

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor Prof. Dr. H.-U. Häring

**Einfluss von Rosiglitazon und Retinol auf den
Stoffwechsel transformierter humaner Thyreozyten und
nicht transformierter Schweinethyreozyten**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Rhea Angeliki Piel
aus Stuttgart

2005

Dekan:

Prof. Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. R. Wahl

2. Berichterstatter:

Privatdozentin Dr. E. Fröhlich

Diese Arbeit ist meinen lieben Eltern gewidmet,
die mich während meiner Promotion und in meinem Studium in jeder Hinsicht
unterstützten und mir stets zur Seite standen.

Abkürzungen

Abb.	= Abbildung
Bq	= Bequerel, ein Zerfall pro Sekunde
DMSO	= Dimethyl-Sulfoxid
FTC	=follicular thyroid carcinoma
g	= Gramm
µg	= Mikrogramm
g	= Gravitation, Erdbeschleunigung
h	= Stunde
JMP	= Statistikprogramm von SAS
KBq	= Kilobequerel
l	= Liter
M	= molare Masse, Molarität
µM	= mikromolar
mg	= Milligramm
min	= Minute
ml	= Milliliter
µl	= Mikroliter
MU	= Milliunit
n	= Anzahl der Thyreozyten bei Zellzählung
NaCl	= Natriumchlorid, Kochsalz
NIS	= Natrium-Iodid-Symporter
p	= statistische Wahrscheinlichkeit
PET	= Positronenemissionstomographie
PPAR γ	= Peroxysome Proliferator Activated Receptor
RXR	= Retinoid-X-Rezeptor
s	= Sekunde
SD	= Standardabweichung
SEM	= Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	= Tabelle
TSH	= Thyreoideastimulierendes Hormon, Thyreotropin

U = Unit
u.a. = und andere
VitA = Vitamin A, Retinol
VitE = Vitamin E, α -Tocopherol
Vol% = Volumenprozent

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Strukturformeln	5
2 Material und Methoden	6
2.1 Geräte für die Zellkulturen	6
2.2 Geräte zur Messung der Radioaktivität	6
2.3 Medien und Reagenzien	7
2.4 Reagenzien zur zytochemischen Darstellung des Natrium-Iodid-Symporters	8
2.5 Präparation der Schweineschilddrüsenzellen	9
2.6 Flussdiagramm der Schweinethyreozytenpräparation	11
2.7 Zellzählung	12
2.8 Herstellung der Schweinethyreozytenkulturen	12
2.9 Herstellung von Kulturen mit Schilddrüsenmalignomzellen	13
2.10 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellkulturen	14
2.11 Photographische Abbildungen der malignen humanen Thyreozyten	16
2.12 Mycoplasmennachweis	19
2.13 Zellernte	20
2.14 Cytochemische Darstellung des Natrium-Iodid-Symporter	20
2.15 Statistische Auswertung	23
3 Ergebnisse	24
3.1 Untersuchungen von kultivierten malignen humanen Thyreozyten	24
3.1.1 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Retinolkonzentrationen	24
3.1.2 ³ H-Thymidineinbau in maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Vitamin A-Konzentrationen	29
3.2 Untersuchungen an kultivierten gesunden Schweinethyreozyten	35

3.2.1	^{125}I -Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Retinolkonzentrationen	35
3.2.2	^3H -Thymidineinbau in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Vitamin A-Konzentrationen.....	41
3.3	Einfluss von Rosiglitazon auf den Natrium-Iodid-Symporter von Schweinethyreozyten und von malignen humanen Schilddrüsenzellen.	46
3.3.1	Einfluss auf den NIS kultivierter Schweinethyreozyten	46
3.3.2	Einfluss von Rosiglitazon auf den NIS maligner humaner Thyreozyten (FTC 133, FTC 238).....	50
3.4	Bestimmung des Glukoseeinbaus in Thyreozyten unter Einfluss von Rosiglitazon	52
4	Diskussion	60
4.1	Einfluß von Rosiglitazon auf den Iodid- undThymidinaufnahme in kultivier- te maligne humane Thyreozyten ohne und mit gleichzeitiger Stimula- tion von Vitamin A.....	62
4.2	Einfluß von Rosiglitazon auf die Iodid- undThymidinaufnahme in nicht- transformierte Schweineschilddrüsenzellen ohne und mit gleichzeitiger Stimulation von Vitamin A.....	65
4.3	Einfluss von Rosiglitazon auf den immunzytochemisch darstellbaren Natrium-Iodid-Symporter von Schweinethyreozyten und von malignen humanen Schilddrüsenzellen.....	68
4.4	Bestimmung des Glukoseeinbaus unter dem Einfluss von Rosiglitazon	69
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	74
7	Anhang	84
7.1	Statistische Tabellen	84
7.2	Diagramme der Mittelwerte der Ergebnisse und SEM aus den Abbildungen normiert auf die Kontrolle	103
8	Danksagung	110

1 Einleitung und Fragestellung

Zu den bösartigen Schilddrüsentumoren zählen Karzinome, andere seltene Malignome und Metastasen extrathyreoidaler Tumoren. Der prozentuale Anteil der Schilddrüsenmalignome an allen Krebserkrankungen beträgt circa 1% (Karavitaki et al. 2002). 33 % aller Schilddrüsenkarzinome gehören dem follikulären Typus an. Neben dem follikulären Karzinom gehört auch das papilläre Karzinom zu den differenzierten Karzinomen. Diese Tumoren haben mit einer 10-Jahresüberlebensrate von 80% - 95% eine sehr gute Prognose (Mackenzie et al. 2004). Des Weiteren gibt es undifferenzierte (anaplastische) Schilddrüsenkarzinome, medulläre Schilddrüsenkarzinome (C-Zell-Karzinom) und seltene Malignome der Schilddrüse wie das malignes Lymphom oder das Sarkom und Metastasen extrathyreoidaler Tumoren. Das differenzierte Schilddrüsenkarzinom ist auch als seltene Ursache einer Schilddrüsenüberfunktion beschrieben worden (Brauckhoff et al. 2001; Scherübl et al. 1989).

Ein bei der Schilddrüsenmalignom-Therapie heutzutage fast regelmäßig eingesetztes effektives therapeutisches Mittel ist die Radioiodtherapie. Hierfür ist jedoch die Radioiodaufnahme, welche bei karzinogenen Thyreozyten oft nicht mehr gegeben ist (Klutmann et al. 2001), Voraussetzung. Die Radioiodtherapie wird in Kombination mit radikaler Thyreoidektomie, perkutaner Strahlentherapie und medikamentöser Therapie individuell für jeden Fall angewandt. Durch die Thyreoidektomie steigt infolge des Absinkens der Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum die endogene TSH-Produktion stark an. Es kann dadurch zu einer Verbesserung der Radioiodspeicherung im Schilddrüsenengewebe oder in Metastasen kommen, sofern der für die Radioiodaufnahme erforderliche Natrium-Iodid-Symporter intakt ist. Dies wäre dann eine günstige Voraussetzung für die nachfolgende Radioiodtherapie. Eine optimale ¹³¹I-Iodinkorporation kann die Ausschaltung von Restschilddrüsenengewebe nach der Operation, die Zerstörung nicht operabler Resttumoren und Lokalmetastasen und die Behandlung von Fernmetastasen drastisch erleichtern und somit die Langzeitüberlebensrate und die Prognose optimieren (Reinwein et al. 1996, Kumar et al. 2003).

Daß der Transport von Iodid aus der Blutbahn in die Schilddrüse gegen den Konzentrationsgradienten von einem speziellen Natrium-Iodid-Symporter (NIS) vermittelt wird, ist schon seit geraumer Zeit bekannt. Die NIS-vermittelte Anhäufung von Iodid in Thyreozyten ist auch die entscheidende Voraussetzung für den Erfolg der Radioiodtherapie sowohl bei gut- als auch bei bösartigen Schilddrüsenerkrankungen (Spitzweg et al. 2000).

Eine neue Substanzgruppe zur Diabetes-Behandlung, die sogenannten Thiazolidindione, sind seit wenigen Jahren bekannt. Diese auch Glitazone genannte Substanzgruppe, zu der Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon gehören, werden in der Behandlung des Typ 2-Diabetes eingesetzt. Mit dieser relativ neuen Medikamenten-Gruppe wird der Pathomechanismus der Erkrankung, die Insulinresistenz, direkt angegangen, anstatt dem Diabetiker vermehrt Insulin zu verabreichen (Janka 2001). Unter dem Begriff Insulinresistenz wird ein vermindertes Ansprechen der Zielorgane (vor allem Muskel- und Fettzellen) auf Insulin verstanden.

Die Verbesserung der Insulinempfindlichkeit durch Glitazone – daher auch der Name Insulinsensitizer - scheint durch Bindung der Substanz an den Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR γ) und seine Aktivierung vermittelt zu werden (Verspohl et al. 2002). PPAR γ gehört zur Familie der nuklearen Hormonrezeptoren. Wird PPAR γ aktiviert, bildet dieser Rezeptor mit einem weiteren nuklearen Rezeptor, dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) einen Komplex. Es entsteht ein Heterodimer. Dieser Komplex bindet an das Hormone-response-Element von insulinabhängigen Genen und wirkt dort als Transkriptionsfaktor. Es erfolgt eine vermehrte Bildung von Proteinen, die für die Übertragung des Insulinsignals innerhalb der Zelle und für das Einschleusen von Glucose aus der Blutbahn in die Zelle verantwortlich sind (Bennett et al. 2004, Hernandez et al. 2003, Shen et al. 2004). PPAR γ ist aber nicht nur an der insulinvermittelten Glucoseaufnahme in periphere Gewebe, sondern auch an der Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten beteiligt (Janka 2001; Vazquez et al. 2002). Darüber hinaus kommt den Thiazolidindionen, wie zum Beispiel dem Troglitazon oder dem Rosiglitazon neuerdings auch eine Bedeutung in der Tumorthherapie zu (Fujiwara et al. 2000). Mit diesen

Substanzen konnte eine Redifferenzierung und eine Wachstumsinhibition in verschiedenen Tumorzellen erzielt werden. Rosiglitazon konnte effektiv in der Therapie gegen humane Pankreasneoplasien eingesetzt werden (Kawa et al. 2002). Auch im Falle eines humanen Hypophysenadenoms konnte durch Rosiglitazon ein Stillstand des Zellzyklus und ein Apoptosevorgang beobachtet werden (Heaney et al. 2003). In einigen humanen Schilddrüsentumorarten, u.a. in follikulären (FTC-133, FTC-238) und in anaplastischen Schilddrüsen-Karzinomzelllinien konnte Troglitazon signifikant das Zellwachstum hemmen. Diese tumorsuppressiven Effekte von Troglitazon können einen Fortschritt in der Therapie von Schilddrüsentumoren darstellen (Park et al. 2003, Chung et al 2002, Ohta et al. 2001). Eventuell sind diese Effekte auch durch Rosiglitazon erzielbar.

Vitamin A (Retinol) und seine Derivate, die Retinoide, regulieren wichtige Prozesse der Entwicklung, Differenzierung, Morpho- und Organogenese, des Wachstums, des Stoffwechsels und der Homöostase. Retinoide spielen über ihre Bedeutung bei Entwicklung und Differenzierung hinaus auch in entdifferenzierten Geweben eine Rolle. Ihr Einfluss auf die Genregulation und die Redifferenzierung des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) von Schilddrüsenmalignom-Zellen wurde mehrfach nachgewiesen (Simon et al. 2002). Dadurch lässt sich bei einem Teil der Patienten wieder eine Iodspeicherung im entarteten Schilddrüsengewebe erzielen. Dies kann für eine Radioiodtherapie ausgenutzt werden. Außerdem induzieren Retinoide auch eine Apoptose, den programmierten, kontrollierten physiologischen Zelltod. Apoptose schützt vor möglichen Folgen der unkontrollierten Zellproliferation die zu Neoplasien führen kann und kann somit ebenfalls von großer Bedeutung für die Behandlung von Schilddrüsenmalignomen sein (Kucharova 2002).

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des Insulinsensitizers Rosiglitazon sowohl auf den Stoffwechsel maligner (transformierter) humaner Schilddrüsenzelllinien als auch auf den Stoffwechsel kultivierter nicht transformierter Thyreozyten zu untersuchen. Da nicht transformierte humane Thyreozyten nur in begrenztem

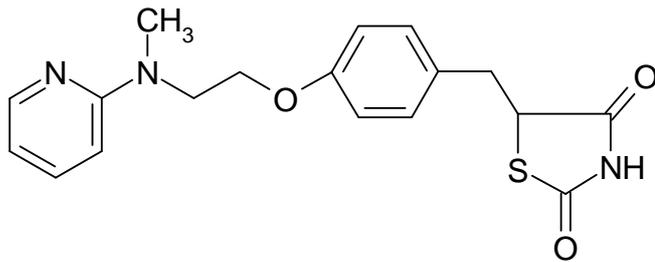
Umfang zur Verfügung stehen, wurde an ihrer Stelle auf Schweinethyreozyten zurückgegriffen. Ferner sollte untersucht werden, ob sich die Wirkungen von Rosiglitazon und Retinoiden bei simultaner Anwendung addieren lässt und so eine neue Alternative einer Behandlung von Schilddrüsenmalignomen entstehen kann.

Um den Synergismus zwischen Rosiglitazon und Vitamin A herauszufinden, wurden die Kulturen mit unterschiedlichen Vitamin A-Konzentrationen behandelt, die sich von physiologischen bis pharmakologischen Dosen erstreckten. Um die Wirkung dieser Substanzen zu erfassen, wurde die ¹²⁵I-Iodidaufnahme und der ³H-Thymidineinbau in die Thyreozyten gemessen. Hinzu kam die Stimulation der Thyreozyten mit TSH, um Vergleichswerte für die Stimulation des Stoffwechsels zu erhalten. Parallel hierzu wurde auch der Einfluss von Rosiglitazon auf die Protein-Expression des Natrium-Iodid-Symporter bei karzinogenen Thyreozyten immunzytochemisch bestimmt.

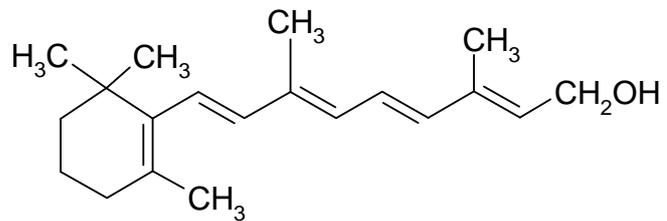
In einem weiteren Teil der Arbeit wurde auch der Glucoseeinbau unter dem Einfluss von Rosiglitazon bei karzinogenen Thyreozyten untersucht. Ziel war es dabei, herauszufinden, wie die primär entdeckte Wirkung von Rosiglitazon, nämlich die Verbesserung der Empfindlichkeit der Zellen für Insulin sich in den hier untersuchten Schilddrüsenzellen auswirkt. Dies könnte Auswirkungen auf die Metastasensuche bei Schilddrüsenkarzinomen mittels der Positronenemissionstomographie haben. Als „Metastasensucher“ wird dabei nämlich Desoxyglucose, markiert mit ¹⁸F, eingesetzt.

1.1 Strukturformeln

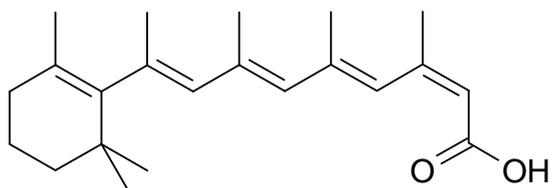
Rosiglitazon



all trans-Retinol (Vitamin A)



13-cis-Retinsäure



2 Material und Methoden

2.1 Geräte für die Zellkulturen

- **Sterile Werkbank:** cearg Shirp, Envirco 4711 Bork/Westfalen
- **Zentrifugen:** Hettich Rotixa/RP, Typ 4200 Hettich Roto Silenta/K
- **Mikroskop:** für Zellzählung Carl Zeiss
- **Inkubator:** CO₂ water jacketed Incubator Model 3111 ; Forma Scientific
- **Kulturgefäße:** 48 well cell culture cluster, corning incorporated, Costar 3548
- **Zellerntegerät:** Cell Harvester, Inotech, Typ IH-280, Nr. 152
- **Sterile Einwegfilter:** Minisart 17598; 0,45µM
- **Filterpapier:** FilterMAT 1173, Filter size 102x256 mm
- **Zellkulturflaschen:** 75cm², Costar
- **Elisa-Reader:** SLT Spectra; SLT Labinstrumente Deutschland GmbH

2.2 Geräte zur Messung der Radioaktivität

- Zur Messung von β -Strahlung :
Liquid Scintillation Counter, Wallac 1410; Pharmacia
- Zur Messung von γ -Strahlung :
LKB Wallac 1277 γ -Master, automatic γ -counter

2.3 Medien und Reagenzien

- **(6⁻³H)-Thymidin**, 20-30Ci/mmol, TRK 61, (Amersham Pharmacia Biotech, England)
- **¹²⁵I** (Iodine in NaOH Soln.pH7-11), IMS 30(Amersham Pharmacia Biotech, England)
- **all-trans-Retinol** (R-7632, Sigma, USA)
- **Amphotericin B**, 25mg/l Spinner- Lösung, (Squibb, München)
- **Ciprobay 200** (Ciproflaxin), 50ml/l Spinner-Lösung (Bayer, Leverkusen)
- **Dimethylsulfoxid (DMSO)** EC No.: 200-664-3(Sigma, Steinheim)
- **Dispase II** (neutrale Protease) aus Bazillus polymyxa grade II, 5 g/l, (Roche, Boehringer, Mannheim)
- **D-MEM/NUT.Mix.F-12 (1:1) mit GlutaMAX II** Medium für maligne Zellen (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Erythrosin B**, Indikator für Zellzählung, Merck, (Darmstadt)
- **Fetales Kälberserum** Lot 75H3387(Sigma Cell Culture, St.Louis)
- **Hydrocortison 100** 1µg/ml Medium (Pharmacia)
- **Isotone Natriumchloridlösung** 0,9% Braun 10ml/50mg Amphotericin B
- **Medium NCTC135 with L-Glutamine**, Lot.No.3039793, (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Medium NCTC-135 without Vit. A**, Lot. No.3049316, (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Methanol** (Lösungsmittel für die Retinoide)
- **Mycoplasma Detection Kit** 1296744, Enzyme Immunoassay, (Boehringer, Mannheim)
- **Penicillin-Streptomycin-Stammlösung** (Roche, Boehringer, Mannheim), 50 000U Penicillin, 0,05 g Streptomycin aufgelöst in 20 ml Aqua dest. Konzentration pro Liter NCTC-Medium: 10 000U Penicillin und 10 mg Streptomycin
- **13-cis-Retinsäure** (13-cis Retinoic Acid, R 3255, Sigma, USA)

- **Salzlösung nach Earle**, EBSS(10x), Lot No.3041323 Life Technologies (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Natriumbicarbonat 7,5%**, Lot 3040440, (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Ampuwa, steriles Wasser** (Fresenius Kabi, Bad Homburg)
- **Lösung nach Spinner** zum Transport der Schweineschilddrüsen: 900ml steriles H₂O, 100 ml
- **Salzlösung nach Earle**, 8-9 ml Natriumbicarbonat
- **Szintillationsflüssigkeit**, Ultima Gold, Packard, (Groningen)
- **Trypsin-EDTA** Lot.No. 3054085(Gibco, Paisley, Schottland)
- **TSH** vom Schwein, Lot. T8785, Sigma, (USA)
- **Ultroser G** (als Serumersatz), (Biosepra, Frankreich)
- **alpha-Tocopherol**
- **Rosiglitazon** (GlaxoSmithKline)

2.4 Reagenzien zur zytochemischen Darstellung des Natrium-Iodid-Symporters

- Beschichtung der Objektträger
Objektträger mit Schnellreinigungslösung (Edinosite) reinigen
Objektträger eine halbe Stunde unter fließend Wasser wässern
In Aqua dest. eintauchen
Chromalaungelatinelösung: 2,5g Gelatine und 0,25g Kaliumchromsulfat
in 500 ml Aqua dest. lösen
Eintauchen der Objektträger in die Chromalaungelatinelösung für 2-3 Sec.
Objektträger vertikal stabfrei trocknen
- PBS-Puffer (pH 7,4)
Zusammensetzung für 2l: 14 g NaCl; 5,72 g Na₂HPO₄ und 0,8 g KH₂PO₄
- Präinkubationspuffer: Zusammensetzung für 20 ml
1ml Serum von der Ziege (normal-goat serum); 100 µL Triton X-100; 0,2 g Rinderserumalbumin

- Biotinylierter Antikörper Ziege-anti-Kaninchen-Serum (Goat-anti-rabbit serum)
- Antikörperverdünnungspuffer
Zusammensetzung für 20 ml: 1 ml Serum von der Ziege und 100 µl Triton X-100
- Blockfixierung an Zellkulturen: 100 ml neutralgepuffertes Formol nach Lillie und 30 g D(+)-Sucrose hergestellt nach Romeis (1989), mikroskopische Technik
- Streptavidin-AP-Konjugat, Dako, Dänemark
- Holt'sches Gemisch: 30g Sucrose + 1g Gummi arabicum mischen und anschließend 100 ml Aqua dem. hinzufügen
- Chromogen-Substrat-Lösung, Zusammensetzung:
8 mg Naphtol AS-MX Phosphat gelöst in 0,2 ml Dimethylformamid (DMFA)
9,8 ml 0,1M Trispuffer (pH 8,2)
3 mg 1 M Levamisole
10 mg Fast-Red TR-Salt

2.5 Präparation der Schweineschilddrüsenzellen

Die Schweineschilddrüsen stammten von ca. 9 Monate alten, frisch geschlachteten Schweinen und wurden in toto entnommen. In eisgekühlter antibiotikahaltiger (Penicillin-Streptomycin) und antimykotikahaltiger (Amphotericin) Spinnerlösung wurden die Schilddrüsen ins Labor gebracht und unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet.

Zuerst wurde das umgebende Fett- und Bindegewebe mit einer sterilen Pinzette und Schere entfernt. Dann spülte man die Schilddrüsen drei Minuten in einer 80%igen Ethylalkohollösung. Somit konnte die nun anfixierte Kapsel und das septale Bindegewebe gut mit zwei Pinzetten entfernt werden. Danach wurde das freigelegte Schilddrüsenparenchym mit einem Skalpell in Würfel, die eine Kantenlänge von 2-3 mm besaßen, geschnitten und in ein Trypsiniergefäß, das 1 Liter Dispaselösung enthielt gegeben . In der Dispaselösung, die auf 35°C

vorgewärmt war, wurde unter ständigem Rühren (heizbarer Magnetrührer) das interstitielle Bindegewebe der Schilddrüsen abgedaut. Die Thyreozyten gingen so in Suspension über.

Zwei Stunden nach Beginn des Abdauprozesses goss man zunächst 150 ml der Enzymlösung darin flottierenden mit den Zellen durch ein Teesieb ab, um größere Bindegewebsbestandteile abzufangen. Es wurde so lange zellhaltige Enzymlösung aus dem Trypsiniergefäß entnommen, bis nur noch ein Bindegewebskonglomerat zurückblieb.

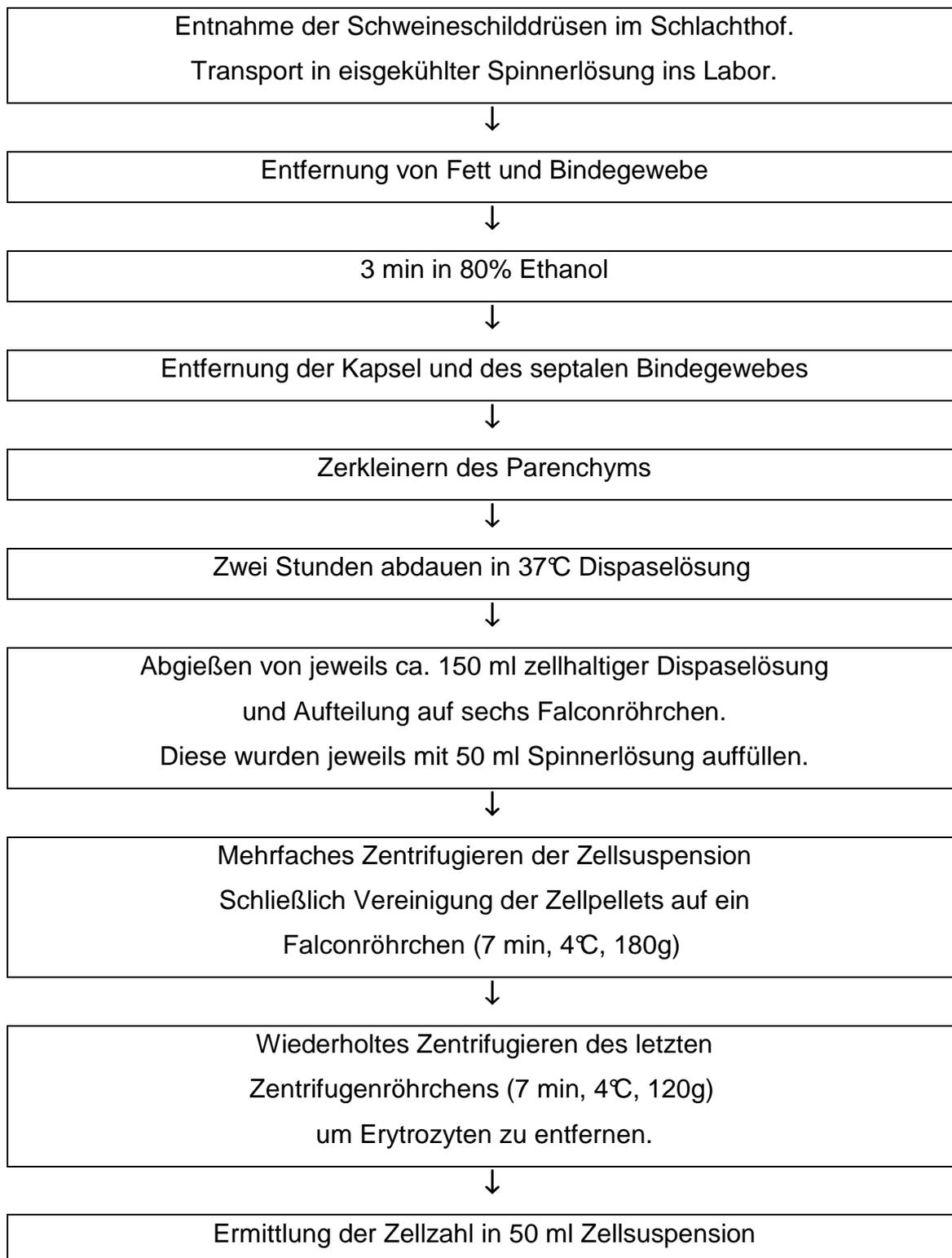
Die jeweiligen Zellsuspensionen von ca. 150 ml wurden auf je 6 Zentrifugenröhrchen (Falcon, 50 ml) verteilt und dann jedes einzelne Röhrchen mit Spinnerlösung auf 50 ml aufgefüllt. Die Röhrchen wurden nun 6 Minuten lang bei einer Temperatur von 4°C bei 180 g (=Programm 1) zentrifugiert.

Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen mittels einer Pipette resuspendiert und auf 3 Zentrifugenröhrchen verteilt. Diese Röhrchen wurden wieder mit Spinnerlösung auf 50 ml aufgefüllt und anschließend unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert (4°C, 6min, 180g).

Die allerletzten 6 Zentrifugenröhrchen wurden bei 4°C 6 Minuten lang bei 160 g (=Programm 2) zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Zellen resuspendiert und auf 2 Röhrchen minimiert. Diese wurden - wieder auf 50 ml mit Spinnerlösung aufgefüllt - mit Programm 2 zentrifugiert, dekantiert, resuspendiert und auf ein einziges Röhrchen zusammengebracht. Die Zellen in diesem Röhrchen wurden mehrfach zentrifugiert und gewaschen, bis das Zellsediment frei von einem roten Erythrozytensaum war. Dann wurde abschließend noch einmal dekantiert, gut resuspendiert und auf 50 ml Medium aufgefüllt; es konnte nun die Zellzählung durchgeführt werden.

Die Schritte der Zellpräparation sind in einem Flußdiagramm dargestellt.

2.6 Flussdiagramm der Schweinethyreozytenpräparation



2.7 Zellzählung

In einer Neubauer-Zählkammer wurden die isolierten Schweine-Schilddrüsenzellen ausgezählt. Dazu wurden sie mit Erytrosin B (45 µl Zellsuspension, 145 µl Kulturmedium, 10 µl 1%iges Erythrosin B) angefärbt. Vitale Zellen erschienen somit unter dem Mikroskop grünlich-gelb. Tote Zellen wurden rot angefärbt.

Der Anteil der vitalen Zellen betrug im Schnitt 90%.

Bei der Zellzählung wurden vier Eckquadrate ausgezählt ($=n$). Ein Eckquadrat entsprach einem Volumen von 0,1 µl. Die Zellzahl von 50 ml Medium ermittelt sich somit aus $n \times 0,1 \mu\text{l} \times 1000 \times 50 \times 4,4$. Der Faktor 4,4 ist der Verdünnungsfaktor aufgrund der Vitalfärbung.

2.8 Herstellung der Schwinethyreozytenkulturen

Für die Versuche wurde Medium NCTC-135 ohne Vitamin A (zur Variation der Vit. A Konzentration) und Medium NCTC-135 mit Vitamin A verwendet.

Als Zusätze in den Kulturmedien wurden verwendet:

- Penicillin-Streptomycin (4 ml/l Medium)
- Ultrosor G (3Vol.%)
- Hydrocortison 100 (1µg/ml Medium)
- Ciprobay 200(3 Vol.%)

Um die Zellen gleichmäßig auf die Kulturplatten auszusähen, wurden diese während der Aussaat mittels Magnetrührer in Suspension gehalten und mit einer Multipipette (Eppendorf, Hamburg) in die Kulturlöcher verteilt.

Die zu testenden Zusätze (siehe weiter unten) wurden wegen der Variabilität innerhalb eines Versuches direkt den einzelnen Kulturen zupipettiert.

Um einen möglichst genauen Mittelwert bei den Versuchsansätzen zu erhalten, wurde jeder Ansatz 4fach angelegt. Dies geschah in 48-well-Platten von Costar. Jedes Loch einer solchen Platte stellte eine Kultur dar. Normalerweise enthielt ein Loch 0,2 ml Medium bzw. 100 000 Zellen sowie 10 µl ¹²⁵Iod oder 6-³H-Thymidin.

Das pulverförmige Rosiglitazon wurde in DMSO (Dimethyl Sulfoxid) gelöst. Hierzu wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt. Die Endkonzentration des DMSO im Kulturmedium lag bei 0,05% (v/v). Um einen möglicherweise entstehenden Eigeneffekt von DMSO auf die Thyreozyten zu erfassen, wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle mit DMSO durchgeführt. Außerdem wurde bei jedem Versuch sowohl eine Kontrolle mit nicht stimulierten als auch mit TSH stimulierten Thyreozyten durchgeführt.

2.9 Herstellung von Kulturen mit Schilddrüsenmalignomzellen

Außer Schweinethyreozyten wurden auch humane Schilddrüsenmalignomzellen verwendet. Es handelt sich dabei um die kommerziell erhältlichen Zell-Linien FTC 133 und FTC 238, die von follikulären Schilddrüsen-Malignomen stammen. Diese Zell-Linien waren im Labor etabliert. Die humanen malignen Thyreozyten (Stamm FTC-133/94060901 und FTC-238/94060902) verwendet befanden sich in 200 ml-Zellkulturflaschen und wurden mit 20 ml Kulturmedium versorgt, welches aus 18 ml DMEM und 10%(Stamm133) bzw. 5%(Stamm238) fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin bestand. Die Zellen wurden bei 37 °C inkubiert und alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Anzahl der vorausgegangenen Passagen ließ sich für die hier verwendeten Zellen nicht mehr erfassen.

Das Ablösen der adhärenenten Thyreozyten vom Kulturflaschenboden erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dazu wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und

die auf dem Flaschenboden haftenden Zellen mit 10 ml auf 37°C vorgewärmter PBS-Lösung gespült.

Nach dem Absaugen der PBS-Lösung wurden die Zellen mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung (1:10 in PBS verdünnt) versehen und 3-4 min bei 37°C inkubiert; hierbei lösten sich die Zellen vom Gefässboden. Die Zellen wurden daraufhin abpipettiert und in ein Falcon-Röhrchen überführt. Die Kulturflaschen wurden zweimal mit 5 ml Medium gut nachgespült, welches in dieselben Falconröhrchen gegeben wurde.

Daraufhin zentrifugierte, dekantierte und resuspendierte man die Zellen. Anschließend erfolgte die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wie unter Kapitel 2.2.

Die Abb. 1-6 zeigen diese transformierten Zelle in Kultur.

2.10 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellkulturen

Die angelegten Kulturen wurden unter Lichtabschluss in einem mit Wasserdampf gesättigten Inkubator bei 37°C mit 95% Luft und 5% CO₂ begast. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 2 und 88 Stunden. Mit zunehmender Inkubationsdauer adhärten die Thyreozyten mehr am Plattenboden.

An den Thyreozyten getestete Stimulanzen

- **Rosiglitazon** (2,5 mg in 500 µl DMSO gelöst; In jedes Kulturloch wurden jeweils 10µl Rosiglitazon in folgenden Konzentrationen gegeben: 0,1 µM, 1µM, 2,5µM, 5µM, 7,5µM, 10µM, 50µM und 100µM)
- **TSH** (1,3 mU/ml in 740µl Spinner-Lösung gelöst, 10µl davon wurden jeweils einer Zellkultur mit 0,2 ml Medium hinzugefügt)
- **Vitamin E** (Tocopherol) (500mg in 472,73µl DMSO lösen; somit sind in 10µl 2000 µmol enthalten; Lösung war gallertig und löste sich schlecht; Konzentrationen: 50µM, 10µM und 5µM)
- **Vitamin A** (Retinol, gelöst in Methanol,)

- **Retinsäure** (gelöst in Methanol,)

2.11 Photographische Abbildungen der malignen humanen Thyreozyten

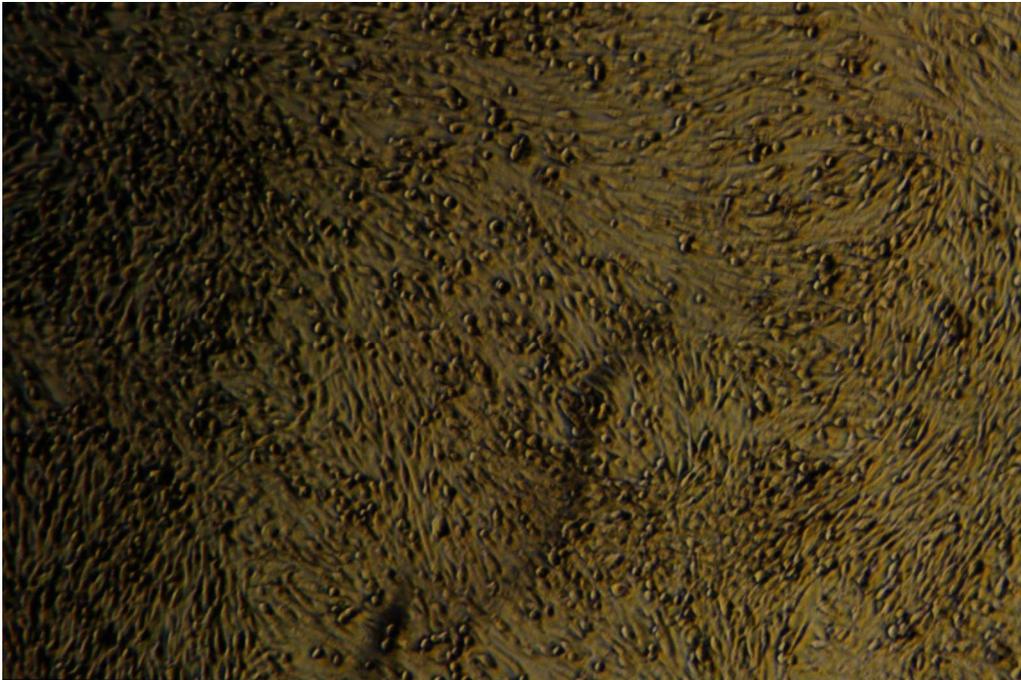


Abb.1

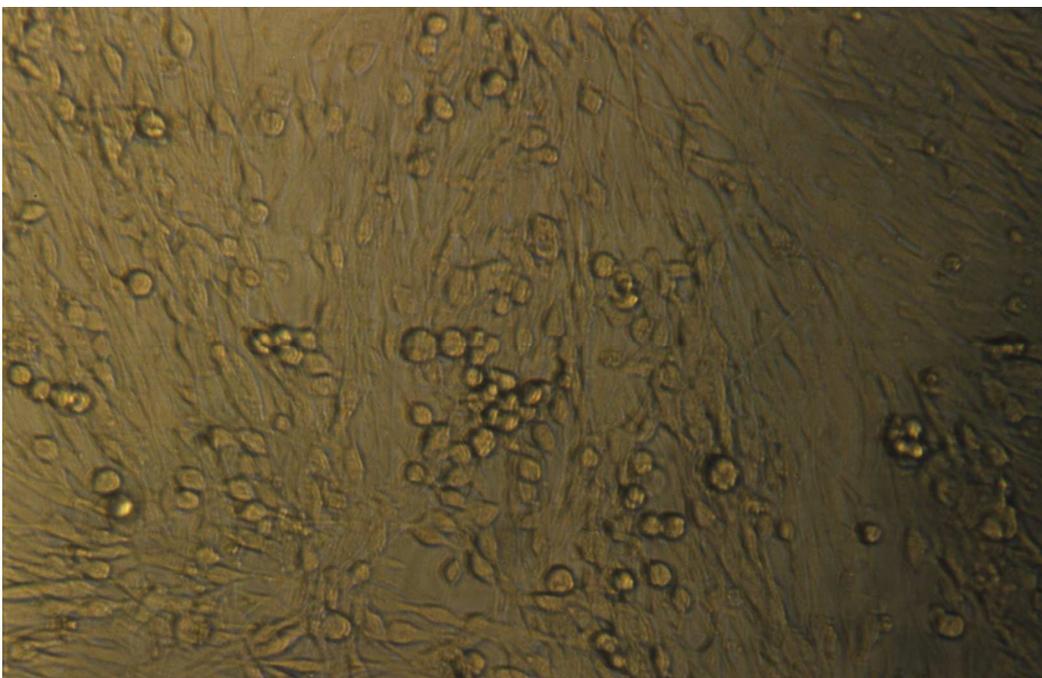


Abb.2

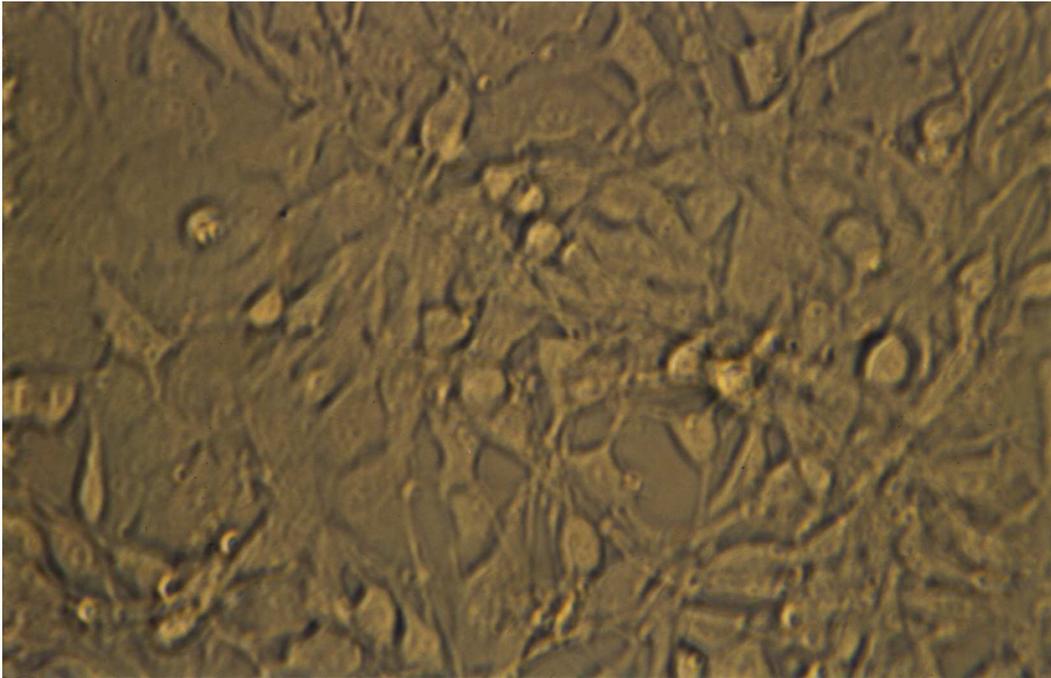


Abb.3

Abbildungen 1,2,und 3 stellen die Zelllinie FTC 133 dar. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mit steigender Vergrößerung (100fach, 400fach, 10000fach) vorgenommen. Die Aufnahmen wurden während der Kultivierung im Inkubator aufgenommen.



Abb.4

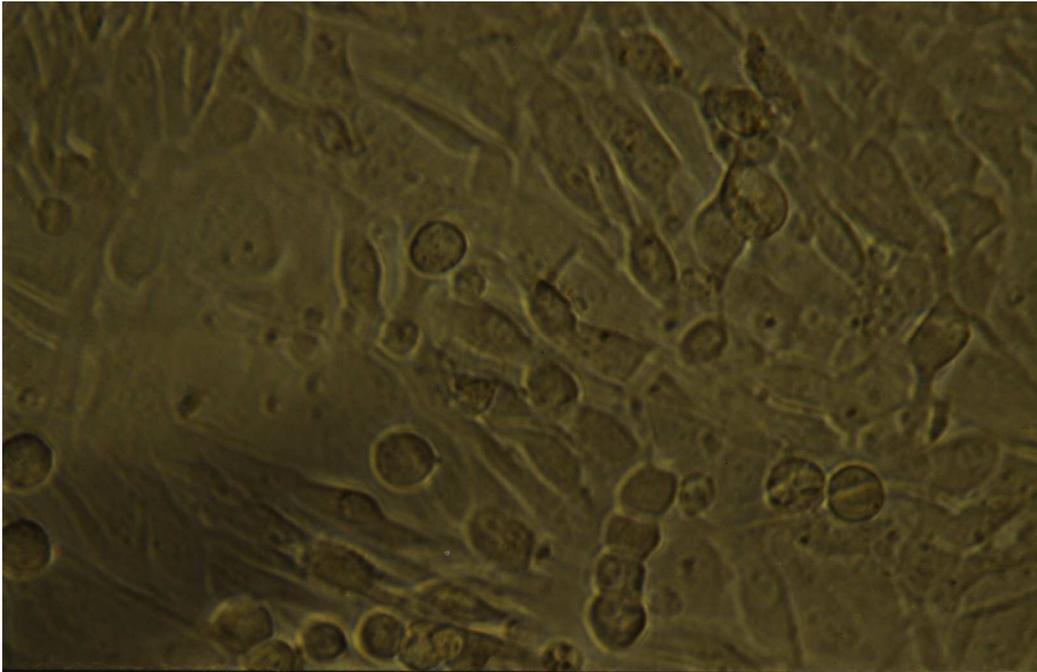


Abb.5

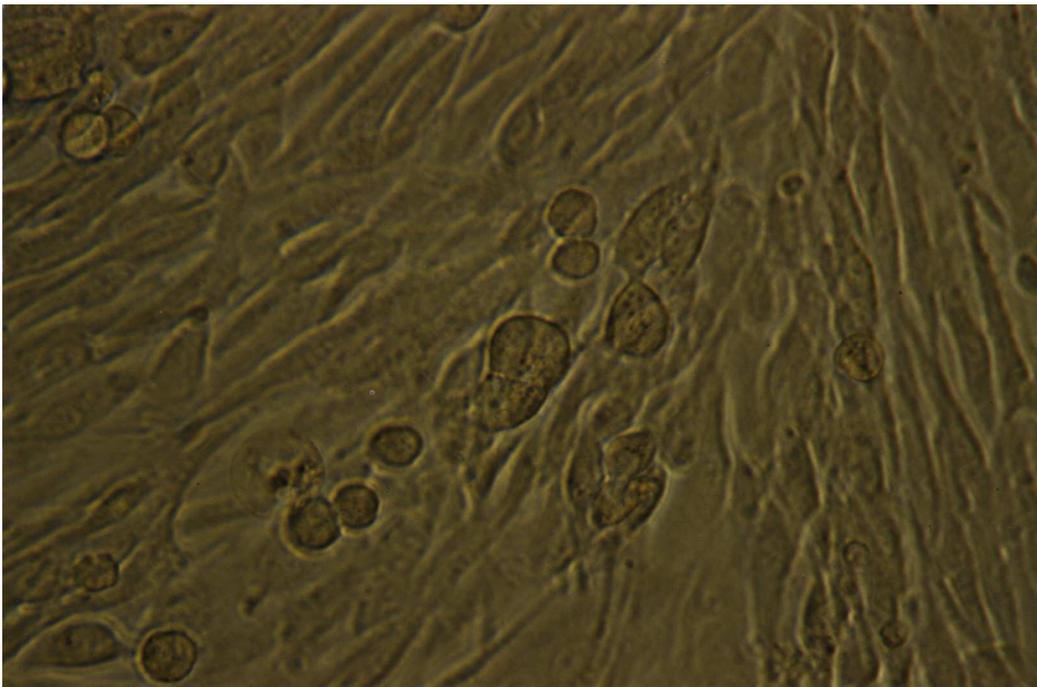


Abb.6

Abbildungen 4,5 und 6 sind Photographien der Zelllinie FTC 238 unter dem Mikroskop mit 100-facher und 2-mal 1000-facher Vergrößerung. Auch diese Aufnahmen wurden während der Kultivierung im Brutschrank durchgeführt.

2.12 Mycoplasmennachweis

Mycoplasmen sind verbreitete Kontaminationen von Zellkulturen. Sie üben eine Vielzahl an Effekten auf die infizierten Zellen in der Kultur aus.

Bei den verwendeten Schwinethyreozytenkulturen handelte es sich um Primärkulturen, wobei das Ausgangsmaterial aus dem Schlachthof stammte. Es bestand also die Möglichkeit einer Kontamination mit Mycoplasmen.

Mykoplasmen können insbesondere Thymidin aufnehmen. Da diese einen Durchmesser von $0,8\mu\text{m}$ haben, werden sie von dem Filterpapier (Porengröße: $1,5\mu\text{m}$) nicht zurückgehalten und können somit eigentlich nicht mitgemessen werden. Es bestand trotzdem die Gefahr, dass die Versuche aufgrund der Mycoplasmen verfälscht werden könnten.

Zur Kontrolle wurde ein Enzym-Immunoassay, Mycoplasma Detection Kit, Roche Mannheim, für den Nachweis von Mycoplasmen in der Zellkultur durchgeführt.

Das Testprinzip beruhte auf der ELISA-Technik und benutzt polyklonale Antikörper.

Im ersten Schritt wurde Wand-Antikörper adsorptiv an die Wand der Vertiefung einer Mikrotiterplatte (96 Näpfe mit je ca. $300\mu\text{l}$) fixiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen mit Blockierungslösung abgesättigt. Im zweiten Inkubationsschritt (II) band das Antigen (Mycoplasmen) in der Probe an den korrespondierenden Wandantikörper. An das Antigen band im dritten Schritt (III) das Biotin. An Biotin knüpfte sich dann im vierten Schritt (IV) Streptavidin-AP. Die im Komplex gebundene AP wurde durch enzymatische Umsetzung von 4-Nitrophenylphosphat (fünfter Schritt) visualisiert. Der optische Nachweis war dabei der Mycoplasmenkonzentration proportional.

Zu jeder Versuchsreihe wurde sowohl eine positive als auch eine negative Mycoplasmenkontrolle durchgeführt.

Die Testdauer betrug einen Tag mit Inkubation über Nacht.

Die Auswertung erfolgte visuell: positiv = gelb; negativ = farblos.

2.13 Zellernte

- Messung der Iodaufnahme

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Hilfe eines cell-harvesters auf ein Filterpapier gesaugt. Das nun mit Zellen besetzte Filterpapier wurde in ein Reagenzröhrchen gegeben und die Radioaktivität des ^{125}I im γ -Counter gemessen

- Messung der ^3H -Thymidinaufnahme

Die Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit Hilfe eines Cell-harvesters auf ein Filterpapier gesaugt. Das nun mit Zellen besetzte Filterpapier wurde in ein Szintillationsröhrchen gegeben, welches mit Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold) aufgefüllt wurde. Im β -Counter wurde daraufhin die Radioaktivität von ^3H gemessen.

2.14 Cytochemische Darstellung des Natrium-Iodid-Symporter

Das Prinzip des Nachweises von NIS-anti-NIS-Komplexen auf der Zelloberfläche mittels Immunenzymtechnik beruht auf:

- Bindung des ersten Antikörpers (NIS-Antikörper von Kaninchen) an das Antigen
- Bindung des biotinylierten Zweitantikörpers (Ziege-anti-Kaninchen) an den ersten Antikörper
- Zugabe des enzymmarkierten Streptavidin, welches mit dem Biotin am Zweitantikörper einen festen Komplex bildet
- Zugabe von Chromogen-Substratlösung. Es wird so das fixierte Enzym sichtbar

Die Vorgehensweise zur Darstellung des Natrium-Iodid-Symporters gilt sowohl für maligne humane als auch für Schweinethyreozyten:

Die Zellkulturen wurden hierfür wie üblich nach dem Schema aus Kapitel 3.1-3.5 hergestellt. Daraufhin wurden die Thyreozyten jedoch in 6 Loch-Platten von Costar mit jeweils 3 000 000 Zellen pro Loch ausgesät. Nachdem die Zellen mit Rosiglitazon und wahlweise mit Vitamin A stimuliert wurden, folgte eine Inkubationszeit von 4, 17 oder 41 Stunden. Mit einer Kolbenhubpipette wurde der Überstand nach den verschiedenen Inkubationszeiten aus den Kulturlöchern weitgehend abgesaugt. Die Zellen wurden dann durch wiederholtes Ansaugen und Ausblasen des Mediums mit der Kolbenhubpipette vom Boden der Platten abgelöst.

Der Inhalt zweier Löcher wurde daraufhin in 50 ml Falcon-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Löcher der Kulturplatten wurden mit jeweils 1 ml EDTA (0,5 M) ausgespült und die Spüllösung zu den Zellen hinzugefügt. Diese wurden daraufhin bei 180gn und 4°C zentrifugiert.

Nach dem Dekandieren wurde in jedes Zentrifugenröhrchen ein 1 ml EDTA dazugegeben. Durch eine Resuspension sollte das Verklumpen der Zellen durch Ca^{2+} -Entzug verhindert werden. Daraufhin erfolgte die Resuspension. Sofort danach lagerte man die Thyreozyten auf Eis.

Dann wurden auf jeweils zwei mit Chromalaungelatine beschichtete Objektträger 250 µl Zellsuspension je Stimulation gleichmäßig aufgetragen und ähnlich eines Blutausriches dünn ausgestrichen. Die anschließende Lufttrocknung der Objektträger erfolgte bei 37° C circa 2 Stunden im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellkulturen 10 Minuten blockfixiert durch 4%iges Paraformaldehyd. Nun wurden die Objektträger 10 Minuten in Holtsches Gemisch eingetaucht und luftgetrocknet.

Um das Wasser zu entziehen, wurden die Objektträger 10 Minuten lang in eisgekühltes Aceton eingebracht. Danach erfolgte wieder einige Minuten lang eine Lufttrocknung.

