF (Endkonzentration 40ng/ml) behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO (Trägersubstanz) = Kontrollwert bzw. Nullwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 bzw. ZD6474 (0,05 μM, 0,1 μM, 1 μM, 2 μM und 5 μM).

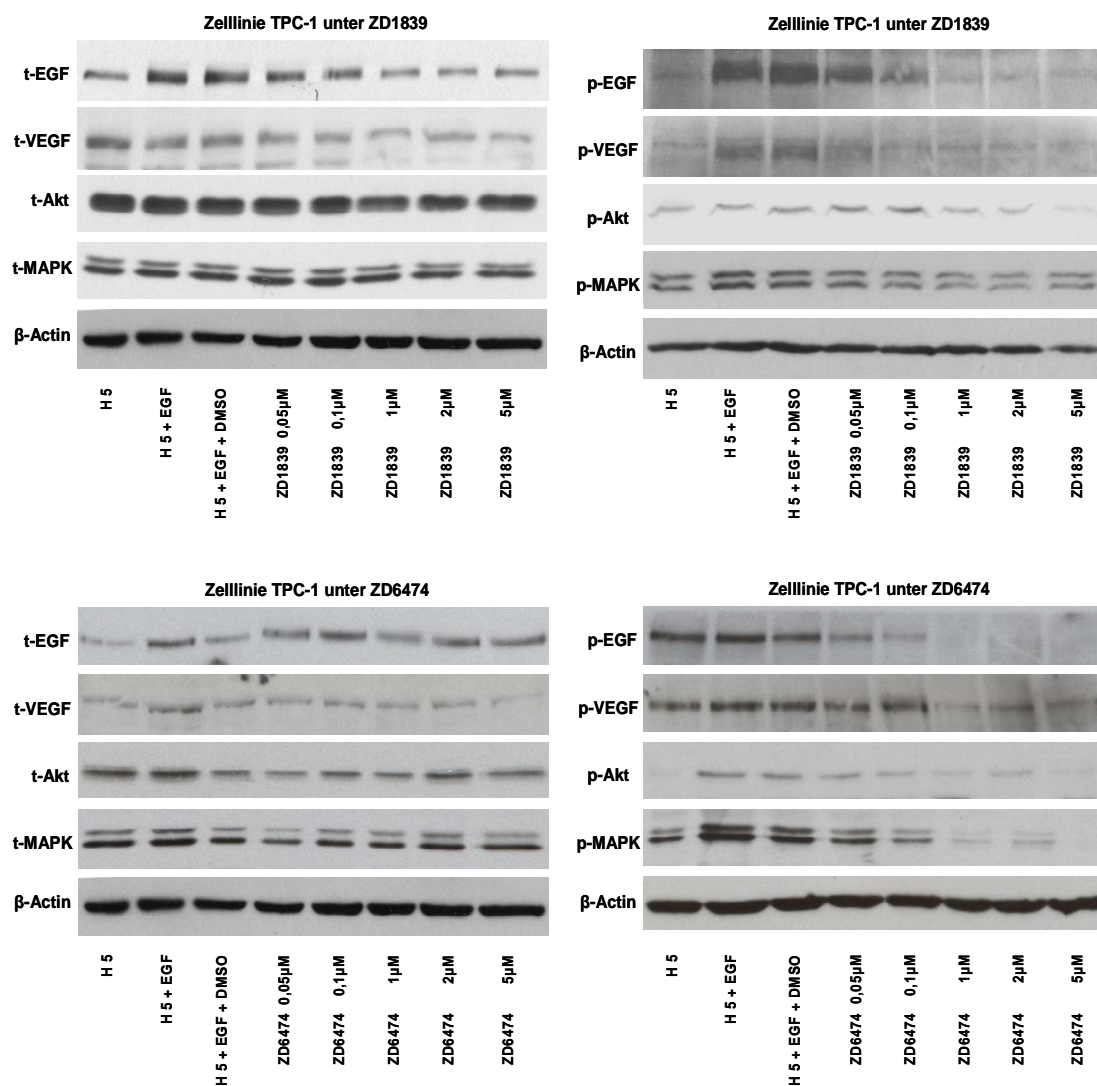


Abb. 6.4: Western Blot-Analysen der Zelllinie TPC-1 unter ZD1839 und ZD6474

Abgebildet ist die Expression der membrangebundenen EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie der zytoplasmatischen Akt und MAPK in nicht-phosphorylierter Form unter ZD1839 (oben links) bzw. ZD6474 (unten links). Die phosphorylierten EGF- und VEGF-Rezeptoren sowie die phosphorylierte Akt und MAPK unter ZD1839 und ZD6474 sind oben rechts bzw. unten rechts abgebildet. Legende: H5 entspricht unbehandelten Zellen = „Leerwert“, H5 + EGF = mit EGF (Endkonzentration 40ng/ml) behandelte Zellen, H5 + EGF + DMSO (Trägersubstanz) = Kontrollwert bzw. Nullwert, in aufsteigender Konzentration ZD1839 bzw. ZD6474 (0,05 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 5 μ M).

6.3. Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Aumüller, Arnold, Barth N., Barth P., Bals, Bartsch, Basler, Baum, Becker, Behe, Behr, Berger, Bien, Cetin, Czubayko, Daut, Donner-Banzhoff, Duda, Eilers, Engenhardt-Cabillic, Feuser, Fuchs, Garten, Gemsa, Gerdes, Geks, Görg, Gotthardt, Grimm, Gudermann, Hadji, Hasilik, Hoffmann, Hofmann, Jungclas, Kann, Klenk, Klose, Köhler, König, Koolman, Kretschmer, Kroll, Kuhlmann, Kühnert, Lang, Langer, Lill, Lohoff, Löffler, Luers, Maier, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Ramaswamy, Renz, Richter, Röhm, Röper, Rothmund, Schäfer, Schäfer, Schmidt, Schneider, Seitz Steiniger, Sommer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Welke, Werner, Westermann, Wiegand, Wulf, Zielke

6.4. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. M. Rothmund, ehemaliger Direktor der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg, danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und die Chance einen Einblick in die klinisch, experimentelle Forschung an malignen Schilddrüsentumoren zu bekommen und darüber hinaus zu diesem Thema zu promovieren. Mein Dank gilt auch dem derzeitigen Direktor der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie in Marburg Herrn Prof. Dr. med. D.K. Bartsch.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn PD Dr. S. Hoffmann, Oberarzt und Leiter des Darmzentrums an der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg für die Begleitung während der gesamten Arbeitsphase, für konstruktive und motivierende Ideen und besonders akribische Durchsicht und Überarbeitung dieser Doktorarbeit.

Annette, Carmen und Susanne möchte ich für die geduldige Einarbeitung in sämtliche Laborarbeiten und Euren unermesslichen Erfahrungsschatz danken. Selbst verloren geglaubte Gele konnten durch Rettungstaten erhalten werden. Ich danke Euch auch für Rat und Tat an Wochenenden und telefonischen Support. Dir Annette möchte ich ganz herzlich für Deine persönliche Unterstützung, Anregung und unzählige Freizeitstunden beim Durchsehen dieser Dissertation danken.

Meiner Freundin Julia möchte ich ganz herzlich für die Durchsicht der Arbeit, für Anregungen und konstruktive Kritik danken, die zum Gelingen dieser Arbeit immens beigetragen hat.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Meiner Schwester Sylvie und meinem Schwager Christian für Korrekturlesen und Verbesserung des Layouts.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist. Eure Unterstützung hat mir das Studium der Humanmedizin und letztlich das Erstellen dieser Dissertation erst ermöglicht.