

## Zusammenfassung in deutscher Sprache

**Problematik:** Erkrankungen der Schilddrüse, im allgemeinen und solche pathologischen Wachstums im besonderen, sind extrem verbreitet und stellen ein in der endokrinologischen Praxis häufig angetroffenes Problem dar. Jodmangel, begleitet von chronisch erhöhten Spiegeln des Schilddrüsen stimulierenden Hormons (TSH) mit folgender Aktivierung des TSH-Rezeptor-cAMP Signaltransduktionsweges, scheint die treibende Kraft hinter der diffusen Schilddrüsenvergrößerung zu sein. Dagegen ist es wahrscheinlich, daß der spätere noduläre Umbau sowie die maligne Entartung auf Störungen der Funktion von Tyrosinkinase-Rezeptoren und der PKC beruhen. Die Familie CRE-bindender Transkriptionsfaktoren wurde ursprünglich als Effektoren des cAMP-PKA-Weges beschrieben, jedoch später auch in vielen Zellarten als Endpunkte von Tyrosinkinase-Rezeptor-Kaskaden identifiziert. Das Ziel dieser Arbeit war daher abzuklären, ob (1) CRE-bindende Proteine auch in der Schilddrüse Endpunkte von Tyrosinkinase-Rezeptor-Signaltransduktionswegen sind, (2) ob in Schilddrüsenkarzinomzellen aberrante CREB/M-Phosphorylierungsmuster vorliegen, (3) ob die Phosphorylierung über diese Wege auch zur Induktion CRE-regulierter Gene führt, und (4) unter Anwendung spezifischer Inhibitoren, die beteiligten Proteinkinase-Kaskaden zumindest in Teilen zu identifizieren.

**Methodik:** Primäre Thyrozyten wurden mit TSH, EGF oder Insulin in unterschiedlichen Konzentrationen sowie für verschiedene Zeiträume stimuliert. Die Aktivierung CRE-bindender Proteine wurde im Western-Blot durch Verwendung eines gegen das regulatorische Serin gerichteten phospho-spezifischen Antikörpers untersucht. Die erhaltenen Aktivierungsprofile wurden dann mit denen vierer humaner Karzinomzelllinien (zwei follikuläre, zwei anaplastische) sowie einer Rattenadenomzelllinie verglichen. Auf Transkriptionsebene wurde die Induktion des negativen Feedback Regulators „inducible cAMP early repressor (ICER)“ in der RT-PCR sowie die Luciferaseaktivität nach transienter Transfektion mit dem CRE-regulierten Reporterplasmid 4xSCE1/2T81 untersucht. Um die beteiligten Signaltransduktionswege zu identifizieren, wurden die spezifischen Inhibitoren H89 (PKA), GFX (PKC), Rapamycin (mTOR/p70S6K) sowie KN62 (CamKII) eingesetzt. Zusätzlich wurden PKC- und cAMP-abhängige Wege direkt mit TPA bzw. Forskolin aktiviert. Schließlich wurde das Expressionsprofil bestimmter PKC- Isoformen während der prolongierten Stimulation im Western-Blot untersucht.