Daraufhin wurden die Objektträger in PBS-Puffer gespült und Anschließend der Präinkubationspuffer (100 µl/Objektträger, 30 Minuten) aufgetragen. Um eine

gleichmäßige Verteilung des Präinkubationspuffers zu erzielen, bedeckte man die Objektträger mit Parafilm. Nach diesen Arbeitsschritten waren die Präparate für den immunologischen Nachweis des Natrium-Iodid-Symporters vorbereitet.

Nun erfolgte das Aufbringen des zuvor verdünnten Antikörpers NIS 3 auf die Objektträger (Konzentration 1:200; 160 µl/Objektträger), wobei zuvor der Präinkubationspuffer abgeschüttelt wurde.

Die Objektträger wurden mit Parafilm abgedeckt und die Präparate über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach nochmaligem Spülen mit PBS wurden die Objektträger eine Stunde lang mit dem biotinylierten Antikörper (Ziege-Anti-Kaninchen-Serum 1:100 verdünnt mit Antikörper Verdünnungspuffer) inkubiert.

Es erfolgte ein erneutes Spülen mit PBS-Puffer und danach das Auftragen von Streptavidin-Enzym-Konjugat (mit PBS-Puffer 1:150 verdünnt; 40 Minuten bei Zimmertemperatur). Als streptavidinfixiertes Enzym wurde alkalische Phosphatase (AP) gewählt. Durch das Aufbringen einer Chromogen-Substrat-Lösung über 40 bis 60 Minuten wurde der Komplex rot angefärbt. Nach dem Abgießen der Lösung die Objektträger mit Deckgläschen in Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt.

Unter dem Mikroskop erfolgte die Auswertung der zytochemischen Darstellung des Natrium-Iodid-Symporters durch das Auszählen der markierten NIS-positiven Zellen.

2.15 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels Dunnett-Test. Dieser Test ermöglicht multiple Vergleiche mit den Durchschnittswerten einer Kontrollgruppe. Die Wahrscheinlichkeit einer falschen Interpretation liegt nach Dunnett bei diesem Verfahren unter 5%. Der herkömmliche t-Test ist folglich nicht annähernd so signifikant. Im Dunnett-Test sind alle Ergebnisse signifikant, wenn $p > 5\%$ ist und die Werte positiv sind.

Die Statistik ist im Anhang aufgeführt. Zusätzlich finden sich dort Abbildungen, in denen die über alle inkubationszeiten gemessenen Einbauraten von ^{125}I -Iodid und ^3H -Thymidin gemittelt wurden. Diese Abbildungen wurden in der Diskussion jedoch nicht weiter berücksichtigt, da sonst passagere Effekte nicht erfasst werden.

Für die Durchführung wurde das Statistikprogramm JMP5 von SAS eingesetzt. Für die statistische Beratung und Betreuung danke ich Herrn Dr. Eichner, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen von kultivierten malignen humanen Thyreozyten

3.1.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Retinolkonzentrationen

Kultivierte menschliche Thyreozyten (FTC 133) wurden mit 5, 10, 50 µM Rosiglitazon oder mit 1,3 mU/ml TSH stimuliert. Dem Medium war wahlweise Vitamin A (Retinol) in den Konzentrationen 0; 0,6 und 1,8 µM zugesetzt worden. Die Zugabe der stimulierenden Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen, die weder mit Rosiglitazon noch mit TSH versehen wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als weitere Kontrollgruppe diente DMSO, das Lösungsmittel für Rosiglitazon.

Die Iodaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40 und 64 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit TSH, DMSO und steigenden Troglitazonkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 7, 8 und 9 dargestellt. Die diesen 3 Abbildungen zugrunde liegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

In Vitamin A freiem Medium (Abb. 7) erzielte Rosiglitazon in der Konzentration 10 µM zu allen Messzeitpunkten eine signifikante Steigerung der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten (bis zum 2,8-fachen der Retinoidaufnahme in die Kontrolle). Ansonsten konnte nur noch nach 40 h unter TSH (1,3 mU/ml) mit einer Steigerung um das 1,9-fache eine nennenswerte additive Radiolodaufnahme erreicht werden.

Unter einer Vitamin A-Konzentration im Medium von 0,6 µM (Abb. 8) wurden wiederum unter 10 µM Rosiglitazon zwischen 2 und 64 Stunden im Vergleich

zur Kontrolle signifikante unterschiedliche Radioiodinkorporationen erzielt. Betrachtete man den zeitlichen Verlauf, so stiegen die Einbauraten vom 1,5-fachen nach 2 Stunden bis zum 2,2- und 2,5-fachen nach 4 und 16 Stunden an. Danach verringerte sich der additive Effekt nach 40n und 64 Stunden wieder auf das 1,8-fache.

Betrag die Vitamin A-Konzentration im Medium $1,8 \mu\text{M}$ (Abb. 9), so fand sich nach 2 Stunden Inkubationsdauer unter allen Rosiglitazonkonzentrationen eine gesteigerte Radiolodaufnahme, die sich signifikant von jenen bei den Kontrollen unterschied. Die höchste Einbaurate (3,2-faches) wurde wiederum unter $10 \mu\text{M}$ Rosiglitazon erreicht. Auch bei den übrigen Messzeitpunkten war $10 \mu\text{M}$ Rosiglitazon diejenige Konzentration, welche Einbauraten erzielte, die zur Kontrolle signifikant verschieden waren. Rosiglitazon in $5 \mu\text{M}$ Konzentration bewirkte nur nach 2 Stunden eine additive Iodaufnahme, $50 \mu\text{M}$ Rosiglitazon nur nach 2 und nach 16 Stunden. Unter TSH war die Radioiodidaufnahme nach 2 und 16 Stunden signifikant zur Kontrolle verschieden.

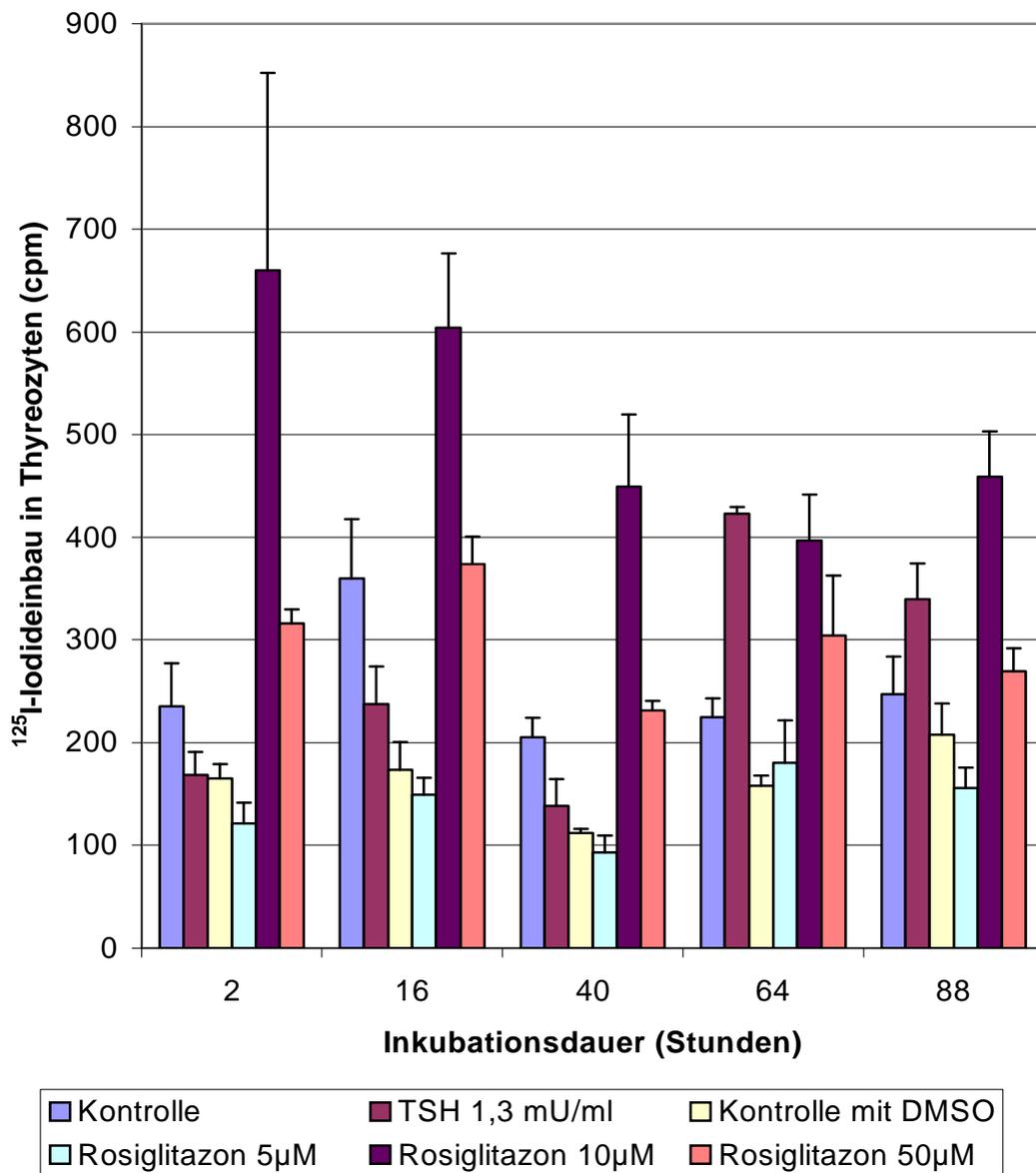


Abb.7: Einfluss von Rosiglitazon auf den Iodaufnahme in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO und mit Rosiglitazon (5; 10; 50 µM) beim Aussäen der Zellen. Das Medium war Vitamin A-frei. Gemessen wurde die Iodaufnahme nach 2, 16, 40 und 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ¹²⁵I-Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.1 im Anhang).

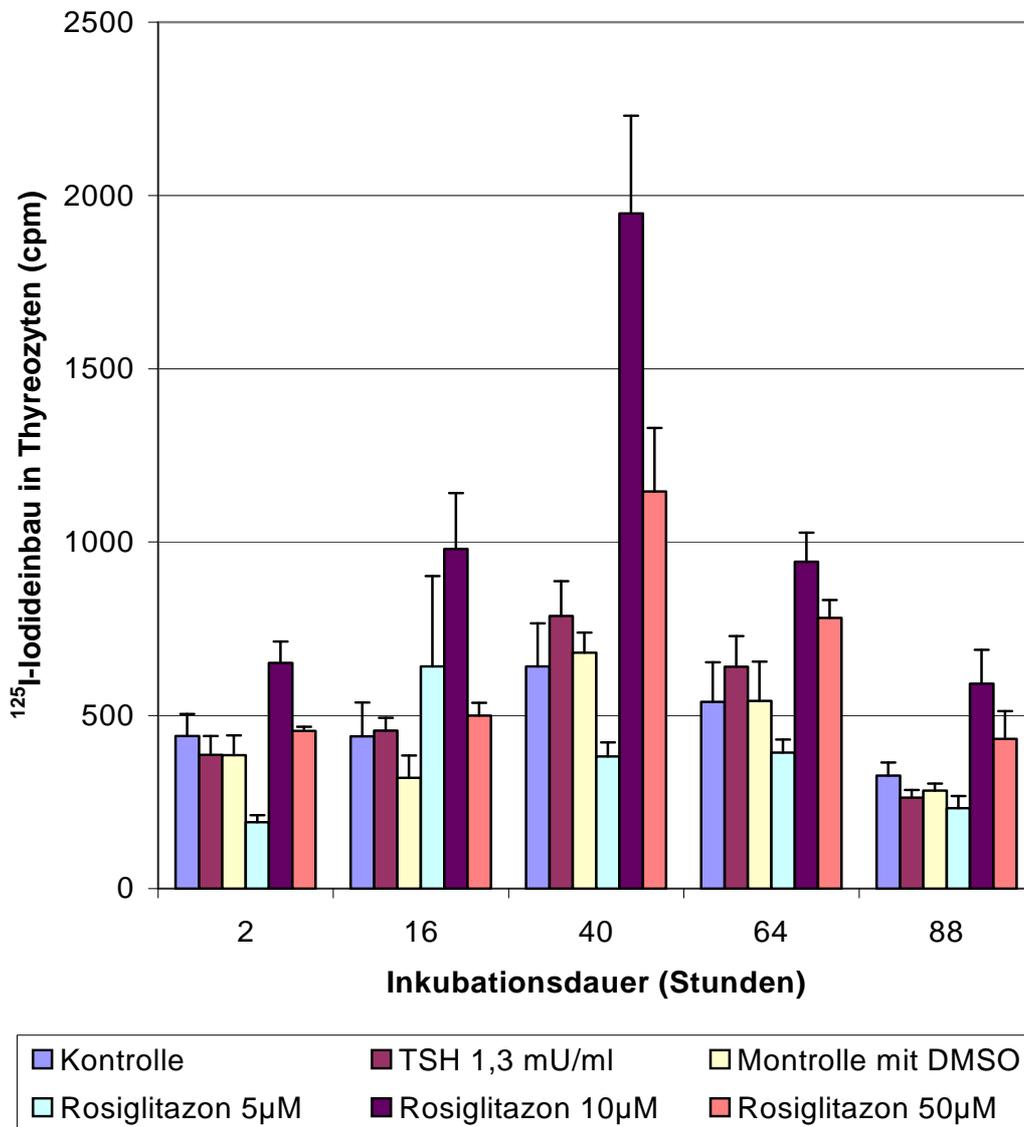


Abb.8: Einfluss von Rosiglitazon auf den Iodaufnahme in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. 0,6 µM Vitamin A-Konzentration im Medium. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO und mit Rosiglitazon (5; 10; 50 µM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde die Iodaufnahme nach 2, 16, 40 und 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ¹²⁵I-Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.2 im Anhang).

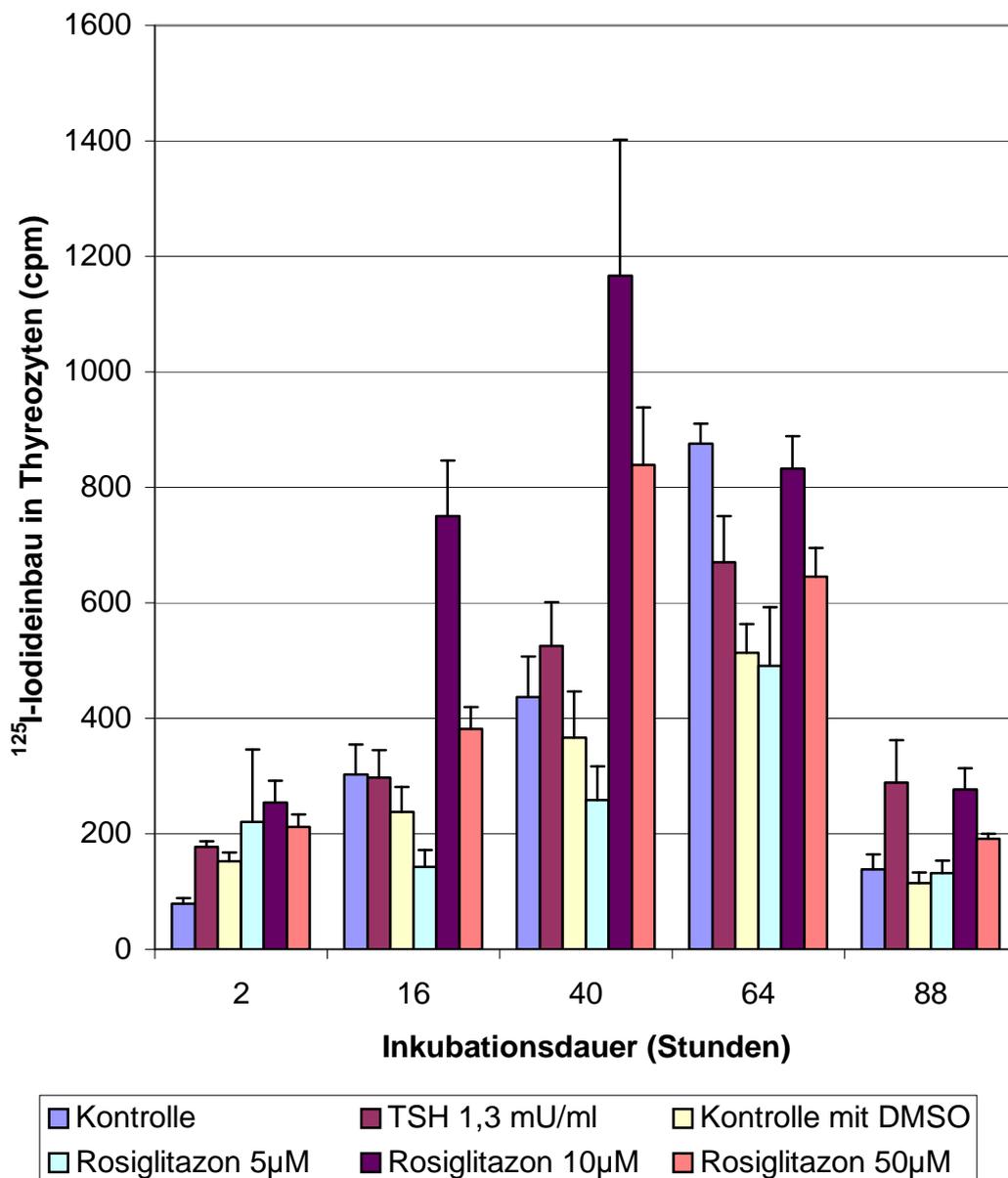


Abb.9: Einfluss von Rosiglitazon auf den Iodaufnahme in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. 1,8 µM Vitamin A-Konzentration im Medium. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO und mit Rosiglitazon (5; 10; 50 µM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde die Iodaufnahme nach 2, 16, 40 und 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ¹²⁵I-Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.3 im Anhang).

3.1.2 ³H-Thymidineeinbau in maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Vitamin A-Konzentrationen

Die malignen humanen Thyreozyten (FTC 133) wurden mit Rosiglitazon in folgenden Konzentrationen stimuliert: 1 µM, 2,5 µM und 10 µM. Ein Teil der Schilddrüsenzellen wurden auch mit 1,3 mU/ml TSH oder mit 100 µM DMSO behandelt. DMSO wurde als Lösungsmittel für Rosiglitazon verwendet. Das Kulturmedium war wahlweise Vitamin A-frei oder enthielt 0,6, 1,8 oder 3,6 µM Vitamin A. Die Stimulanzen wurden den Zellen direkt beim Aussäen zugefügt. Die stimulierten Thyreozyten wurden dann mit Schilddrüsenzellen ohne jegliche Zusätze (= Kontrollgruppe) verglichen. Die Thymidininkorporation wurde nach einer Stimulationszeit von 4; 16; 40 und 64 Stunden gemessen. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10, 11, 12 und 13 dargestellt. Die diesen 4 Abbildungen zugrunde liegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

Wie Abbildung 10 zeigt, kam es in Vitamin A-freiem Medium weder nach einer Stimulationszeit von 4 noch von 6 Stunden zu einem signifikanten Einbau von Thymidin in die Thyreozyten. Nach einer Thymidinaufnahme unter allen Zusätzen gegenüber der Kontrolle. Unter 1,3 mU/ml TSH war der Einbau von Thymidin in die Schilddrüsenzellen 1,8-fach und damit signifikant gegenüber der Kontrolle verstärkt, gefolgt von 10 µM, 2,5 µM und 1 µM Rosiglitazon und 100 µM DMSO. Lediglich nach 64 Stunden war die Thymidinaufnahme unter DMSO nicht mehr signifikant zur Kontrolle verschieden

Enthielt das Medium 0,6 µM Vitamin A (Abb.11), so zeigte sich darunter kein weiterer additiver Effekt, sondern nur eine Verschiebung des signifikanten Thyreozyteneinbaus. Nach 4 Stunden war der Unterschied zur Kontrolle unter TSH und 10 µM Rosiglitazon verschieden. Nach 40 Stunden bewirkten alle Zusätze signifikante Unterschiede. Nach 40 Stunden betrug die Thymidinaufnahme unter 2,5 und 10 µM Rosiglitazon gut das 1,8-fache der Kontrolle.

Wurde die Vitamin A Konzentration im Medium auf 1,8 μM erhöht (Abb. 12), so zeigte sich nach 4 Stunden Stimulationszeit sowohl durch 1,3 mU/ml TSH als auch durch 100 μM DMSO oder durch 10 μM Rosiglitazon eine signifikante Erhöhung der Thymidinaufnahme die das 1,7-fache der Kontrolle erreicht. Nach 40 und nach 64 Stunden Stimulationszeit bewirkten alle Stimulanzen einen additiven Effekt, die Thymidinaufnahme in die Schilddrüsenzellen erhöhte sich sogar bis um das 2,8-fache. Nach 64 Stunden war der Stimulationseffekt allerdings etwas geringer als nach 40 Stunden.

Nach einer weiteren Erhöhung der Vitamin A-Konzentration im Medium auf 3,6 μM Vitamin A (Abb. 13), nimmt die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten im Vergleich zu geringeren Vitamin A Konzentration wieder ab. Trotzdem erhöhte sich auch hier die Thymidinaufnahme nach 4 und 40 Stunden Stimulationszeit unter allen Zusätzen und nach 64 Stunden nur noch unter 1 und 2,5 μM Rosiglitazon noch signifikant zur Kontrolle.

Bei einer Vitamin A Konzentration fand somit der höchste additive Effekt statt. Nicht eine dieser Untersuchungen führte zu einer signifikant verminderten Thymidinaufnahme.

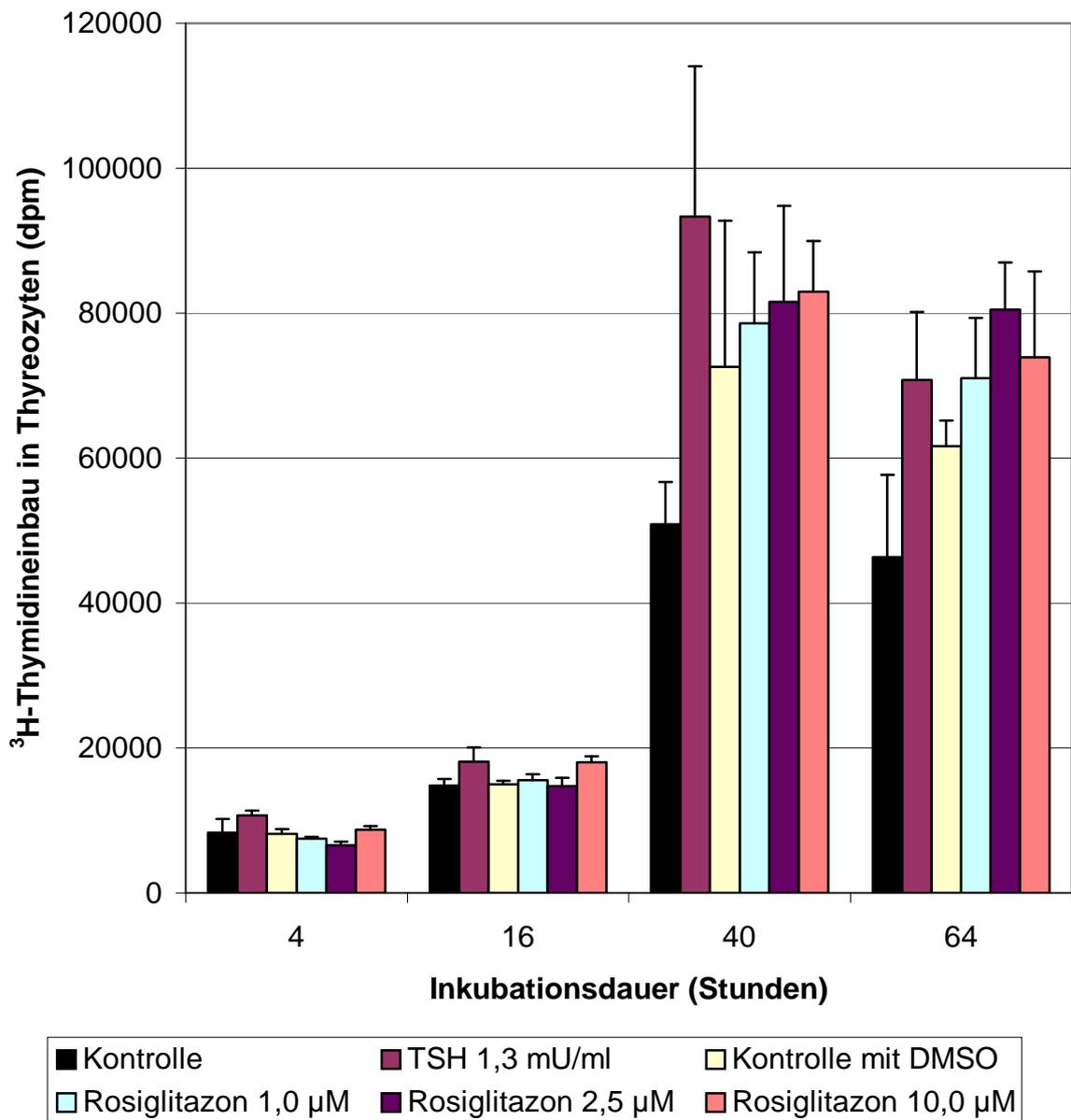


Abb.10: Einfluss von Rosiglitazon auf den Tritiumeinbau in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO und mit Rosiglitazon (1; 2,5; 10 µM) beim Aussäen der Zellen. Das Medium war Vitamin A-frei. Gemessen wurde der Tritiumeinbau nach 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ³H-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.4 im Anhang).

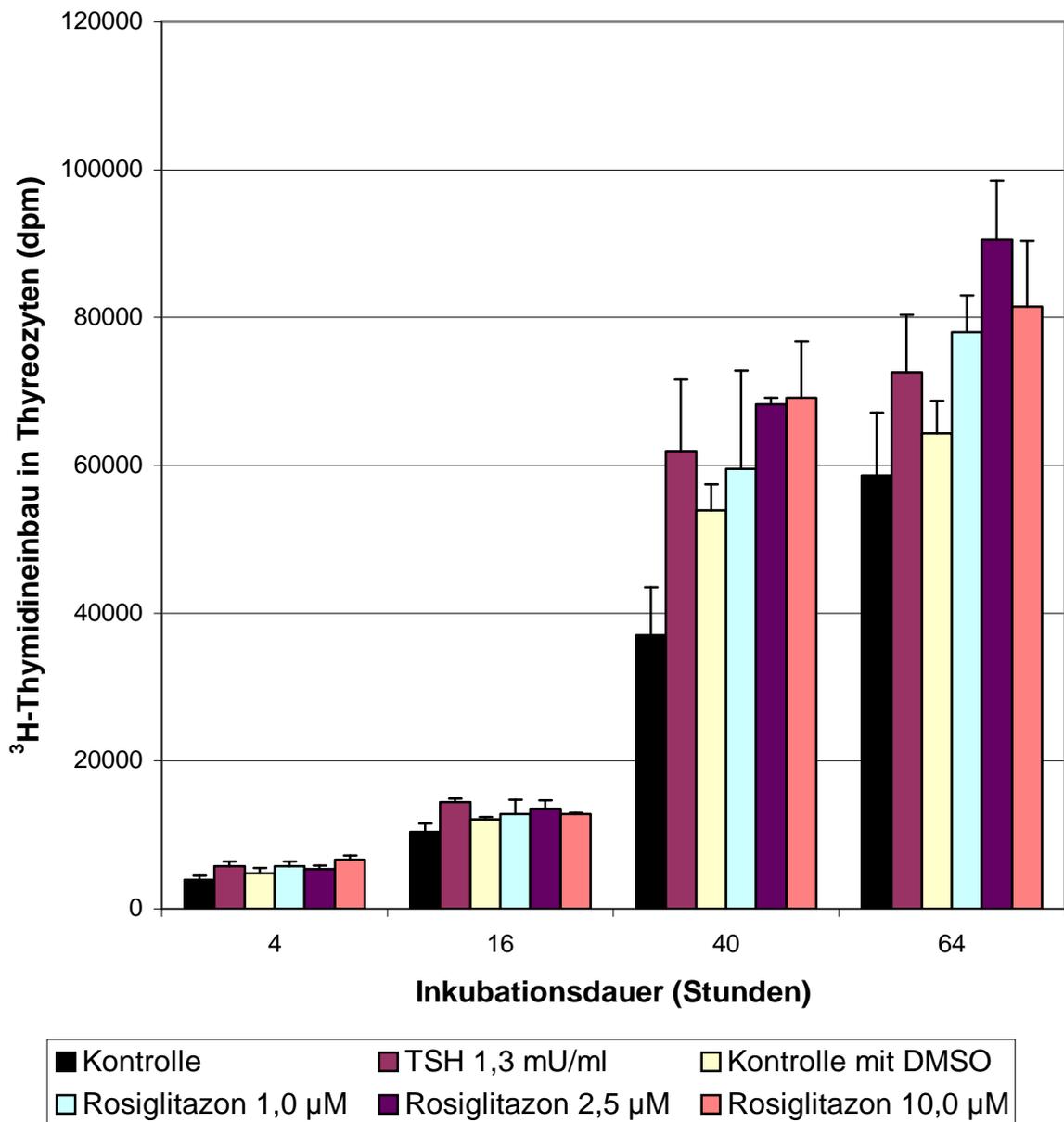


Abb.11: Einfluss von Rosiglitazon auf den Tritiumeinbau in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Das Medium enthielt 0,6 µM Vitamin A. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO und mit Rosiglitazon (1; 2,5; 10 µM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde der Tritiumeinbau nach 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ³H-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.5 im Anhang).

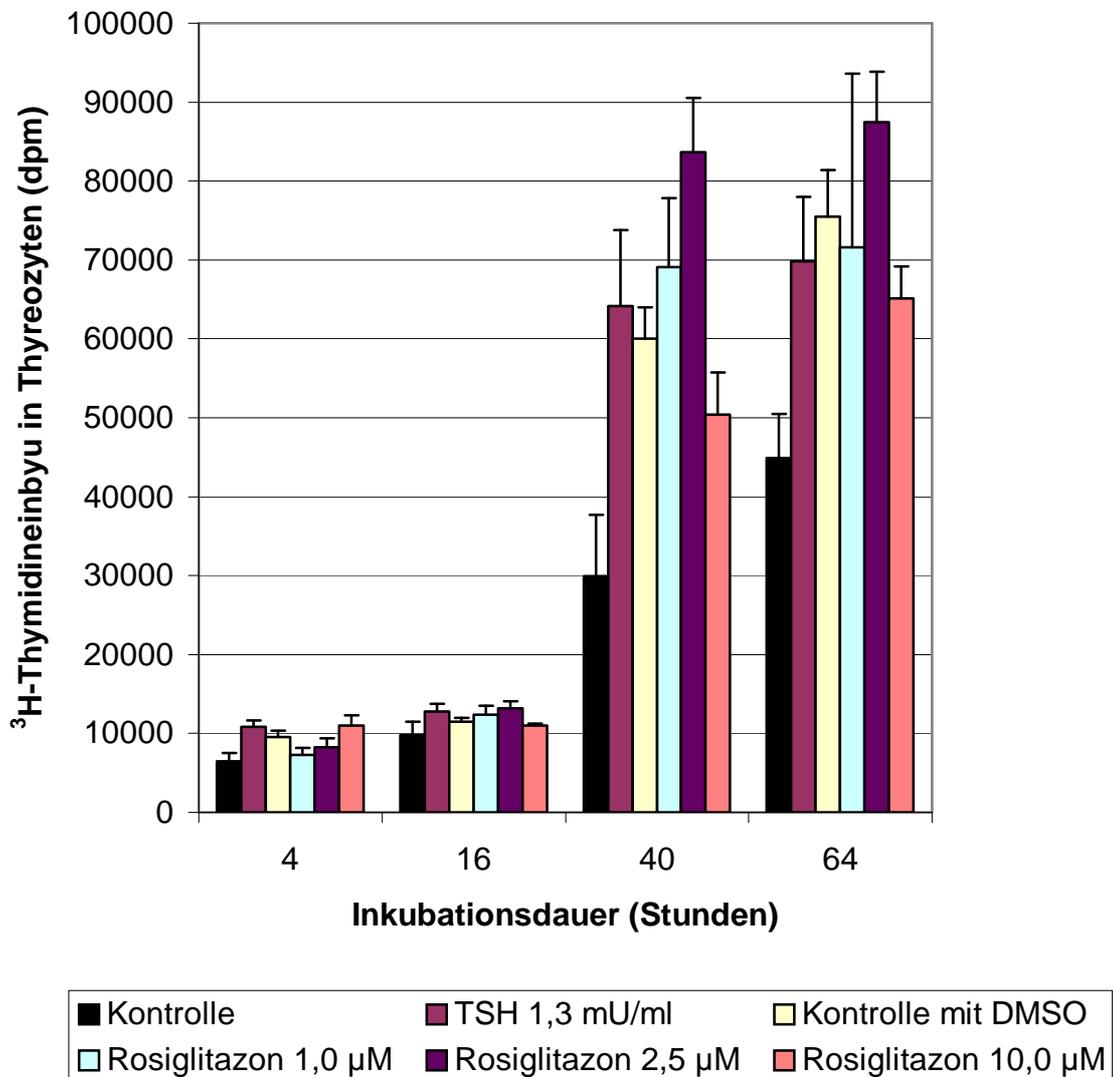


Abb.12: Einfluss von Rosiglitazon auf den Tritiumeinbau in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Das Medium enthielt 1,8 μM Vitamin A. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO und mit Rosiglitazon (1; 2,5; 10 μM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde der Tritiumeinbau nach 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ³H-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.6 im Anhang).

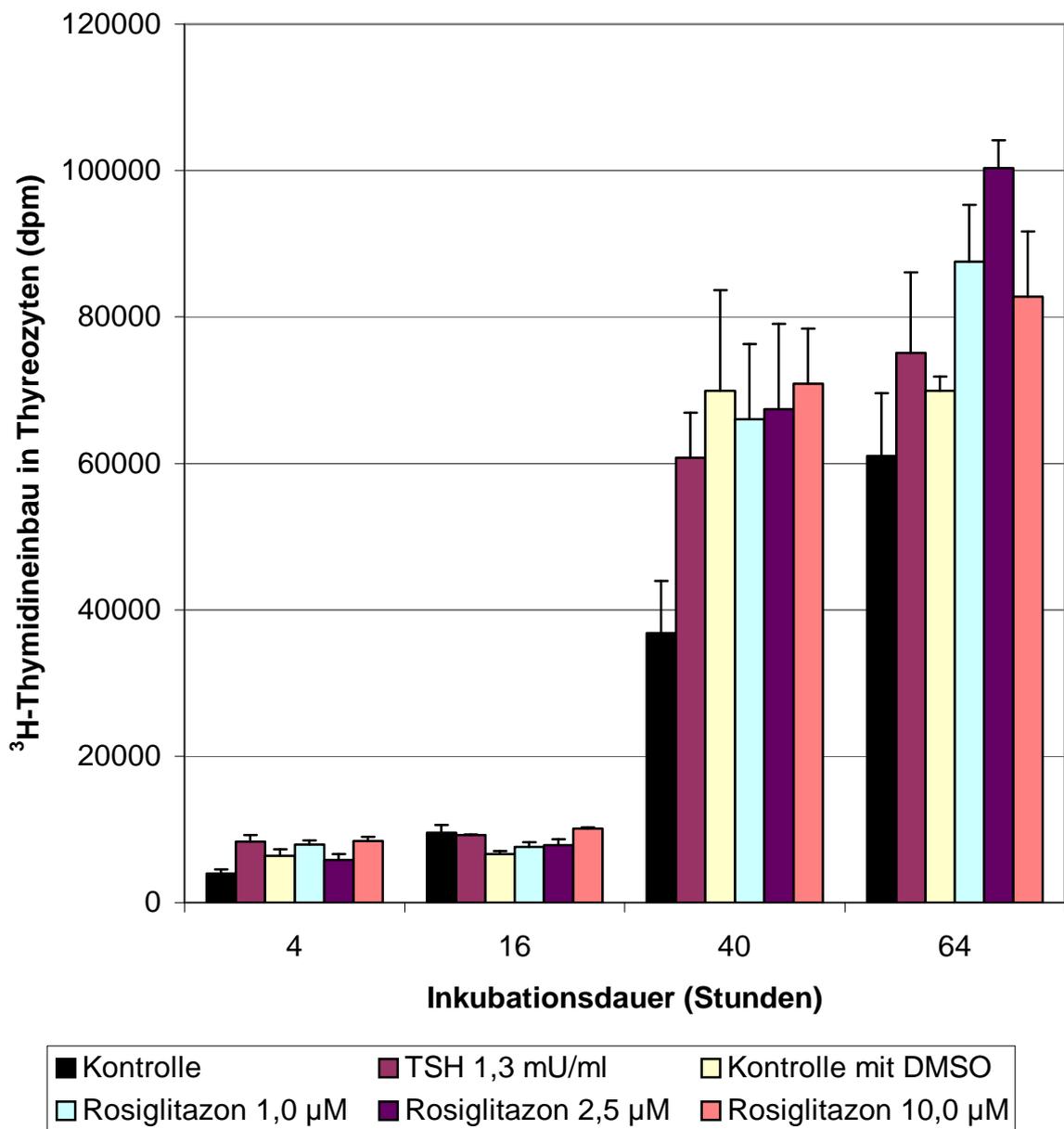


Abb.13: Einfluss von Rosiglitazon auf den Tritiumeinbau in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. das Medium enthielt 3,6 μM Vitamin A. Stimulation der Schilddrüsenzellkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO und mit Rosiglitazon (1; 2,5; 10 μM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde der Tritiumeinbau nach 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ³H-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.7 im Anhang).

3.2 Untersuchungen an kultivierten gesunden Schweinethyreozyten

3.2.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Retinolkonzentrationen

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 7,5; 10; 50 und 100 µM Rosiglitazon oder mit 1,3 mU TSH oder 100 µM DMSO stimuliert. Das Medium war wahlweise Vitamin A-frei oder enthielt Vitamin A (Retinol) in den Konzentrationen 0,6; 1,8 und 3,6 µM. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die weder mit Rosiglitazon noch mit TSH oder DMSO behandelt wurden.

Die Iodaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubation gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit TSH, DMSO oder mit steigenden Rosiglitazonkonzentrationen stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in den Abbildungen 14, 15, 16 und 17 dargestellt. Die diesen 4 Abbildungen zugrunde liegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

In Vitamin A-freiem Medium (Abb. 14) bewirkte nach 2, 4 und 16 Stunden Inkubation keine der eingesetzten Substanzen einen signifikanten Einfluss auf die Radioiodinkorporation in kultivierte Schweinethyreozyten. Nach einer Inkubationsdauer von 16 und 40 Stunden konnte lediglich eine tendenzielle Verstärkung der Iodidaufnahme beobachtet werden. Nach 64 Stunden förderte Rosiglitazon mit der Konzentration 10, 50 und 100 µM die Radioiodinkorporation signifikant. Unter 10 µM betrug der Unterschied zur Kontrolle dann das 1,6-fache.

Betrug die Vitamin A-Konzentration im Medium 0,6 µM, so fand sowohl nach 2 als auch nach 4, 16 und 64 Stunden kein signifikanter Einbau von Radioiod

statt. Nach 40 Stunden Inkubation erhöhte 100 μM Rosiglitazon den Iodaufnahme um das 1,4-fache, 10 μM Rosiglitazon und TSH um das 1,5-fache, 50 μM Rosiglitazon um das 1,6-fache und DMSO um das 1,7-fache gegenüber der Kontrolle.

Betrag die Vitamin A-Konzentration im Medium 1,8 μM , so fand sich nach Messzeiten von 2, 4 16 und 40 Stunden Inkubation kein zusätzlicher additiver Effekt auf die Radioiodinkorporation im Vergleich zu nicht mit Vitamin A-stimulierten Zellen. Nach 64 Stunden kam es unter TSH und unter 100 μM Rosiglitazon lediglich zu einer schwach signifikant gesteigerten Iodaufnahme um das 1,4 - 1,5-fache der Kontrolle.

Wurde die Vitamin A-Konzentration im Medium weiter auf 3,6 μM gesteigert, so stellte man fest, daß nach 2; 4 und 64 Stunden Inkubationsdauer im Vergleich zur Kontrolle keine signifikant gesteigerte Radioiodidaufnahme erzielt wurde. Nach 16 Stunden war die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten unter DMSO und unter 7,5; 10 und 100 μM Rosiglitazon signifikant gesteigert. Nach 40 Stunden wurden solche Effekte bei DMSO und unter 50 und 100 μM Rosiglitazon beobachtet.

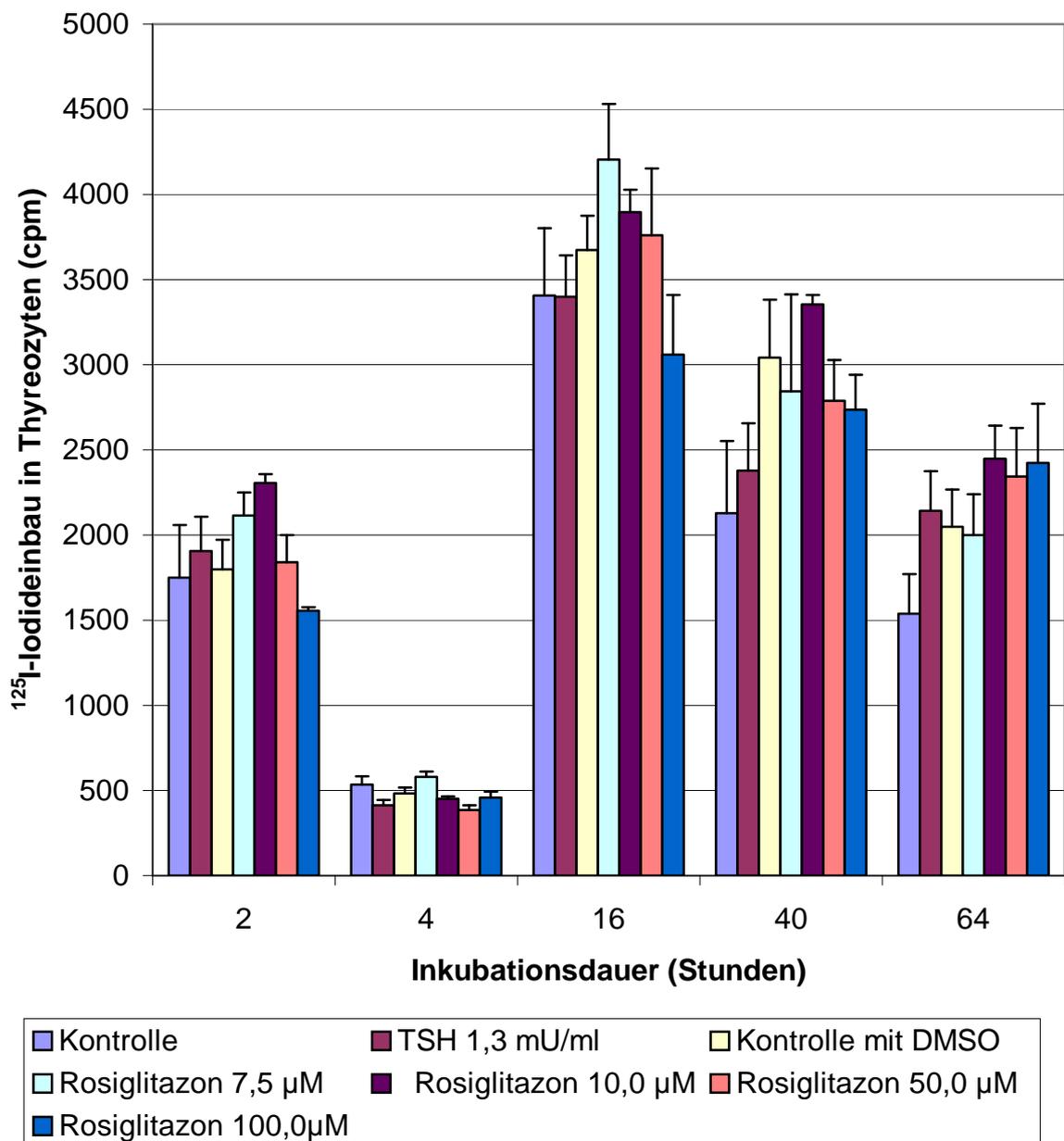


Abb.14: Einfluss von Rosiglitazon auf die Iodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium war Vitamin A-frei. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO oder mit Rosiglitazon (7,5; 10; 50; 100 µM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde die Iodaufnahme nach 2, 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ^{125}I -Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.8 im Anhang).

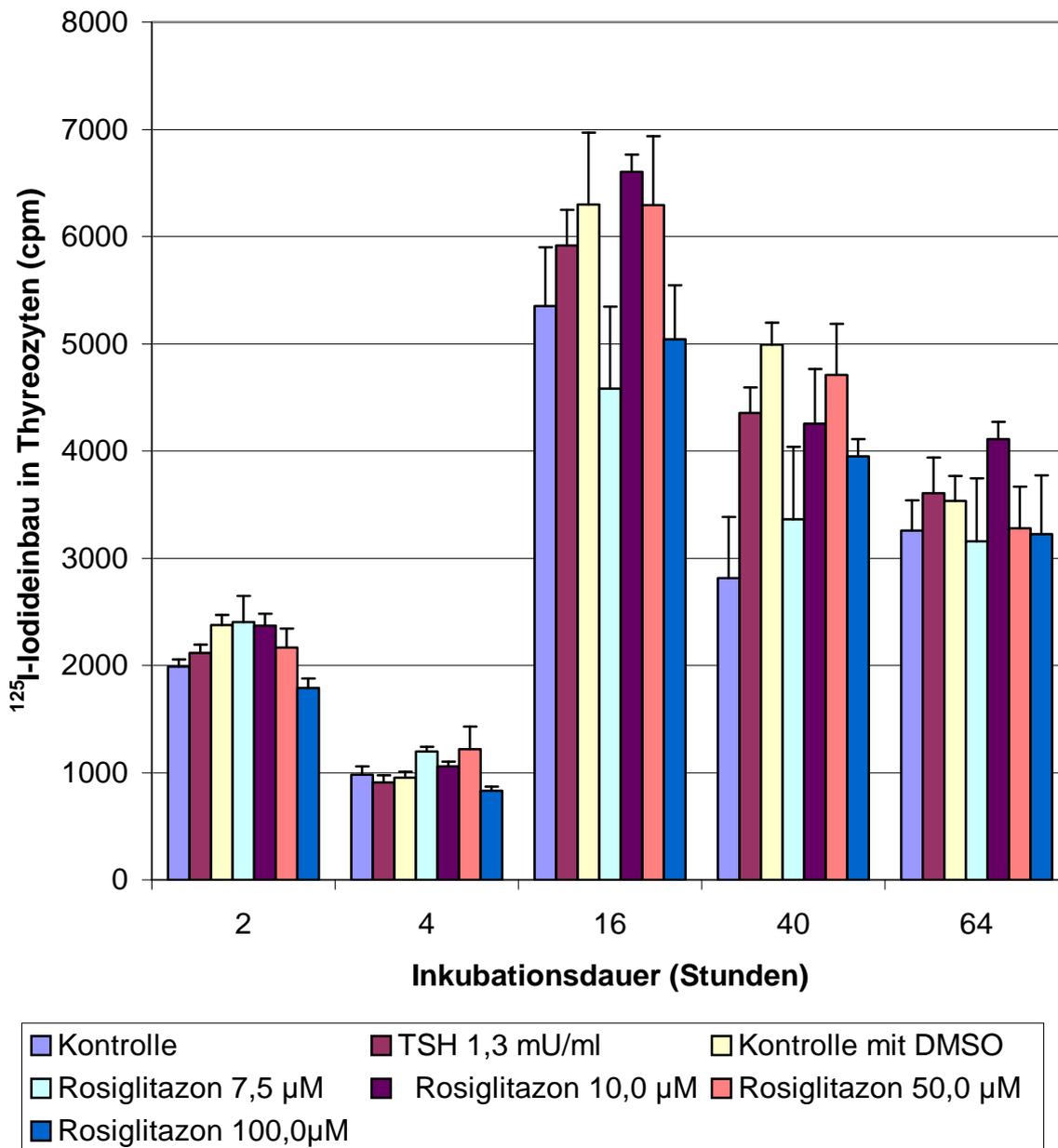


Abb.15: Einfluss von Rosiglitazon auf die Iodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Vitamin A-Konzentration im Medium 0,6 µM. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO oder mit Rosiglitazon (7,5; 10; 50; 100 µM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde die Iodaufnahme nach 2, 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ¹²⁵I-Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.9 im Anhang).

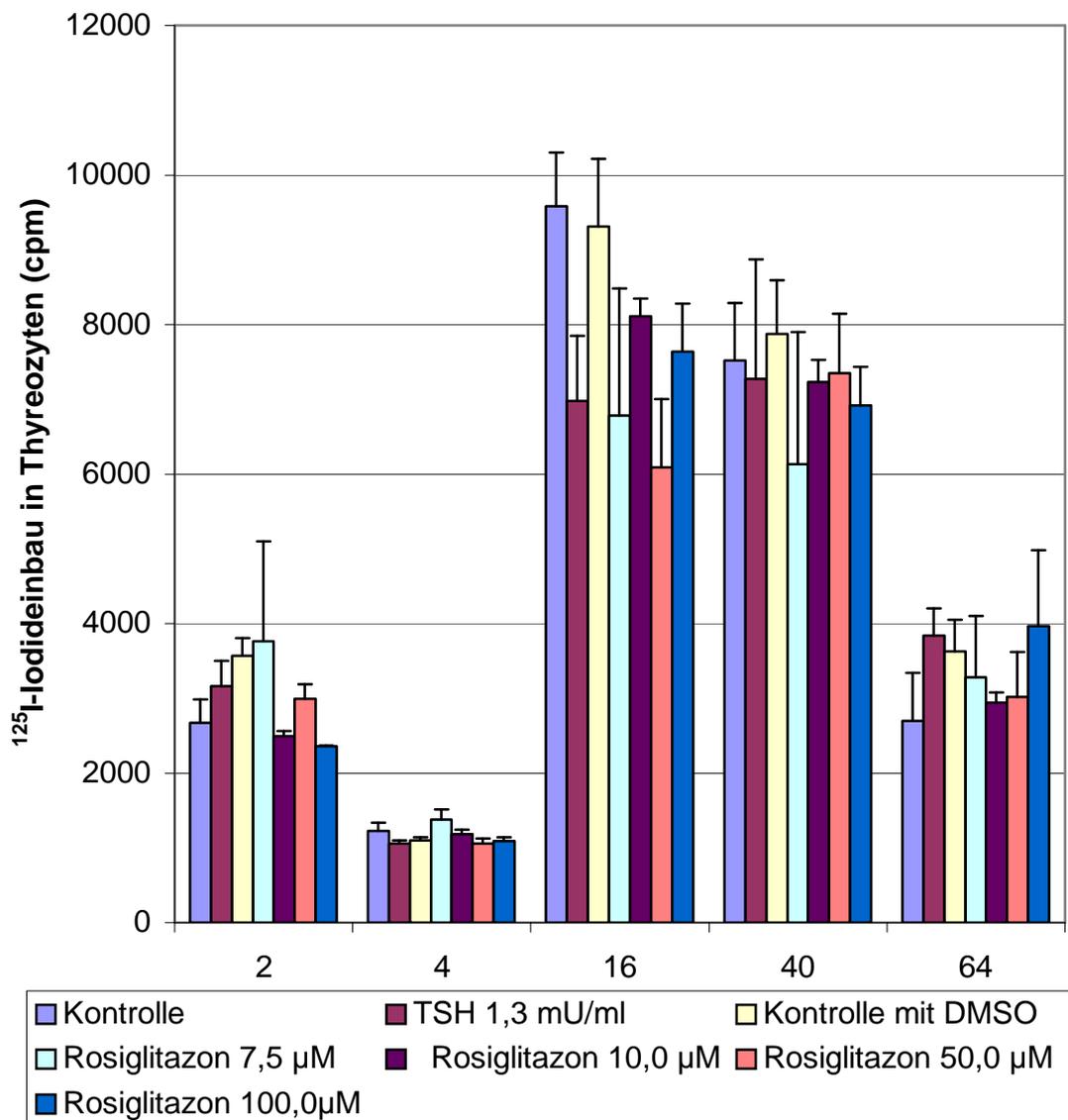


Abb.16: Einfluss von Rosiglitazon auf die Iodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Vitamin A-Konzentration im Medium 1,8 μM . Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO oder mit Rosiglitazon (7,5; 10; 50; 100 μM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde die Iodaufnahme nach 2, 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten / 0,2 ml Medium, ^{125}I -Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (Zahlenwerte in Tab.10 im Anhang).