**Ergebnisse:** Alle drei untersuchten Wachstumsfaktoren induzierten die Phosphorylierung CRE-bindender Proteine in primären humanen Schilddrüsenzellen. Der stärkste Induktor war TSH, das eine biphasische Antwort (erste Spitze nach 10 min, zweite nach 30 min) auslöste. Diese Reaktion wurde teilweise durch Vorbehandlung mit entweder H89 oder GFX unterdrückt. Die relative Empfindlichkeit gegenüber H89 oder GFX war abhängig vom jeweiligen Stimulierungszeitpunkt, wobei der maximale Effekt des H89 dem des GFX vorausging. Insulin war als CREB/M-Aktivator nur in Dosierungen im µg/mL-Bereich effektiv und die Reaktion war insgesamt stark variabel. Wiederum wurde die CREB/M-Phosphorylierung sowohl durch H89 als auch durch GFX negativ beeinflusst, allerdings variierte der jeweilige Beitrag mit dem individuellen Zellisolat. EGF war in primären Zellen ein nur schwacher Induktor, wobei der maximale Effekt nach 30 min sowie bei einer Konzentration zwischen 1- 10 ng/mL beobachtet wurde. Diese EGF-, wie auch die TPA-induzierten Effekte, wurden durch die Behandlung der Zellen mit H89 oder GFX vollständig blockiert. Im Gegensatz dazu war EGF in allen untersuchten Karzinomzelllinien ein sehr potenter Aktivator der CRE-bindenden Proteine. Darüberhinaus wurde die zunehmende Reaktivität gegenüber EGF begleitet von einer gleichzeitigen Abnahme der Sensitivität gegenüber TSH und Insulin. In einer anaplastischen Karzinomzelllinie (Hth 74) wurde zudem eine autokrine Aktivierung der CRE-bindenden Proteine beobachtet. In Übereinstimmung mit der Phosphorylierungsreaktion wurde der negative Feedback-Regulator ICER ebenfalls durch alle drei Wachstumsfaktoren induziert. Dagegen zeigten die für ein β-Gal- Kontrollplasmid korregierten Expressionsergebnisse mit dem CRE-Reporterplasmid ein anderes Bild: dabei stimulierten sowohl TSH als auch Forskolin einen sehr starken und schnellen Anstieg der CRE-regulierten Transkription (max. nach 8 Std.), wohingegen EGF und TPA eine verzögerte Luciferaseaktivität auslösten (beginnend nach ca. 20 Std.). Es konnte keine Korrelation zwischen dieser Verzögerung und dem Abbau einer konventionellen oder neuen PKC- Isoform beobachtet werden.

**Diskussion:** Die Ergebnisse unterstützen ein Modell, bei dem TSH/Insulin und PKA die Hauptmediatoren des normalen, benignen Schilddrüsenwachstums darstellen, während EGF und PKC die vorherrschenden Auslöser der malignen Transformation sind. Die hohen Insulinkonzentrationen, die erforderlich waren, um die CREB/M-Phosphorylierung auszulösen, sowie die starke Variabilität dieser Reaktion deuten auf die Beteiligung von IGF-Rezeptoren und/oder heterodimeren Rezeptoren für Insulin-, IGF-I und IGF-II hin. Nach langjähriger Stimulierung kann es bei entsprechender Heterogenität in der Expression solcher

Rezeptoren dann zum knotigen Umbau der Schilddrüse kommen. Hohe Expressionsraten von EGF-Rezeptoren und TGF $\alpha$  wurden als Indikatoren einer schlechten Prognose beim Schilddrüsenkarzinom beschrieben. In guter Übereinstimmung mit diesen *in vivo* gemachten Beobachtungen konnte in dieser Studie bei der Untersuchung der CREB/M-Phosphorylierung in vier humanen Karzinomzelllinien eine zunehmende Reaktivität gegen EGF, begleitet von einem parallel verlaufendem Verlust der TSH/Insulin-Sensitivität und des Differenzierungsgrades festgestellt werden. Während der Verlust der TSH-Antwort gut korreliert mit einer bekannten Erniedrigung der TSH-Rezeptor Expression in diesen Zelllinien, ist die Grundlage der verstärkten EGF-Sensitivität weniger klar. In diesem Zusammenhang ist es von Bedeutung, daß die PKC $\delta$  Expression in den untersuchten HTC-TSHr Karzinomzellen ungewöhnlich hoch war und zudem resistent gegenüber der negativen Regulation durch TPA. Die Überexpression von Bestandteilen des EGF-Signaltransduktionsweges ist eine bekannte Veränderung in vielen Karzinomzelltypen. Interessanterweise war die EGF- und TPA-vermittelte CREB/M-Phosphorylierung abhängig von einer intakten PKA-Funktion. Während die PKA II-Isoform die langbekannten cAMP-induzierten Differenzierungs-/Wachstumssignale vermittelt, konnte in neueren Beobachtungen die Beteiligung der PKA I in der EGF-Rezeptor Signaltransduktion in Mammakarzinomzellen nachgewiesen werden. Dieser Signaltransduktionsweg könnte daher in Zukunft ein wichtiges Ziel auch bei der Therapie des Schilddrüsenkarzinoms darstellen.