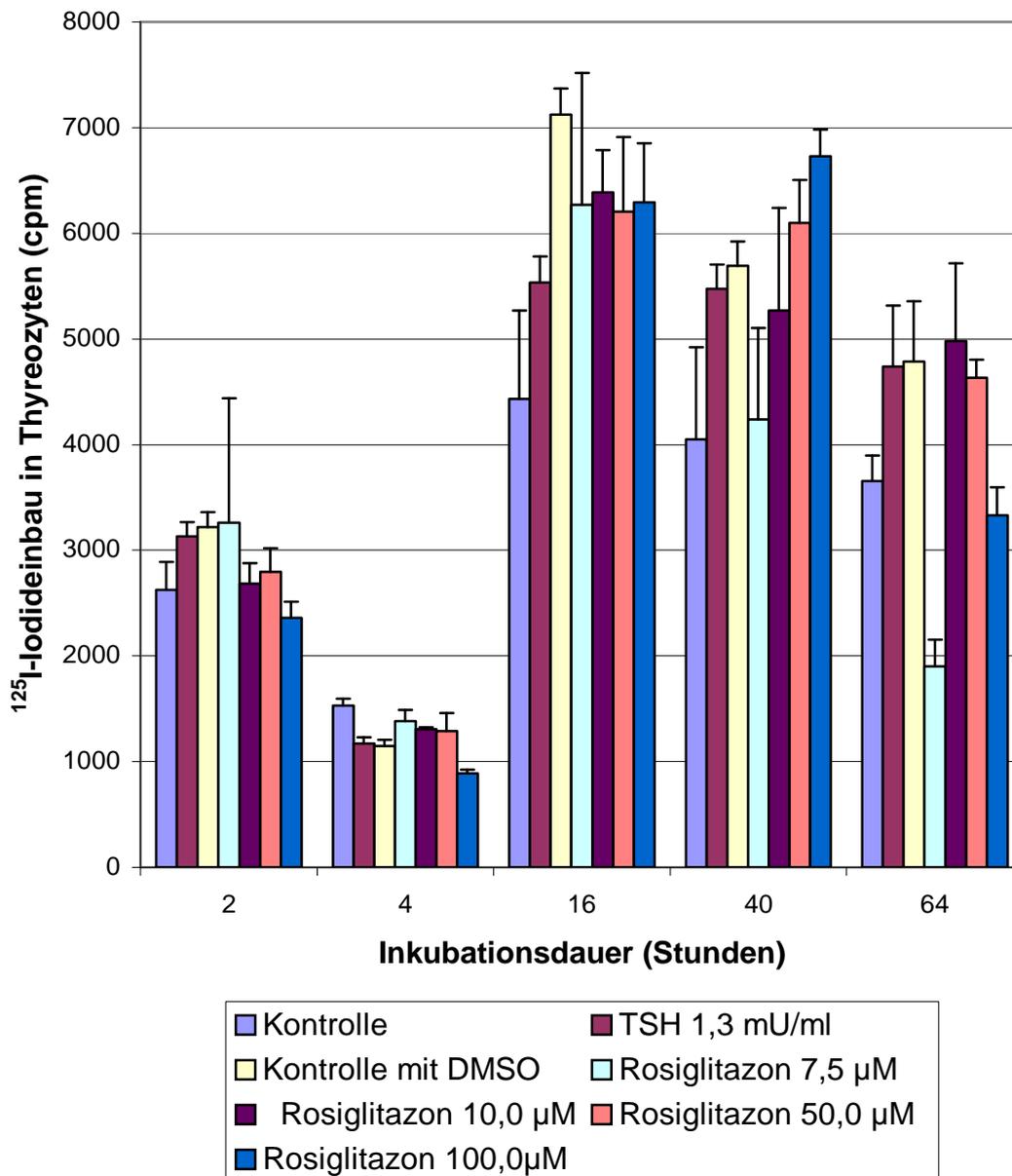


Abb.17: Einfluss von Rosiglitazon auf den Iodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Vitamin A-Konzentration im Medium 3,6 µM. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml), mit DMSO oder mit Rosiglitazon (7,5; 10; 50; 100 µM) beim Aussäen der Zellen. Gemessen wurde die Iodaufnahme nach 2, 4, 16, 40 und 64 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ¹²⁵I-Zugabe: 4kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.11 im Anhang).

3.2.2 ³H-Thymidineeinbau in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Rosiglitazon- und Vitamin A-Konzentrationen

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 7,5; 10 und 50 µM Rosiglitazon oder mit 1,3 mU TSH oder mit 100 µM DMSO stimuliert. Das Medium war wahlweise Vitamin A-frei oder enthielt Vitamin A in den Konzentrationen 0,6 oder 1,8 µM. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die weder mit Rosiglitazon noch mit TSH oder DMSO behandelt wurden.

Die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit TSH, DMSO oder steigenden Rosiglitazonkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 18, 19 und 20 dargestellt. Die diesen 3 Abbildungen zugrunde liegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

Im Medium, welches kein Vitamin A enthielt (Abb. 18), zeigten die Thyreozyten nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden nur unter 7,5 µM Rosiglitazon eine signifikant gesteigerte Thymidinaufnahme, die das 1,7-fache jenes der Kontrollthyreozyten enthielt.

Nach 16 und 40 Stunden erzielten alle Konzentrationen (7,5; 10; 50 µM) von Rosiglitazon signifikante Werte. Den höchsten Effekt (das 4-fache) bewirkte hier Rosiglitazon mit der Konzentration 10 µM nach 16 Stunden.

Nach 64 und nach 88 Stunden hatte keine der verwendeten Substanzen einen signifikanten Einfluss auf die Thymidininkorporation in kultivierte Schweinethyreozyten.

TSH rief zu keinem Messzeitpunkt eine gegenüber der Kontrolle gesteigerte Thymidinaufnahme hervor. DMSO führte jedoch nach 2 und nach 16 Stunden zu einer signifikant verminderten Thymidinaufnahmerate (bis zum 0,5-fachen weniger).

Wie Abbildung 19 zeigt, konnte im Medium mit 0,6 μM Vitamin A zu den Messzeiten 2, 16, 64 und 88 Stunden keine bemerkenswerte Steigerung der Thymidinaufnahme gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden.

Nach 40 Stunden betrug der Stimulationseffekt unter 7,5; 10 und 50 μM Rosiglitazon das 3,2 bis 3,7-fache gegenüber der Kontrolle. Nach 16 Stunden war diese signifikant verminderte Thymidinaufnahme in die Thyreozyten unter Rosiglitazon überraschend.

Enthielt das Medium 1,8 μM Vitamin A, so fand sich nach 16 Stunden Inkubation lediglich unter 5 μM Rosiglitazon eine signifikant gesteigerter Thymidinaufnahme in die Thyreozyten. TSH oder DMSO hatten keine entsprechende Wirkung. Nach 40 Stunden fanden sich unter keiner der eingesetzten Substanzen signifikant gesteigerte Thymidinaufnahmeraten. Nach 64 Stunden bewirkte lediglich Rosiglitazon in der Konzentration 7,5 μM und nach 88 Stunden lediglich in der Konzentration 10 μM eine gesteigerte signifikante Thymidinaufnahme.

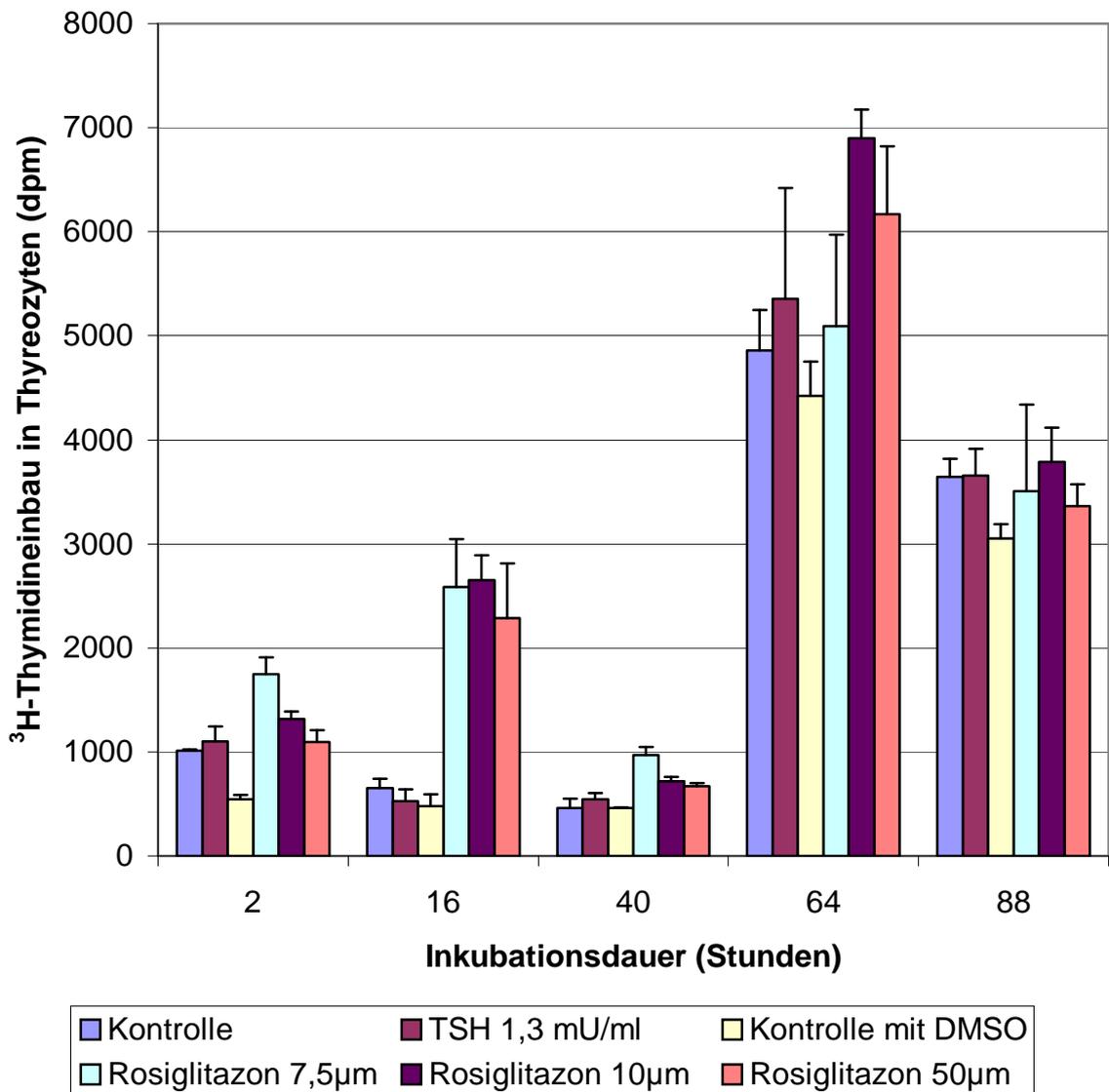


Abb.18: Einfluss von Rosiglitazon auf die Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium war Vitamin A-frei. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml) oder mit DMSO oder mit Rosiglitazon (7,5 ; 10, 50 µM). Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ³H-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.12 im Anhang).

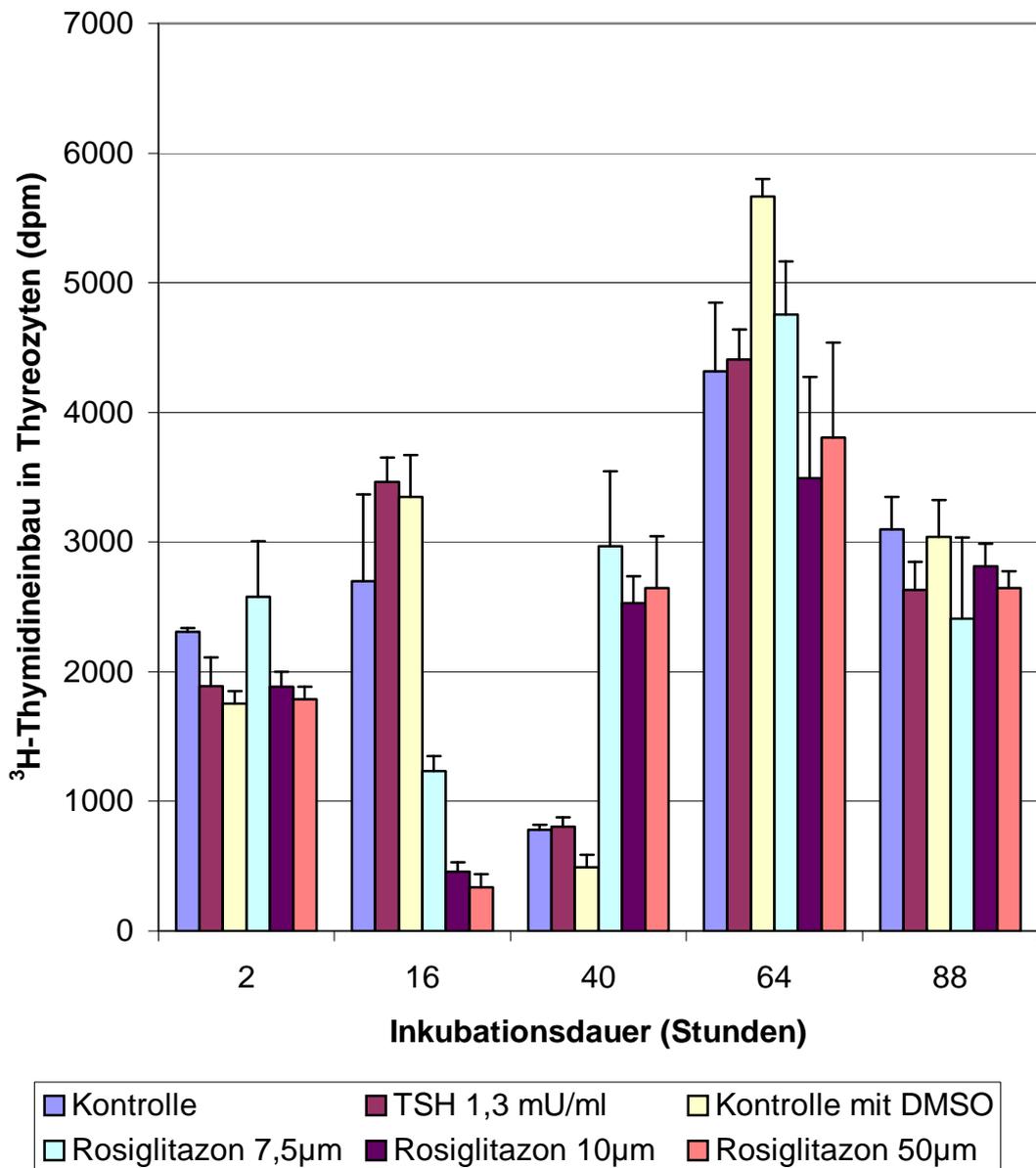


Abb.19: Einfluss von Rosiglitazon auf die Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium enthielt 0,6 μM Vitamin A. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml) oder mit DMSO oder mit Rosiglitazon (7,5 ; 10, 50 μM). Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ³H-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.13 im Anhang).

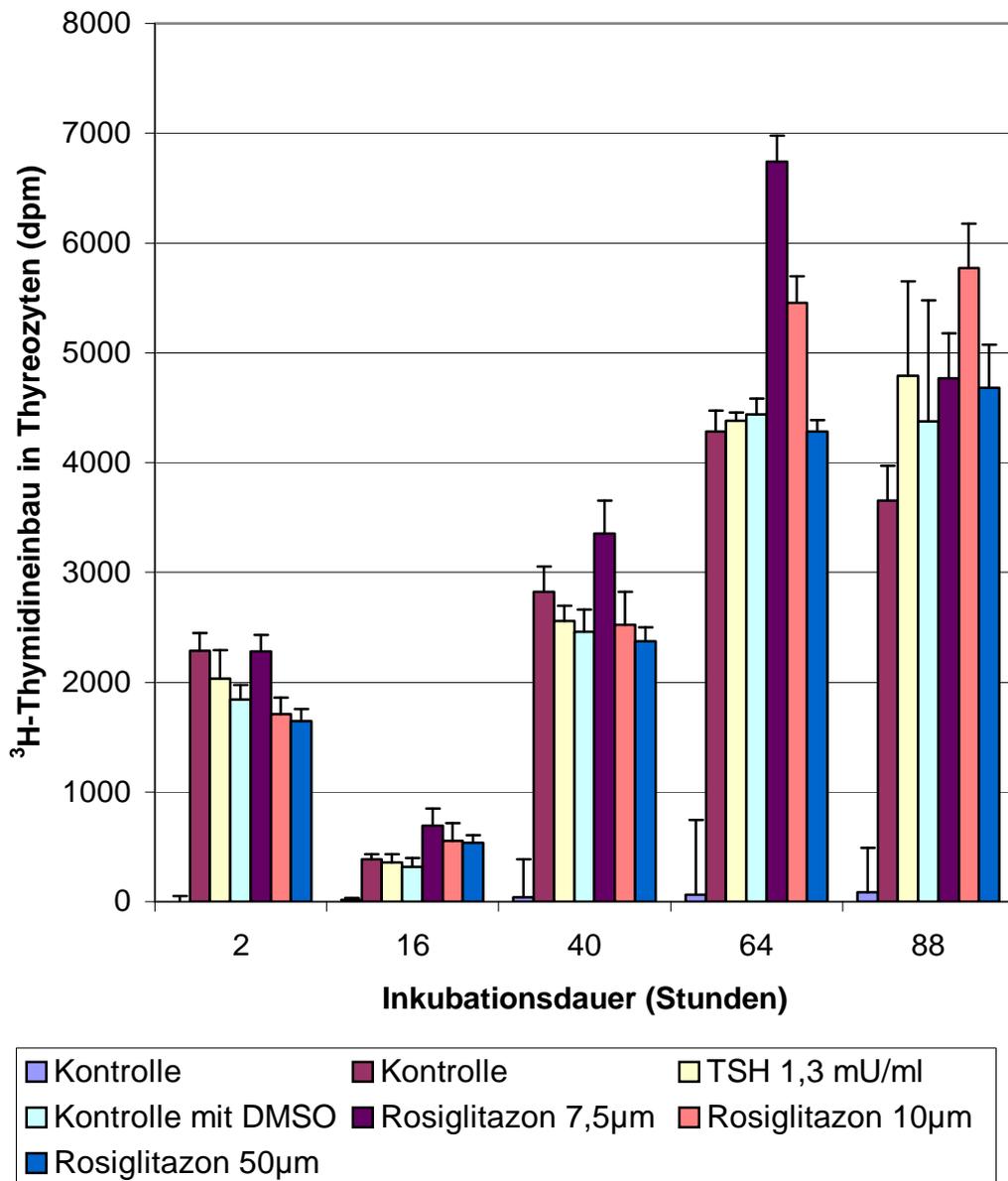


Abb.20: Einfluss von Rosiglitazon auf die Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium enthielt 1,8 µM Vitamin A. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit TSH (1,3 mU/ml) oder mit DMSO oder mit Rosiglitazon (7,5 ; 10, 50 µM). Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ³H-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.14 im Anhang).

3.3 Einfluss von Rosiglitazon auf den Natrium-Iodid-Symporter von Schweinethyreozyten und von malignen humanen Schilddrüsenzellen

3.3.1 Einfluss auf den NIS kultivierter Schweinethyreozyten

Um den Einfluss von Rosiglitazon auf den NIS zu erfassen, wurden kultivierte Schweinethyreozyten mit 100 μM Rosiglitazon behandelt. Das Kulturmedium war entweder Vitamin A-frei oder enthielt 1,8 μM Vitamin A. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die weder mit Rosiglitazon noch mit Vitamin A stimuliert wurden. Als weitere Kontrolle dienten Thyreozyten, denen statt Rosiglitazon, gelöst in DMSO, nur DMSO zugesetzt wurde. Die Inkubation erfolgte über 17 und über 41 Stunden.

Der Natrium-Iodid-Symporter wurde mit Hilfe der Immunenzymtechnik dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse nach 17 Stunden Inkubationszeit ist in Abb. 21 dargestellt.

Von den Thyreozyten, die ohne Vitamin A und mit Rosiglitazon stimuliert wurden, waren 67% der ausgezählten Zellen enzymmarkiert und somit NIS-positiv. Die Schilddrüsenzellen, die als Kontrollgruppe dienten und nicht stimuliert wurden, waren nur zu 50% enzymmarkiert. Unter Zugabe von DMSO sanken die enzymmarkierten Zellen auf 42%.

Wie Abbildung 21 weiter zeigt, konnte bei der Zugabe von 1,8 μM Vitamin A zum Medium keine Erhöhung der dargestellten NIS-Symporter durch Rosiglitazon festgestellt werden. Hier sanken die darstellbaren NIS-Symporter sogar von 67 % auf 50 % ab.

Nach einer Stimulationszeit von 41 Stunden (Abb. 22) stieg die Anzahl der NIS-positiven Zellen in Vitamin A-freiem Medium unter Rosiglitazon gegenüber der Inkubationszeit von nur 17 Stunden nicht weiter an. Auch hier führte die Zugabe von DMSO zu einer Verringerung der NIS-positiven Zellen auf 42%. Unter dem simultanen Einfluss von Vitamin A und Rosiglitazon wurden 46% NIS-positive

Zellen gezählt. Dies waren 24% mehr als bei den Thyreozyten, die der Kontrolle dienten. Die Stimulation mit DMSO ergab 48% NIS-positive Zellen.

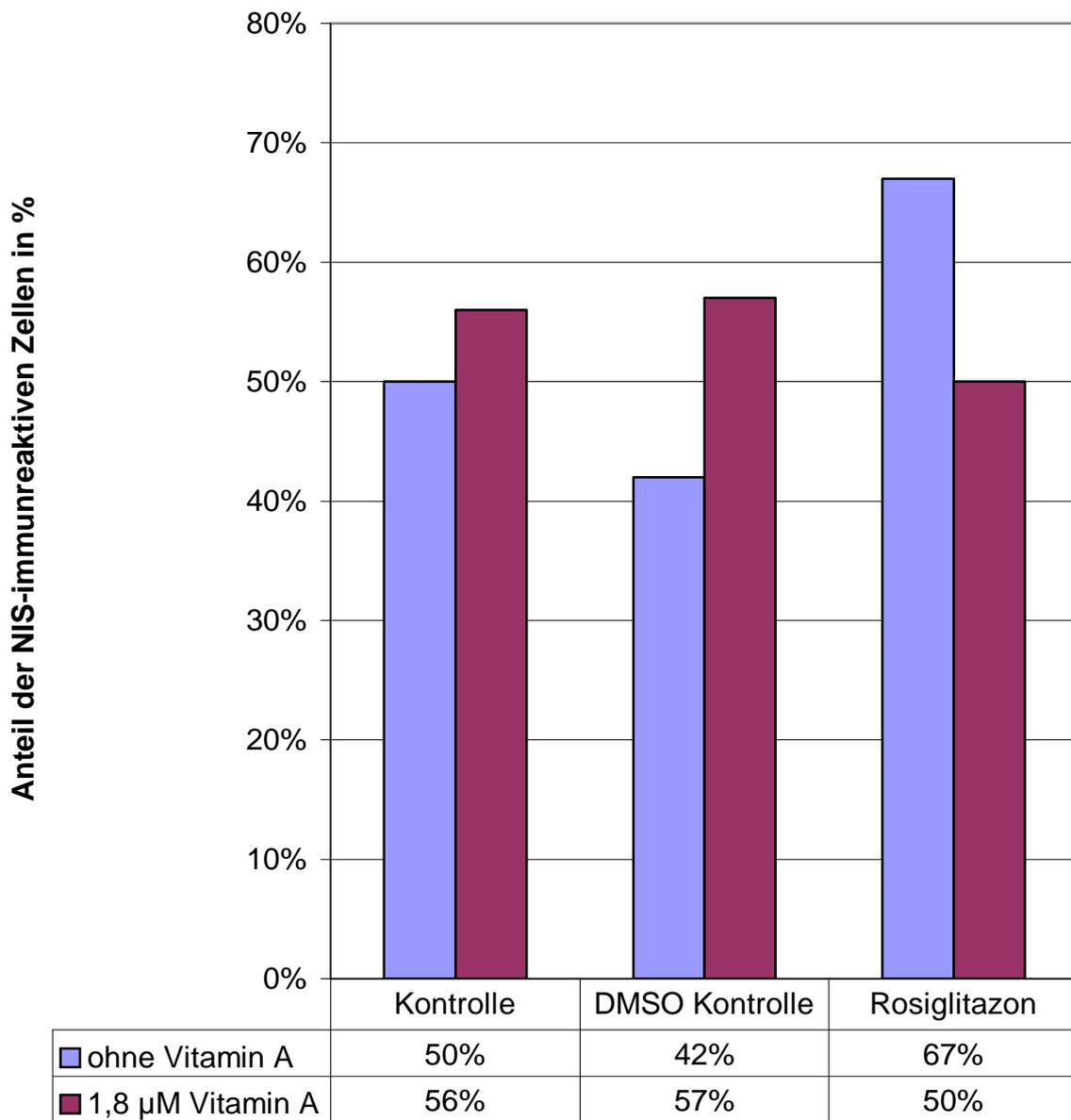


Abb.21: Einfluss von Rosiglitazon (100 µM) ohne und mit 1,8 µM Vitamin A im Medium auf den Natrium-Iodid-Symporter von kultivierten Schweinethyreozyten. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit DMSO und Rosiglitazon (100 µM) beim Aussäen der Zellen. Die Stimulationszeit betrug 17 Stunden. Der Natrium-Iodid-Symporter wurde mit Hilfe der Immunezymtechnik dargestellt.

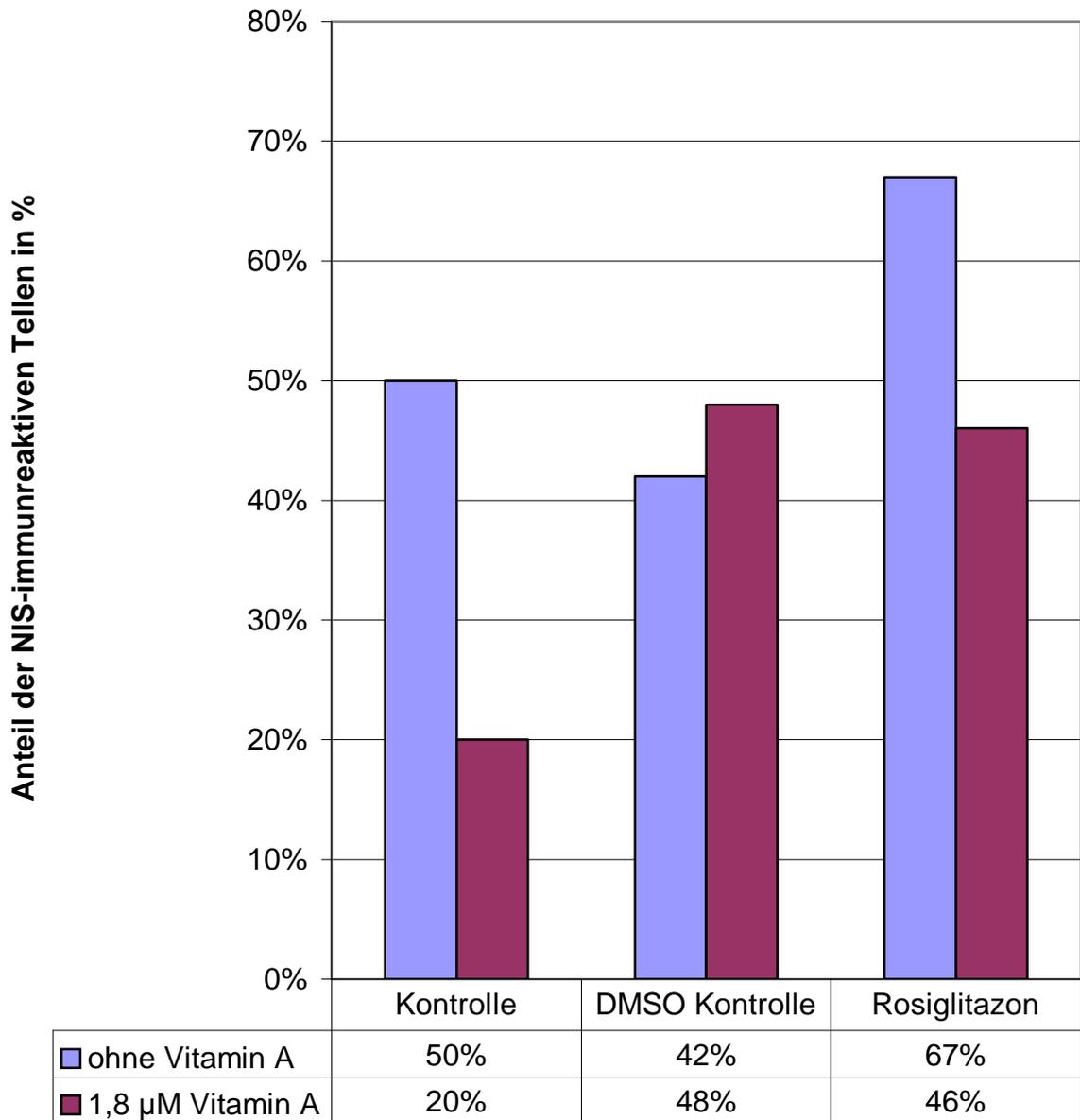


Abb.22: Einfluss von Rosiglitazon (100 µM) ohne und mit 1,8µM Vitamin A auf den Natrium-Iodid-Symporter in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit DMSO und Rosiglitazon (100 µM) beim aussäen der Zellen. Die Stimulationszeit betrug 41 Stunden. Der Natrium-Iodid-Symporter wurde mit Hilfe der Immunezymtechnik dargestellt

3.3.2 Einfluss von Rosiglitazon auf den NIS maligner humaner Thyreozyten (FTC 133, FTC 238)

Maligne humane Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 und FTC 238 wurden mit Rosiglitazon (100 μ M) stimuliert. Rosiglitazon wurde den Kulturen beim Aussäen hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht mit Rosiglitazon stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte über 4 Stunden.

Die Thyreozyten der Zelllinie FTC 238, die mit Rosiglitazon stimuliert wurden, waren zu 59% NIS-positiv. Bei der Zelllinie FTC 133 wurden 51% NIS-positiv Thyreozyten ausgezählt. Unter den Thyreozyten, die nicht stimuliert wurden und als Kontrollgruppe dienten, waren 58% der Thyreozyten rot angefärbt und somit NIS-positiv. Graphische Darstellung in Abb. 23.

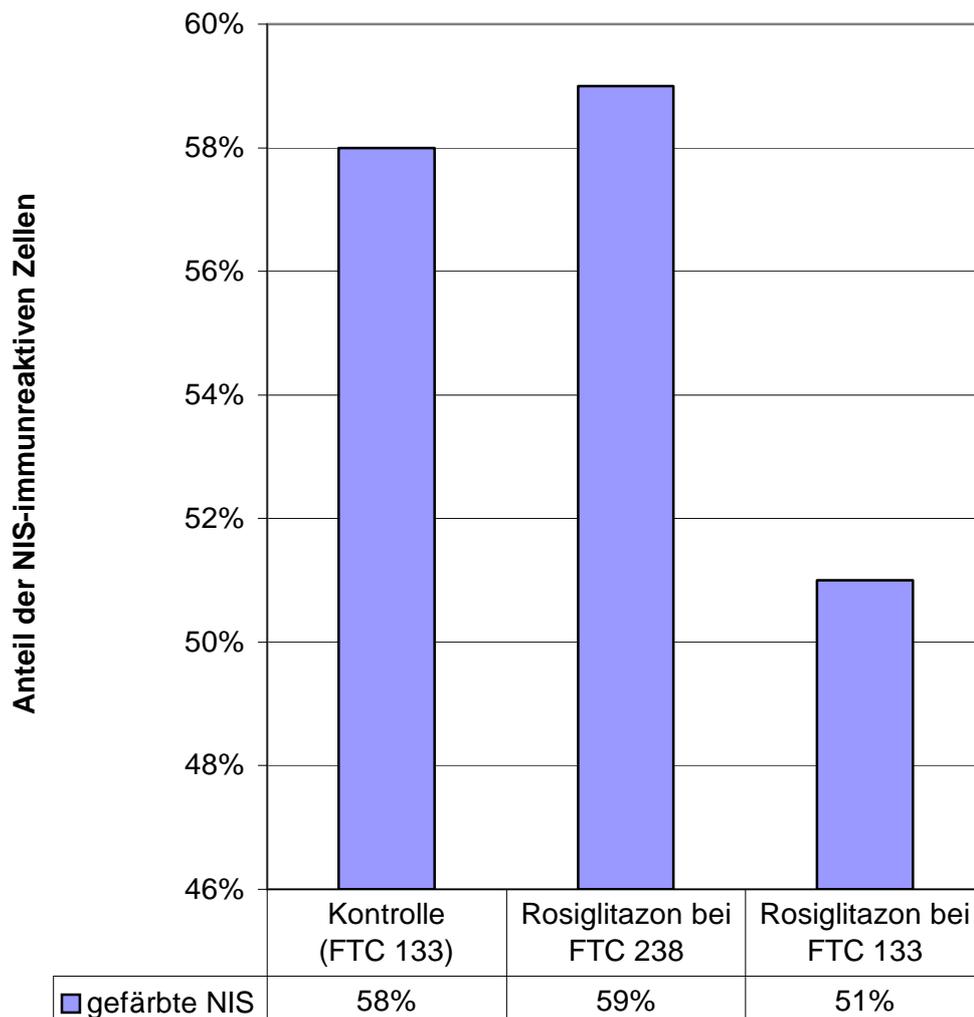


Abb.23: Einfluss von Rosiglitazon (100 μ M) ohne Vitamin A-Zusatz auf den Natrium-Iodid-Symporter von malignen humanen Thyreozyten der Zelllinien FTC 238 und FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenkulturen mit Rosiglitazon (100 μ M) beim Aussäen der Zellen. Die Stimulationszeit betrug 4 Stunden. Der Natrium-Iodid-Symporter wurde mit Hilfe der Immunenzymtechnik dargestellt.

3.4 Bestimmung des Glucoseeinbaus in Thyreozyten unter Einfluss von Rosiglitazon

Humanen malignen Schilddrüsenzellen der Zelllinie FTC 133, die in 48well-Mikrotiterplatten kultiviert wurden, wurde Rosiglitazon jeweils in den Endkonzentrationen 0; 1; 2,5; 5 und 10 μM verabreicht. Die Bestimmungen wurden in Vitamin A-freiem Medium vorgenommen. Zusätzlich wurde gleichzeitig entweder 2-Desoxy-D-[^3H]Glucose oder ^{125}I -Iodid oder ^3H -Thymidin hinzugegeben und die Zellen nach 1/2, 1 und 2 Stunden geerntet. Die Ergebnisse der jeweiligen Inkorporation sind in Abb. 24, 25 und 26 dargestellt. Die diesen 3 Abbildungen zugrunde liegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Thyreozyten, die ebenfalls mit Rosiglitazon in oben genannten Konzentrationen behandelt wurden, zunächst über 48 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Erst danach wurden sie mit 2-Desoxy-D-[^3H]Glucose oder ^{125}I -Iodid oder ^3H -Thymidin stimuliert. Auch hier erfolgte die Ernte nach 1/2, 1 und 2 Stunden. Die Ergebnisse sind in Abb. 27, 28 und 29 dargestellt.

Der Glucoseeinbau zeigte in diesen beiden Versuchsansätzen keine signifikant gesteigerten Einbauwerte von 2-Desoxy-D-[^3H]Glucose gegenüber der Kontrolle (= nicht mit Rosiglitazon behandelte Zellen). Bei einem Teil der Zellen fand sich sogar ein signifikant verminderter Einbau. Rosiglitazon hat offensichtlich keinen steigernden Effekt auf die Glucoseaufnahme in die Thyreozyten ausgeübt.

Rosiglitazon bewirkte in einem Parallelversuch auch keine signifikant gesteigerte Iodidaufnahme gegenüber der Kontrolle. Zwischen der Versuchsreihe mit sofortiger Radioiodidzugabe und der Radioiodidzugabe erst 48 Stunden nach Inkubation bestand kein signifikanter Unterschied.

Betrachtet man nun die Thymidininkorporation, so zeigte sich, daß nach simultaner Zugabe von Rosiglitazon und ³H-Thymidin zur Thyreozytenkultur Rosiglitazon nach ½ und 1 Stunde Inkubationsdauer bezogen auf die Kontrolle eine verminderte Thymidinaufnahme verursachte, die bis auf das 0,4-fache der Kontrolle abnahm.

Wurden die Thyreozyten 48 Stunden mit Rosiglitazon vorinkubiert, so kam es 1 und 2 Stunden nach ³H-Thymidinzugabe zu einer deutlich erhöhten Thymidinaufnahme.

Der gesamte Versuch wurde einmal wiederholt und die Ergebnisse haben sich darin bestätigt.

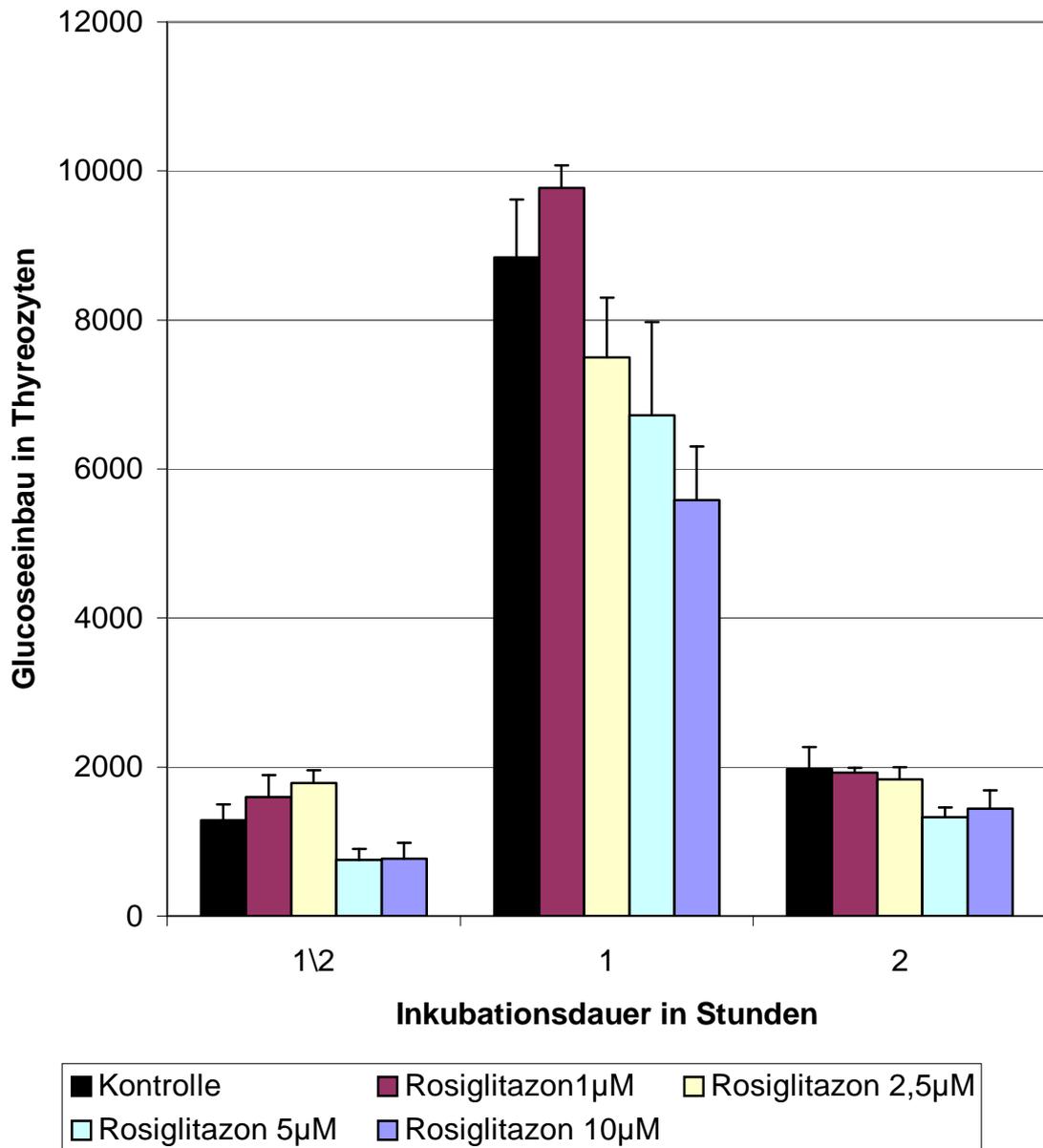


Abb.24: Einfluss von Rosiglitazon auf den Glucoseeinbau (2-Deoxy-D-[1-³H]Glucose) in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenzellkulturen mit Rosiglitazon (1; 2,5; 5 und 10 µM) beim Aussäen der Thyreozyten. Gemessen wurde der Glucoseeinbau nach 1/2, 1 und 2 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, 2-Desoxy-D-[1-³H]Glucose-Zugabe: 14,4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 15 im Anhang).

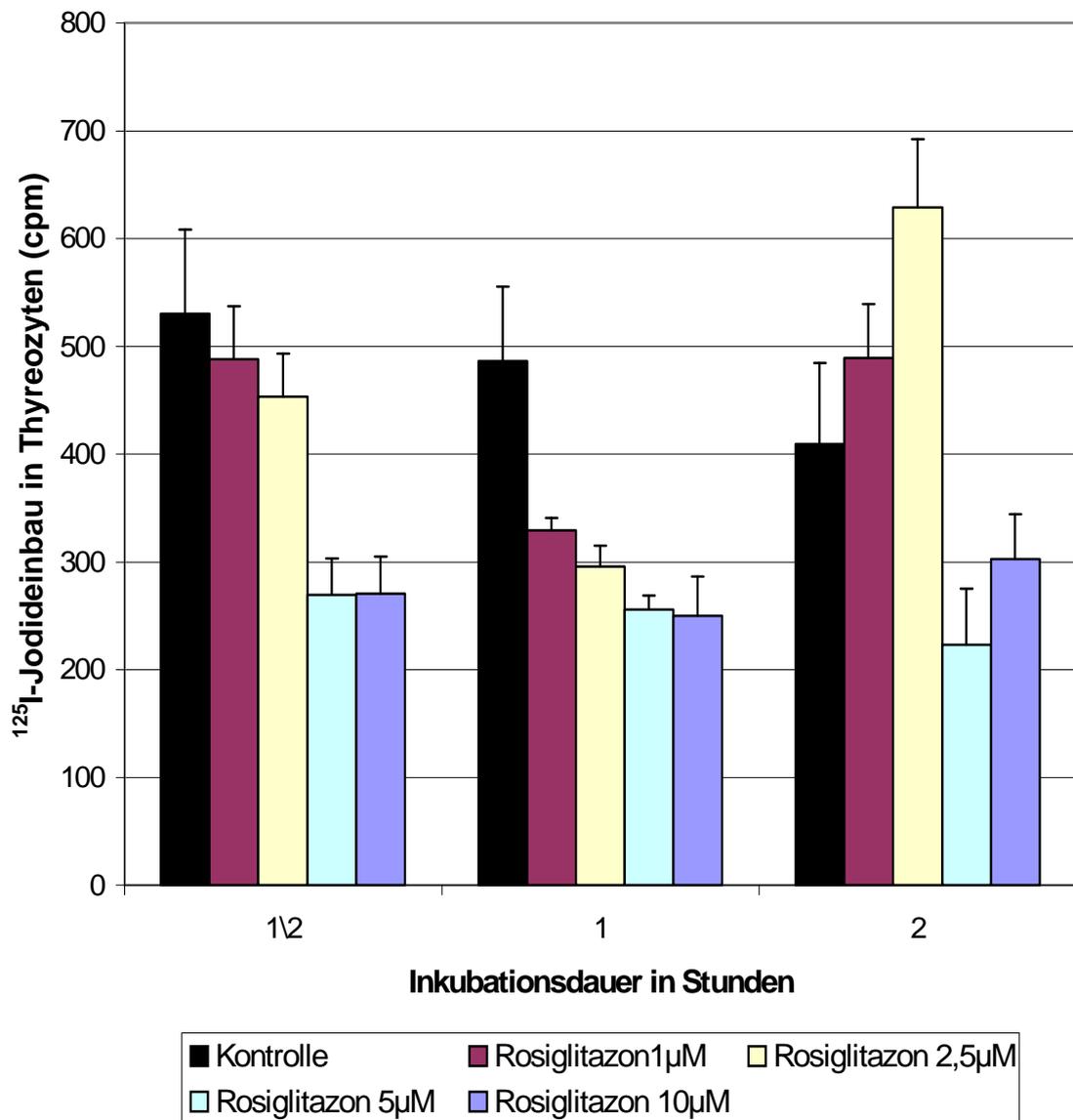


Abb.25: Einfluss von Rosiglitazon auf den Iodaufnahme in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenzellkulturen mit Rosiglitazon (1; 2,5; 5 und 10 μM) beim Aussäen der Thyreozyten. Gemessen wurde der Glucoseeinbau nach 1/2, 1 und 2 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ¹²⁵I-Iodid-Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.16 im Anhang).

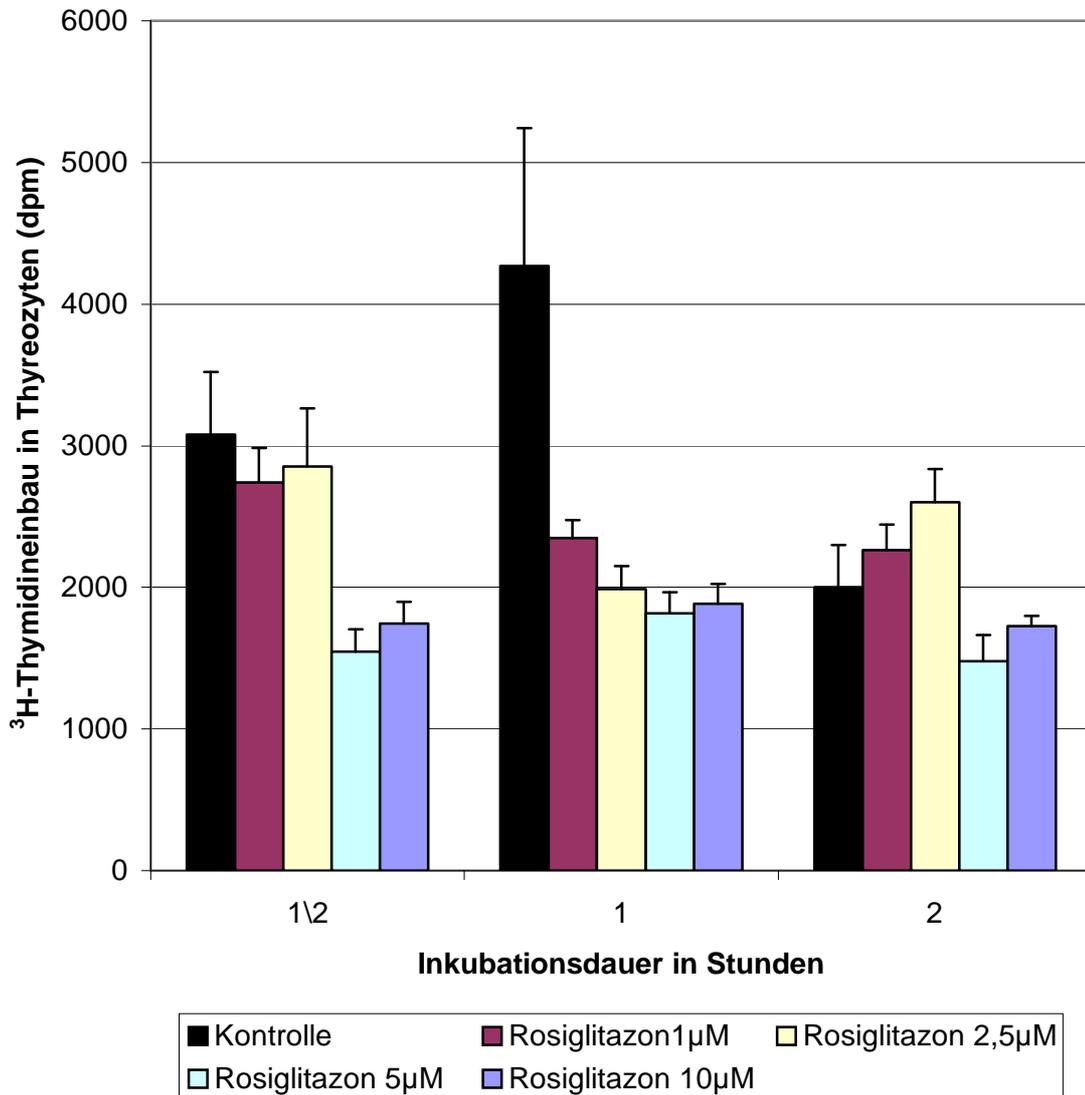


Abb.26 Einfluss von Rosiglitazon auf den ^3H -Thymidineinbau in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenzellkulturen mit Rosiglitazon (1; 2,5; 5 und 10 μM) beim Aussäen der Thyreozyten. Gemessen wurde der Glucoseeinbau nach 1/2, 1 und 2 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ^3H -Thymidin-Zugabe: 11,5 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 17 im Anhang).

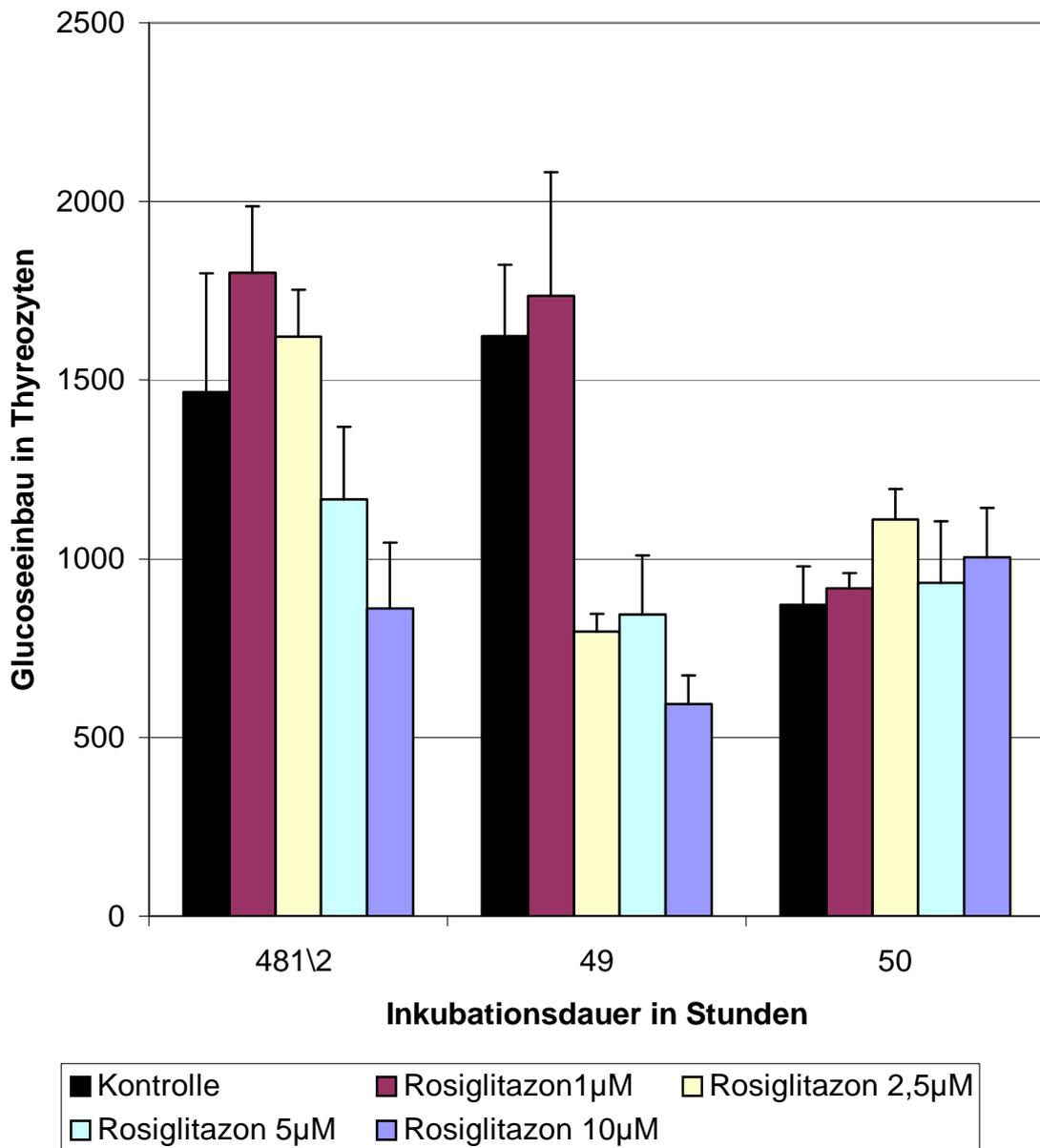


Abb.27: Einfluss von Rosiglitazon auf den Glucoseeinbau in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenzellkulturen mit Rosiglitazon (1; 2,5; 5 und 10 µM) 48 Stunden nach Aussaat der Thyreozyten. Gemessen wurde der Glucoseeinbau nach 1/2, 1 und 2 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, 2-Desoxy-D-[1-³H]Glucose-Zugabe: 14,4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 18 im Anhang).

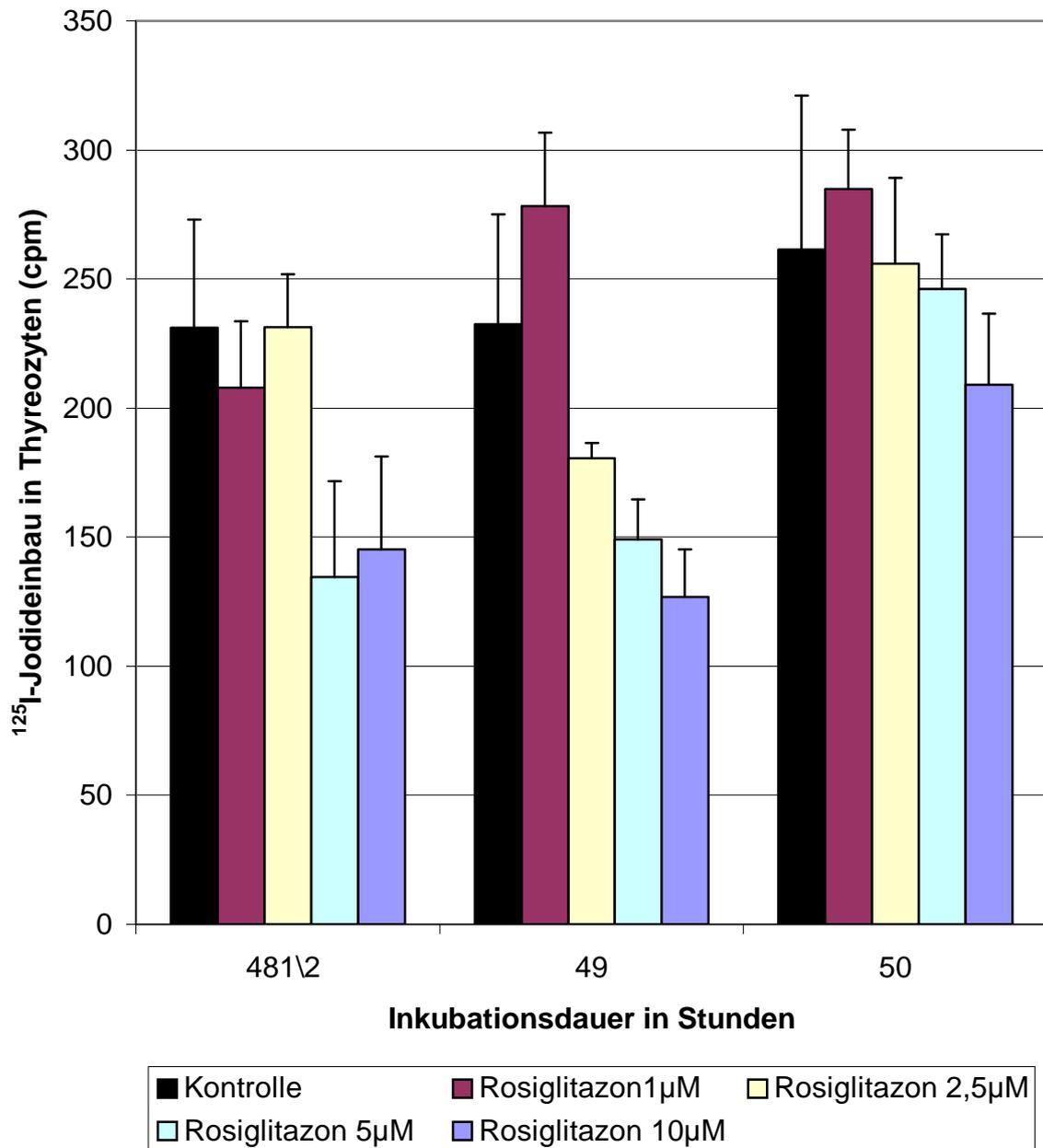


Abb.28: Einfluss von Rosiglitazon auf die Iodaufnahme in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenzellkulturen mit Rosiglitazon (1; 2,5; 5 und 10 μM) 48 Stunden nach Aussaat der Thyreozyten. Gemessen wurde der Glucoseeinbau nach 1/2, 1 und 2 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml Medium, ¹²⁵I-Iodid-Zugabe: 14,4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 19 im Anhang).

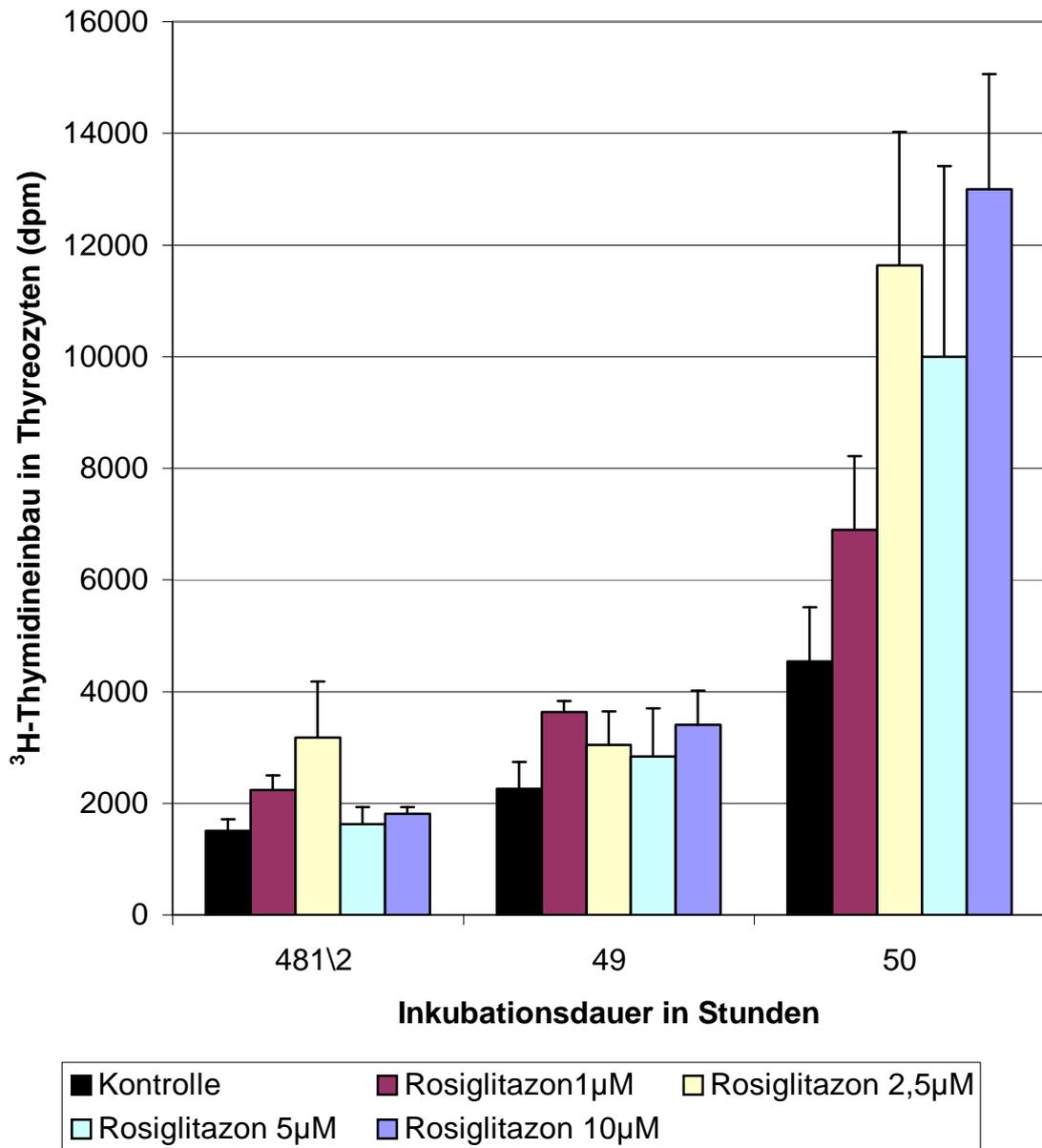


Abb.29: Einfluss von Rosiglitazon auf den ^3H -Thymidineinbau in humane maligne Thyreozyten der Zelllinie FTC 133. Stimulation der Schilddrüsenzellkulturen mit Rosiglitazon (1; 2,5; 5 und 10 μM) 48 Stunden nach Aussaat der Thyreozyten. Gemessen wurde der Glucoseeinbau nach 1/2, 1 und 2 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130.000 Thyreozyten /0,2 ml ^3H -Thymidin-Zugabe: 4 kBq pro Kulturloch (zugehörige Zahlenwerte in Tab.20 im Anhang).

4 Diskussion

Rosiglitazon zählt wie Troglitazon zu den sogenannten Insulin-Sensitizern. Troglitazon und Rosiglitazon greifen aber nicht nur in den Glucose-Stoffwechsel ein, sondern können auch zu Zellredifferenzierungen in entarteten Geweben führen und spielen so neuerdings in der Tumorthherapie eine bedeutende Rolle (Fujiwara et al. 2000). Um die Wirkung von Rosiglitazon auf den Stoffwechsel von maligne entarteten Schilddrüsenzellen zu untersuchen, wurden karzinogene humane Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 verwendet. Die ursprünglichen Zellen dieser Zelllinien wurden einem 42 Jahre alten männlichen Patienten mit einem metastasierenden follikulären Schilddrüsenkarzinom (FTC) entnommen. Die hier verwendete Zelllinie FTC 133 stammt aus dem Primärtumor, wohingegen die Zelllinie FTC 238 aus Fernmetastasen entnommen wurde (Havekes et al. 2000). Die Wirkung von Rosiglitazon auf diese humanen transformierten Zelllinien wurde mit nicht-transformierten Thyreozyten verglichen. Da keine unvorbehandelten humanen Thyreozyten zur Verfügung standen, wurde auf Schweinethyreozyten zurückgegriffen. Schweinethyreozyten lassen sich nur in Primärkultur halten. Ein Nachteil der Primärkultur besteht jedoch darin, daß immer wieder neue Zellkulturen angelegt werden müssen. Das für diese Primärkulturen verwendete Medium NCTC 135 ermöglicht eine Reaggregation der Thyreozyten zu Follikeln, wenn diese innerhalb der ersten 24 Stunden mit TSH versehen werden.

Transformierte Thyreozyten haben die Fähigkeit zur Radioiodaufnahme meistens weitgehend verloren, weil der hierfür erforderliche Natrium-Iodid-Symporter (NIS) ausfällt. Bei 30-40% aller Schilddrüsenkarzinome findet sich keine oder nur eine niedrige NIS-Expression (Köhrle et al. 1998). Das abnehmende NIS-Protein an der basalen Thyreozytenmembran wird somit zur Ursache für die verminderte Iodaufnahme (Zarnegar et al. 2002). Karzinogene Thyreozyten sind auch häufig gegen TSH resistent oder reagieren relativ unsensibel auf seine Bindung. Diese Tatsache liegt nicht, wie man vermuten

könnte, an einer strukturellen Veränderung des TSH-Rezeptors, an dessen Quantitätsverlust oder an der verminderten Affinität des Rezeptors, sondern an einer gestörten Interaktion zwischen dem TSH-Rezeptor und dem G-Protein. Demzufolge wird der Weg über ein erhöhtes Thyreotropin die Iodid-Inkorporation für eine Radioiodtherapie zu forcieren häufig irrelevant (Namba et al. 1993).

Die Fähigkeit der Thyreozyten zur Aufnahme von Iod bildet die Voraussetzung für das Durchführen einer Radioiodidtherapie (Schmutzler 2001, Haldemann 1999, Smit 2001). Retinoide können in vivo und in vitro durch eine Redifferenzierung der Zelle diese Fähigkeit wieder herstellen (Schmutzler et al. 2000). Wie mittels Retinsäure gezeigt werden konnte, stimulierte diese die Expression von NIS mRNA in den Schilddrüsenzelllinien FTC 133 und FTC 238 (Schmutzler et al. 1997). Der Nachweis der verstärkten Radioiodaufnahme in diese Zellen ließ nun den Schluss zu, daß auch das NIS-Protein unter dem Einfluss der Retinsäure in vitro wieder hergestellt worden ist. An einer Studie mit 20 Patienten, die unter einem Schilddrüsenkarzinom leiden, konnte auch in vivo festgestellt werden, daß Retinsäure bei einem Teil der Patienten einen positiven Effekt auf die Redifferenzierung des NIS besitzt. Diese reagierten auf die Retinsäurebehandlung mit einer verstärkten Radioiodaufnahme. Nur bei 6 Patienten (32%) sank der Tumormarker Thyreoglobulin ab. Bei einem Großteil der Patienten (63%) nahm das Thyreoglobulin weiterhin zu. Dies bedeutet, daß Retinsäure keinen Effekt auf das Tumorstadium gezeigt hat. Eine Reduktion der Tumorgroße konnte bislang unter der Therapie mit Retinsäure nicht bestätigt werden (del Senno et al. 1993, Grüning et al. 2003, Simon et al. 2002). Als positiv einzustufen ist jedoch, daß zumindest bei 50% der Patienten die Fähigkeit zur Iodidaufnahme wieder hergestellt wurde (Simon et al. 1998, Schmutzler et al. 2002).

Die Wirkung von Vitamin A (Retinol) ist in unseren Untersuchungen zum Vergleich mit dem Effekt von Rosiglitazon herangezogen worden. Rosiglitazon entfaltet seine Wirkung über das Dimer aus den Kernrezeptoren PPAR γ und

RXR. RXR ist der Kernrezeptor für die Retinoide. All-trans Retinol kann erst nach Isomerisierung und Oxidation den Rezeptor RXR stimulieren. Damit ergab sich auch die Frage, ob Rosiglitazon plus Retinol sich in ihrer Wirkung verstärken können.

Zur Kontrolle der spezifischen Leistung der Thyreozyten wurde der Einbau von ^{125}I -Iod gemessen.

Der Einbau von Thymidin wurde untersucht, weil die Thymidinaufnahme eine Voraussetzung für das Wachstum der Zellen ist. Die globale ^3H -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten beweist allerdings noch keinen Einbau des Thymidins in die DNS und ist somit als Beweis für ein Wachstum nicht spezifisch genug, denn das Thymidin könnte auch im Zytosol verweilen. Vorausgegangene Untersuchungen an Thyreozytenkulturen zeigten aber, daß die Thymidinaufnahme in nicht-transformierten unbehandelten Thyreozyten mit dem Einbau in die DNA parallel verläuft (Wahl 1991) und somit bei diesen Zellen als Wachstumsparameter gewertet werden darf.

4.1 Einfluss von Rosiglitazon auf den Iodid- und Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten ohne und mit gleichzeitiger Stimulation von Vitamin A

Rosiglitazon in der Konzentration von 10 μM steigerte die Iodaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 während der betrachteten Inkubationszeit signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Dies galt auch für die simultane Stimulation der Thyreozyten mit Rosiglitazon plus Retinol und zwar für alle eingesetzten Retinolkonzentrationen.

Die höchsten signifikanten Einbauraten an Iodid fanden sich bei der Kombinationsbehandlung schon nach sehr kurzen Inkubationszeiten von 2, 4 und 16 Stunden. Auch unter einer simultanen Stimulation mit 0,6 μM Vitamin A wurden die höchsten Einbauraten schon nach einer Stimulationszeit von 4 und 16 Stunden erreicht. Die Einbauraten unter Retinol ließen sich unter den höheren Dosen noch weiter steigern. Die höchsten erzielten Einbauraten lagen beim 3,2-fachen der Kontrolle.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß vor allem 10 µM Rosiglitazon zu einer erhöhten Iodaufnahme führte, die durch Zugabe von Vitamin A noch gefördert wurde.

Unter Vitamin A versteht man im engeren Sinne das all-trans-Retinol (Hildebrandt et al. 1994). Es handelt sich hierbei um einen aus fünf Isoprenresten aufgebauten Alkohol, in dem die beiden endständigen Isoprenreste zu einem β -Iononring kondensiert sind. Retinal (Vitamin A-Aldehyd) und Retinsäure (Säure des Vitamin A) sind Derivate von Vitamin A und werden somit als Retinoide bezeichnet. Sie besitzen jedoch nicht das gesamte biologische und pharmakologische Wirkungsspektrum von Vitamin A. Retinol kann reversibel in Retinal und nachfolgend in Retinsäure umgewandelt werden. Bei Retinsäure hingegen ist die Reduktion zu Retinal und Retinol nicht möglich.

Die Wirkung und der Einfluss von Retinoiden auf verschiedene Prozesse in der Schilddrüse wurde mehrfach untersucht. Hoch dosiert zeigt Vitamin A antithyreoidale Wirkungen (Morley et al. 1980). Darunter ist zu verstehen, daß Vitamin A die gesamte zirkulierende Schilddrüsenhormon-Konzentration reduziert. Des Weiteren reduziert Vitamin A die Schilddrüsengröße und verstärkt die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Schilddrüse (Morley et al. 1980). Vitamin A-Derivate induzieren die Redifferenzierung von Zellen akuter myeloischer Leukämien, Neoplastomen, Teratokarzinomen, Melanomen und Rhabdomyosarkomen (Coelho et al. 2004). Sie werden therapeutisch auch bei der Promyelozytenleukämie und anderer maligner Erkrankungen eingesetzt (Smith et al. 1992). Auch die Wiederherstellung und Steigerung des Iodaufnahmes in unsere entarteten Thyreozyten durch Retinol stellt eine Redifferenzierung der Zellen dar. Auf molekularer Ebene läuft dieser Effekt über die Retinoat-Rezeptoren RXR oder RAR ab. Im aktiven Zustand bilden diese Rezeptoren Homo- und Heterodimere und regeln somit über eine Genexpression vorwiegend das Wachstum und die Differenzierung (Jetten et al. 1979, Permick et al. 1994). Da der Kernrezeptor PPAR γ für Rosiglitazon ein Heterodimer mit

dem RXR-Rezeptor bildet, wäre der beobachtete additive Effekt beider Substanzen auf die Radioiodaufnahme plausibel erklärbar.

Ethanol kann die Iodaufnahme in Thyreozyten dosisabhängig in Abwesenheit von TSH stimulieren und bei gleichzeitiger TSH-Stimulation zusätzlich steigern (Nasu et al. 1993). Die ähnliche Wirkung von Ethanol zu Thyreotropin beruht höchstwahrscheinlich auf der Aktivierung des cAMP-Systems und seiner Wirkung auf die Aktivität der Na-K-ATPase des Natrium-Iodid-Symporters (Nasu et al. 1993). Zusammen mit dem Natrium wird dann auch Iodid in die Zelle aufgenommen. Retinol hat mit Ethanol eine alkoholische OH-Gruppe gemeinsam. Unter Retinol könnte man sich somit einen ähnlichen Wirkmechanismus wie bei Ethanol vorstellen, der die beobachtete Steigerung der Iodidaufnahme erklären kann. Bei Retinol kommt allerdings noch hinzu, daß es in der Zelle in Retinsäure umgewandelt werden kann. Retinsäure wird vielfach als die eigentlich wirksame Substanz des Retinols angesehen.

Bei der Thymidinaufnahme in die humanen karzinogenen Thyreozyten, waren von Rosiglitazon vor allem die Konzentrationen 1; 2,5 und 10 μM interessant, da sich bei diesen drei Konzentrationen die Thymidinaufnahmeraten meistens signifikant von jenen der Kontrolle unterschieden.

Wurde den Kulturen zusätzlich zu Rosiglitazon Vitamin A beigefügt, so zeigte sich mit der Erhöhung der Vitamin A-Konzentration im Medium eine Steigerung der Thymidinaufnahme in die Zellen. Rosiglitazon plus Vitamin A zeigten also auch hier einen additiven Effekt. Ohne Vitamin A betrug die höchste Thymidin-Einbaurrate unter 2,5 μM Rosiglitazon das 1,7-fache der Kontrolle und wurde erst nach mehr als 16 Stunden Inkubation erreicht. Durch eine Vitamin A-Zugabe von 0,6 μM erhöhte sich die Thymidinaufnahme auf das 1,8-fache. Betrug die Zugabe an Vitamin A 1,8 μM bei simultaner Stimulation mit Rosiglitazon, so kam es zu einer signifikanten Steigerung der Thymidinaufnahme um das 2,8-fache. Eine Zytostase ist also unwahrscheinlich. Bei einer weiteren Steigerung der Vitamin A-Konzentration auf 3,6 μM nahm der Einbau dagegen wieder ab. Die Thymidin-Inkorporation in die Thyreozyten

verläuft während der Inkubation entsprechend dem Zellzyklus phasenförmig, wobei die Phasen in Abhängigkeit von den Stimulanzen und deren Konzentration in der Zeitachse gegeneinander verschoben sein können.

Die bei der Thymidininkorporation erzielten signifikant zur Kontrolle verschiedenen Einbauraten können auf ein gesteigertes Zellwachstum hinweisen, müssen es aber nicht. Von Troglitazon, einem Verwandten Insulinsensitizer, ist jedenfalls bekannt, daß es die Thymidininkorporation in kultivierte Endothelzellen erhöht (Min et al. 2002).

Rosiglitazon stimulierte somit gleichzeitig die Iodaufnahme in die entarteten Thyreozyten als auch deren Thymidin-Inkorporation. Die Effekte konnten durch Vitamin A verstärkt werden. Meistens können Zellen unter einem Stimulus entweder nur eine spezifische Stoffwechselleistung oder ein Wachstum vollbringen. Insofern waren die beobachteten Effekte überraschend. Allerdings ist der beobachtete gesteigerte Thymidinaufnahme noch kein oder kein sicherer Beweis für ein Wachstum. Eine DNS-Bestimmung wurde von uns nicht durchgeführt. Eine Zellzählung zum Nachweis eines Wachstums war insofern ungeeignet, weil die Zellen adherent sind.

4.2 Einfluss von Rosiglitazon auf die Iodid- und Thymidinaufnahme in nicht-transformierte Schweineschilddrüsenzellen ohne und mit gleichzeitiger Stimulation von Vitamin A

Die Radioiodaufnahme in kultivierte nicht transformierte Schweinethyreozyten ließ sich durch Rosiglitazon dosisabhängig steigern. Die Unterschiede zur Kontrolle waren oberhalb von 7,5 µM häufiger signifikant als bei niedrigeren Konzentrationen. Dies galt unabhängig von einer simultanen Stimulation mit Vitamin A in verschiedenen Konzentrationen.

Bei einer kurzen Stimulationsdauer mit Rosiglitazon von 2 oder 4 Stunden waren die Iodaufnahmeraten nie signifikant von der Kontrolle verschieden. Signifikante Unterschiede zeigten sich gehäuft erst nach 40 und 64 Stunden Stimulationsdauer. Bei einer Stimulation mit Rosiglitazon plus einer hohen

Konzentration an Vitamin A (3,6 μM) wurde der maximale Iodaufnahme allerdings schon nach 16 Stunden erreicht.

Verglich man nun den Einbau von Iodid unter einer sich steigernden Konzentration von Vitamin A und simultaner Rosiglitazon-Zugabe, so zeigte sich, daß sich der Iodid-Einbau durch Vitamin A nicht weiter steigern ließ. Ein additiver Effekt ergab sich nicht. Hierin zeigte sich ein wesentlicher Unterschied zu den transformierten Thyreozyten. Die molekularen Ursachen hierfür sind unklar. Vielleicht wird der Effekt von Rosiglitazon bei nicht-transformierten Thyreozyten nur über ein Homodimer von PPAR γ vermittelt.

TSH steigerte bei den Schweinethyreozyten die Radioiodaufnahme zu den beobachteten Zeiten nur schwach, die Unterschiede zur Kontrolle waren nur bei einigen Messzeiten signifikant. Dies konnte damit erklärt werden, daß TSH auf normale Thyreozyten einen biphasischen Effekt ausübt, wobei Iodid zunächst unter der Depolarisation der Zellmembran aus der Zelle ausströmt und erst zu einem späteren Zeitpunkt verstärkt zurückströmt (Halmi et al. 1960). Maligne entartete Zellen sprechen dagegen häufig gar nicht auf TSH an. Bei den Schweinethyreozyten war unter Rosiglitazon bei gleicher Stimulationsdauer und unter gleichen Kulturbedingungen der den Radiolodaufnahme stimulierende Effekt größer als unter TSH. Rosiglitazon muss also direkt die Zahl der Natrium-Iodid-Symporter erhöhen oder die vorhandenen in ihrer Aktivität stimulieren. Für eine Steigerung der NIS spricht, daß wir unter Rosiglitazon eine Steigerung der immunzytochemischen Reaktion gegen NIS nachweisen konnten.

Betrachtete man die Radiolodaufnahme in gesunde nicht transformierte Thyreozyten vom Schwein im Vergleich zum Einbau in karzinogene humane transformierte Thyreozyten, so war festzustellen, daß Rosiglitazon in karzinogenen humanen Thyreozyten deutlichere Effekte in der Radioiodaufnahme bezogen auf die jeweilige Kontrolle erzielte als in gesunden Schweinethyreozyten. Die Ursache hierfür kann an Speciesunterschieden liegen. Andererseits kann die Ursache in der Tatsache zu sehen sein, daß es sich einerseits um karzinogene und andererseits um gesunde Thyreozyten handelt. Ideal wäre es gewesen, wenn diese Vergleiche an Zellen der gleichen Spezies hätten vorgenommen werden können.

Würde dieser Unterschied in der durch Rosiglitazon induzierten gesteigerten Radioiodidaufnahme zwischen transformierten und nicht transformierten humanen Thyreozyten auch zutreffen, so wäre dies für eine Radioiodtherapie günstig, da bei dieser Tumortherapie in den karzinogenen Zellen eine höhere Radioiodidaufnahme erreicht werden würde, als in den den Tumor umgebenden gesunden Zellen.

Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsvermittler für Rosiglitazon. In einigen Fällen steigerte es die Radioiodaufnahme schwach signifikant gegenüber der Kontrolle. Dies kann bedeuten, daß vielleicht nicht nur das Rosiglitazon die Iodaufnahme in die Thyreozyten erhöhte, sondern auch sein Lösungsvermittler DMSO mit dazu beitrug.

Wurde nun die Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Rosiglitazon und Vitamin A betrachtet, so ließen sich innerhalb des Betrachtungszeitraums vor allem nach 16 und 40 Stunden Stimulation maximale Einbauraten erkennen. Unter steigendem Vitamin A-Zusatz (bis 1,8 μM) verschob sich der Zeitpunkt des maximalen Einbaus auf 40 Stunden. Bei einer Rosiglitazon-Konzentration von 10 μM kam es ohne und mit 1,8 μM Vitamin A zu signifikanten Thymidin-Einbauraten von bis zum 1,6-fachen des Kontrollwertes.

Ohne Vitamin A-Zusatz zum Medium steigerte Rosiglitazon die Thymidinaufnahme bis um das 4-fache gegenüber der Kontrolle. Es wirkte also nicht zytostatisch. Damit kann es einen wachstumsstimulierenden Effekt haben, sofern das Thymidin in die DNS eingebaut wird. Wurde dem Medium mit Rosiglitazon auch Retinol zugefügt, verringerte sich die Thymidinaufnahme dosisabhängig und betrug unter 1,8 μM Vitamin A nur noch das 1,7-fache im Vergleich zur Kontrolle. Auch bei der Thymidinaufnahme wirkte sich somit bei den nicht-transformierten Zellen Vitamin A nachhaltig auf die Wirkung von Rosiglitazon aus.

4.3 Einfluss von Rosiglitazon auf den immunzytochemisch darstellbaren Natrium-Iodid-Symporter von Schweinethyreozyten und von malignen humanen Schilddrüsenzellen

Der Natrium-Iodid-Symporter ist ein an der basolateralen Zellmembran der Thyreozyten gelegenes Membranprotein, welches durch aktiven Transport das Iodid in die Schilddrüsenzelle transportiert. (Spitzweg 2001, Dai et al. 1996, Köhrle et al. 1998)

Die NIS-Regulation ist in vivo TSH-abhängig (Schmutzler, 2000). Eine erhöhte NIS-Expression wird allerdings auch in autonomen Adenomen der Schilddrüse und im Schilddrüsengewebe von Basedow-Patienten beobachtet.

Untersuchungen an Schweinethyreozyten haben gezeigt, daß bei einer durch Retinol hervorgerufenen erhöhten Radioiodidinkorporation in kultivierte Schweinethyreozyten die Darstellung der NIS an der äußeren Zellmembran zunimmt (Meller 2002). Witke et al. (2001) haben gezeigt, daß die mRNA des NIS unter Retinol bei Schweinethyreozyten jedoch überraschenderweise nicht ansteigt. Damit kann kein neues NIS-Protein synthetisiert worden sein. Es kommen eine Stabilisierung der mRNA, eine Substratstabilisierung des Proteins oder eine veränderte Lokalisation des Proteins in der Zelle als Gründe für die erhöhte Aktivität in Frage. Offensichtlich beeinflußt hauptsächlich die Lokalisation des NIS-Proteins die Aktivität. Schilddrüsenmalignome zeigen häufig noch eine NIS Expression auf der mRNA- und Proteinebene, während die Aktivität des NIS reduziert ist (Paschke et al. 2001; Ringel et al. 2001). Ganz offensichtlich wird die Membranfluidität durch das eingesetzte Retinol verändert. Ursache könnte die alkoholische OH-Gruppe des Retinols sein. Dadurch können inaktive aber schon in der Membran vorhandene NIS-Proteine an die Zelloberfläche gelangen. Immunzytochemisch wird zumindest mehr NIS-Protein in der Zelle nachweisbar (Meller 2002). So wird die gesteigerte Iodidaufnahme auch ohne neue Neusynthese von NIS-Protein erklärbar.

In den vorliegenden Untersuchungen stellte sich heraus, daß durch den Einfluss von Rosiglitazon sowohl nach 17 als auch nach 41 Stunden die

Darstellung der NIS-positiven Zellen bei den gesunden Schweinethyreozyten gegenüber der Kontrolle um fast 20% erhöht war, sofern die Zellen ausschließlich mit Rosiglitazon stimuliert wurden. Bei gleichzeitiger Stimulation mit Vitamin A war die NIS-Darstellung jedoch nicht so hoch. Wie diese Interaktion zwischen Rosiglitazon und Vitamin A in der Zellmembran abläuft ist unklar.

Bei den Thyreozyten der Zelllinie FTC 238 zeigte sich eine um 8% erhöhte Anzahl NIS-positiver Zellen im Vergleich zur Zelllinie FTC 133. Dies bedeutet, daß in der aus der Fermetastase entnommenen Zelllinie im Gegensatz zu den aus dem Primärtumor entnommenen Thyreozyten eine vermehrte Menge an NIS immunzytochemisch dargestellt wird. Da unter Rosiglitazon bei Schweinethyreozyten sowohl die Anzahl NIS-positiver Zellen als auch die Radioiodaufnahme in Thyreozyten anstieg, liegt hier die Vermutung nahe, daß entweder neue NIS-Proteine gebildet oder vermehrt NIS-Proteine an die Zelloberfläche transferiert worden sind.

Bei den karzinogenen humanen Thyreozyten ließ sich unter Rosiglitazon dagegen keine gegenüber der Kontrolle vermehrte Menge an NIS immunzytochemisch an der Thyreozytenoberfläche nachweisen. Da die Iodaufnahme aber signifikant gesteigert wurde, würde dies bedeuten, daß die vorhandenen NIS-Proteine bei den entarteten Zellen unter Rosiglitazon effektiver Iodid in die Zellen einschleusen.

4.4 Bestimmung des Glucoseeinbaus unter dem Einfluss von Rosiglitazon

Der Insulinsensitizer Rosiglitazon, der zu den Glitazonen gerechnet wird, greift an verschiedenen Stellen in die intrazelluläre Insulin-Signalkette ein. Als Ergebnis kommt es zu einer Verbesserung des Glucosetransports aus dem Blut in die Muskel- und Fettzellen sowie in die Leberzellen (Burgis 2001, Herold et al. 2004, Miyazaki et al. 2003, Mayerson et al. 2002). Überraschend ist, daß der Glucoseeinbau in den karzinogenen humanen Schilddrüsenzellen durch

Rosiglitazon nicht dosisabhängig erhöht wurde. Da die Plasmamembranen für Glucose impermeabel sind, kann sie nur mit Hilfe geeigneter Transportproteine aufgenommen werden. Derartige Proteine sind inzwischen in allen Geweben identifiziert worden. In Fettgewebe und in Skelettmuskulatur werden unter dem Einfluss von Insulin intrazelluläre Glucosetransporter (GLUT 4-Transporter) in die Plasmamembran verlagert. Dies führt dann zu einer Erhöhung der Aufnahmekapazität für Glucose (Löffler 1999). Normalerweise zeigen maligne entartete Zellen einen erhöhten Glucosemetabolismus. Die Ursache dafür liegt an einer Überexpression von glucoseregulierenden Schlüsselenzymen und Glucosetransportern und ist eines der biochemischen Hauptcharakteristika von maligne entarteten Zellen. Diese zunehmende Glucoseaufnahme über den Transporter GLUT1 scheint sich jedoch bei Schilddrüsenmalignomen nur auf aggressivere und high-grade Tumoren zu beschränken (Schronberger 2002). Tumoren mit günstigerer Prognose hingegen zeigen keine signifikante Steigerung der Glucoseaufnahme. Dies dürfte auch für die hier untersuchten Zellen zutreffen. Rosiglitazon hat bei den maligne entarteten Schilddrüsenzelllinien die Glucoseaufnahme nicht verbessert. Es dürfte somit bei Schilddrüsenkarzinomen die Metastasensuche mittels ^{18}F -markierter Desoxyglucose im Rahmen einer PET-Untersuchung vermutlich nicht verbessern (Cohen et al. 2001, Giammarile et al. 2004).

5 Zusammenfassung

Voraussetzung für eine erfolgreiche Radioiodtherapie bei Schilddrüsenmalignomen ist die Radioiodaufnahme in die Zellen. Durch ihre Entartung verlieren die Schilddrüsenmalignomzellen jedoch häufig diese Fähigkeit. Es ist bekannt, daß Retinsäurederivate solche Malignomzellen zur Redifferenzierung und somit zur Iodaufnahme anregen können. Nachteilig in diesem Zusammenhang ist die Toxizität dieser Retinsäurederivate. Eine völlig andere Substanz zur Redifferenzierungstherapie bei Schilddrüsenmalignomen könnte der Insulinsensitizer Rosiglitazon sein, der hier untersucht wurde.

Die Wirkung von Rosiglitazon auf Thyreozyten wurde sowohl an den malignen (transformierten) humanen Schilddrüsenzelllinien FTC 133 als auch an kultivierten Schweinethyreozyten untersucht. Die Schweinethyreozyten dienen als Modell für nichttransformierte Zellen. In Primärkultur zeigen sie ähnliche Merkmale wie humane Thyreozyten *in vivo*. Die Stimulation beider Thyreozytenarten erfolgte auch unter verschiedenen Retinolkonzentrationen, zumal ein synergistischer Effekt zwischen Rosiglitazon und Retinol nicht unplausibel sein dürfte. Von Rosiglitazon ist bekannt, daß es über den Kernrezeptor PPAR γ wirkt, während Retinoide über den Kernrezeptor RXR wirken. Beide Kernrezeptoren können ein Heterodimer bilden, das an das Hormone-response-Element entsprechender Gene bindet und eine Transkription und Translation initiiert.

Rosiglitazon bewirkte in humanen karzinogenen Thyreozyten eine signifikant erhöhte Radiolodaufnahme. Durch simultane Zugabe von Retinol konnte ein synergistischer Effekt auf die Radioiodaufnahme erzielt werden. Dies ließ die Schlussfolgerung zu, daß die Radioiodaufnahme über das Heterodimer der Kernrezeptoren PPAR γ / RXR initiiert sein kann. Durch das gleichzeitige Vorhandensein beider Stimulanzen wurde letztlich eine effektivere Wirkung des NIS erreicht, die zur verstärkten Radioiodaufnahme führte. Dies kann

entweder durch eine Neusynthese von NIS-Protein, eine Steigerung seiner Aktivität oder einen erhöhten Transfer von NIS-Proteinen an die Thyreozytenoberfläche erreicht worden sein. An Schweinethyreozyten konnte dieser Transfer immunzytochemisch nachgewiesen werden. Rosiglitazon führte im immunzytochemischen Nachweis zu einer um 20% erhöhten NIS-Protein-Expression an der Oberfläche gesunder Schweinethyreozyten.

Bei den karzinogenen humanen Thyreozyten ließ sich durch Rosiglitazon dagegen keine signifikante Steigerung von NIS-Protein an der Oberfläche der Thyreozyten nachweisen. Überraschenderweise war aber auch hier die Radioiodaufnahme unter Rosiglitazon gesteigert. Dies bedeutet, daß die vorhandenen NIS-Proteine dann effektiver Iodid in die Zelle eingeschleust haben. Für eine signifikante Radiolodaufnahme in die nicht-transformierten Schweinethyreozyten musste die Rosiglitazonkonzentration über 10 µM liegen. Dies galt auch für die transformierten humanen Thyreozyten. Die Zugabe von Vitamin A hatte hier keinen wesentlichen Effekt auf die Aufnahme von Iodid in die Thyreozyten.

In den humanen karzinogenen Thyreozyten führte Rosiglitazon gleichzeitig zu einer Steigerung des ³H-Thymidineinbaus. Die simultane Zugabe von Vitamin A bewirkte dabei einen von der Dosis abhängigen synergistischen Effekt auf den ³H-Thymidineinbau. Das Wachstum, für das die Thymidinaufnahme eine Voraussetzung ist, dürfte bei den kultivierten malignen humanen Thyreozyten somit weder durch Rosiglitazon noch durch Retinol gehemmt werden. Eine zytostatische Wirkung auf die entarteten Zellen wurde durch die einzelnen Wirkstoffe oder ihre Kombination also nicht erreicht.

Sowohl durch Rosiglitazon als auch durch Vitamin A oder die Kombination beider Substanzen wurden die Einbauraten des ³H-Thymidins in die kultivierten Schweinethyreozyten gesteigert. Auch in nicht-transformierten Thyreozyten blieb somit unter diesen Wirkstoffen ein zytostatischer Effekt aus.

Der Vergleich des Radiolodaufnahmes in humane karzinogene Thyreozyten mit dem Einbau in kultivierte Schweinethyreozyten als Modell für nicht-transformierte Zellen ergab, daß der Radiolodaufnahme in transformierte Zellen ausgeprägter als in nicht-transformierte Zellen war. Wegen der Species-Unterschiede war ein solcher Vergleich jedoch nur mit Vorbehalt zulässig.

Rosiglitazon steigerte den Glucoseeinbau in Thyreozyten nicht signifikant, wie die Untersuchungen mit 2-Desoxy-D-[¹⁻³H]Glucose zeigten. Dies war überraschend, da der Glucoseeinbau durch den Insulinsensitizer Rosiglitazon normalerweise in seinem Zielgewebe (Skelettmuskelzellen, Fettgewebszellen, Leberzellen) erhöht wird. Eine verringerte Expression und/oder eine Mutation des Glucosetransporters könnte die Ursache hierfür sein.

6 Literaturverzeichnis

Bennett SM, Agrawal A, Elasha H, Heise M, Jones NP, Walker M, Wilding JP
(2004) rosiglitazone improves insulin sensitivity, glucose tolerance and ambulatory blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance
Diabet Med, 21(5):415-22

Brauckhoff M, Dorsch K, Hadecke J, Kujat C, Straube F, Krause U, Dralle H
(2001) Multinationales Therapiekonzept bei metastasiertem follikularem Schilddrüsenkarzinom mit Hyperthyreose
Chirurg.; 72 (1): 37-42

Burgis, E
(2001) Diabetes mellitus
Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 2. Auflage, Urban und Fischer, 383-8

Chung SH, Onoda N, Ishikawa T, Ogisawa K, Takenaka C, Yano Y, Hato F, Hirakawa K
(2002) Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Activation Induces Cell Cycle Arrest via the p53-independent Pathway in Human Anaplastic Thyroid Cancer Cells
Jpn. J. Cancer Res., 93:1358-1365

Coelho SM, Corbo R, Buescu A, Carvalho DP, Vaisman M
(2004) Retinoic acid in patients with radioiodine non-responsive thyroid carcinoma.
J Endocrinol Invest.; 27 (4): 334-9

Cohen MS, Arslan N, Dehdashti F, Doherty GM, Lairmore TC, Brunt LM, Moley JF

(2001) Risk of malignancy in thyroid incidentalomas identified by fluorodeoxyglucose-positron emission tomographie
Surgery; 130 (6):941-6

Dai G, Levy O, Carrasco N

(1996) Cloning and characterisation of the thyroid iodide transporter
Nature, 379, 458-60

Fujiwara T, Horikoshi H

(2000) Troglitazone and related compounds: Therapeutic potential beyond diabetes
Life-science, 67 (20): 2405-16

Giammarile F, Hafdi Z, Bournaud C, Janier M, Houzard C, Desuzinges C, Itti I, Sassolas G, Borson-Chazot F

(2004) Is FDG scintigraphy with non-dedicated PET useful in the diagnostic management of suspected metastatic thyroid carcinoma in patients with no-detectable radioiodine uptake?
European J. Endocrinol; 150 (3): 277-83

Grüning T., Tiepolt C., Zöphel K., Bredow J., Kropp J., Franke WG.

(2003) Retinoic acid for redifferentiation of thyroid cancer- does it hold its promise?
European Journal of Endocrinology, 148:395-402

Haldemann AR

(1999) The basis for radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer
Revue-therapeutique, 56(7):403-7

Halmi NS, Granner DK, Doughman DJ, Peters BH, Muller G

(1960) Biphasic effect of TSH on thyroidal iodide collection in rats
J. Endocrinology, 67:70-81

Havekes B, Schröder E, van der Ist JP, van der Pluijm G, Goslings BM,
Morreau J, Romijn JA, Smit JWA
(2000) Beneficial effects of retinoic acid on extracellular matrix
degradation and attachment behaviour in follicular thyroid carcinoma cell
lines
Journal of endocrinology 229-238

Heaney AP, Fernando M, Melmed S
(2003) PPAR γ receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas
J Clin. Invest.,111(6): 1381-1388

Hernandez R, Teruel T, Lorenzo M
(2003) Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing
expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown
adipocytes
Diabetologia 46(12):1618-28

Herold G
(2004) Malignome der Schilddrüse
Innere Medizin 635-637

Hildebrandt H
(1994) Pschyrembel,
Klinisches Wörterbuch 1641-1642

Janka HU
(2001) Glitazone, Der Internist,
Springer Verlag (587-596)

Jetten AM, Jetten MR, Shapiro S, Poon J

(1979) Characterization of the action of retinoids in mouse fibroblast cell lines

Exp. Cell. Res. 119, 289-299

Karavitaki N, Vlassopoulou V, Tzanela M, Tzavara I, Thalassinos N,

(2002) Recurrent and/ or metastatic thyroid cancer: therapeutic options

Expert Opin Pharmacother, 3(7):939-47

Kawa S, Nikaido T, Unno H, Usada N, Nakayama K, Kiyosawa K

(2002) Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone.

Pancreas, 24(1):1-7

Klutmann S, Jenicke L, Geiss-Tonshoff M, Bohuslavizki KH, Wester J, Clausen M

(2001) Prevalence of iodine- and thyroglobin-negative findings in differentiated thyroid cancer.

Nuklearmedizin, 40(5):143-47

Köhrle J, Schmutzler C

(1998) Wie kommt Iod in die Schilddrüse?

Internist; 39, 560-65

Kocharova S, Farkas R

(2002) Hormone nuclear receptors and their ligands: role in programmed cell death

Endocrine Regulations,36:37-60

Kumar A, Bal CS

(2003) Differentiated thyroid cancer

Indian J Pediatr., 70 (9):707-13

Löffler G

(1999) Regulation des Glucosestoffwechsels

Basiswissen Biochemie, 3. Auflage, Springer-Verlag, 125-6

Mackenzie EJ, Mortimer RH

(2004) Thyroid nodules and thyroid cancer

Med J Aust.; 180 (12):654-5

Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enockson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF

(2002) The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes

Diabetes; 51 (3):797-802

Meller D

(2002) Untersuchungen an kultivierten Schweinethyreozyten

Inaug. Dissertation, Universität Tübingen

Min KM, Park SW, Cho KY, Song MS, Kim DK, Park GS, Lee MK

(2002) Troglitazone improves blood flow by inhibiting neointimal formation after balloon injury in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats

Metabolism. ; 51 (8): 998-1002

Miyazaki Y, He H, Mandarino LJ, DeFronzo RA

(2003) Rosiglitazone improves downstream insulin receptor signaling type 2 diabetes

Morley JE, Melmed S, Reed A, Kasson BG, Levin SR, Pekary AE, Hershman JM

(1980) Effekt of vitamin A on the hypothalamo-pituitary-thyroid axis

Am J Physiol.; 238 (2): E 174-9

Namba H, Yamashita S, Usa T, Kimura H, Yokoyama N, Izumi M, Nagataki S
(1993) Overexpression of the Intact Thyrotropin Receptor in a Human
Thyroid Carcinoma Cell Line
Endocrinology 839-45

Nasu M, Sugawara M
(1993) Ethanol has thyrotropin-like activity in cultured porcine thyroid
follicles
Endocrinology 132, 1, 155-160

Ohta K, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T
(2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma
inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma
cells.
J Clin. Endocrinol. Metab., 86(5):2170-2177

Park JW, Wong MG, Lobo M, Hyun WC, Duh QY, Clark OH
(2003) Modulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing
ligand induced apoptosis by chemotherapy in thyroid cancer cell lines.
Thyroid, 13(12):1103-1110

Paschke R, Neumann S
(2001) Sodium/iodide symporter mRNA expression in cold thyroid
nodules.
Exp Clin Endocrinol Diabetes ; 109(1):45-6.

Pemrick SM, Lucas DA, Grippo JF
(1994) The retinoid receptors
Leukemia 8 Suppl 3, 1-10

Reinwein D, Benker G

(1996) Endokrinologie und Stoffwechsel,
Thieme Verlag 159

Ringel MD, Anderson J, Souza SL, Burch HB, Tambascia M, Shriver CD, Tuttle RM.

(2001) Expression of the sodium iodide symporter and thyroglobulin genes are reduced in papillary thyroid cancer.
Mod Pathol.;14(4):289-96.

Scherübl H, Raue F, Georgi P, Ziegler R

(1989) Hyperthyreose durch ein hormonproduzierendes follikuläres Schilddrüsenkarzinom
Klinische Wochenschrift 67
Springer Verlag 304-307

Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J, Köhrle J

(1998) Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells.
Biochem Biophys Res Commun; 246(2):562.

Schmutzler C, Köhrle J

(2000) Implications of the molecular characterisation of sodium-iodide Symporter (NIS)
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, 106, 301-10

Schmutzler C

(2001) Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids
Exp Clin Endocrinol Diabetes, 109(1):41-44

Schmutzler C, Schmitt TL, Glasre F, Loos U, Köhrle J

(2002) The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid

Molecular-and-cellular endocrinology 189 (1-2) 145-15

Schonberger J, Ruschoff J, Grimm D, Marienhagen J, Rummele P, Meyringer R, Kossmehl P, Hofstaedter F, Eilles C

(2002) Glucose transporter 1 gene expression is related to thyroid neoplasms with an unfavorable prognosis: an immunohistochemical study.

Thyroid.; 12 (9): 747-54

del Senno L., Rossi R., Gandini D., Piva R., Franceschetti P.

(1993) Retinoic acid-induced decrease of DNA synthesis and peroxidase mRNA levels in human thyroid cells expressing retinoic acid receptor alpha mRNA

Life Science, 53:1039-1048

Shen Q, Cline GW, Shulman GI, Leibowitz MD, Davies PJ

(2004) Effects of rexinoids on glucose transport and insulin-mediated signalling in skeletal muscles of diabetic (db/db) mice

Biol Chem 279(19):19721-31

Simon D, Koehrle J, Reiners C, Boerner AR, Schmutzler C, Mainz K, Goretzki PE, Roehrer HD

(1998) Redifferentiation therapy with retinoids: therapeutic option for advanced follicular and papillary thyroid carcinoma

World –journal-of-surgery 6 569-574

Simon D, Körber C, Krausch M, Segering J, Groth P, Görges R, Grünwald F, Müller M, Gärtner HW, Schmutzler C, Köhrle J, Röher HD, Reiners C

(2002) Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study

European Journal of Nuclear Medicine, 29(6):775-782

Smith MA, Parkinson DR, Cheson BD, Friedman MA

(1992) Retinoids in cancer therapy

J Clin. Oncol.; 10 (5): 839-64

Smit J-W, Schroder van der Elst J-P, Karperien M, Que I, Stokkel M, van der Heide D, Romijn JA

(2001) Iodide kinetics and experimental (131)I therapy in a xenotransplanted human sodium-iodide symporter-transfected human follicular thyroid carcinoma cell line

The Journal of clinical endocrinology and metabolism 1247-53

Spitzweg C, Heufelder A, Morris J

(2000) Thyroid Iodine Transport

Thyroid Nummer 4 321

Spitzweg C, Dutton CM, Castro MR, Bergert ER, Goellner ER, Heufelder AE, Moris JC

(2001) Expression of the sodium iodide symporter in human kidney

Kidney-international; 59; 1013-23

Vazquez M, Silvestre JS, Prous JR,

(2002) Experimental approaches to study PPAR gamma agonists as antidiabetic drugs

Clin. Pharmacology, 24(8): 515-23

Verspohl EJ, Weiland F

(3.2002) Insulinsensitizer,

Pharmazie in unserer Zeit 280-292

Wahl R

(1991) Morphologische und biochemische Untersuchungen an der Schilddrüsenzellkultur. Theorie und Forschung, Bd. 161

Roderer, Regensburg

Witke A, Fröhlich E, Czarnocka B, Benz I, Häring HU, Wahl R
(2001) TSH and Retinol stimulate iodide uptake but not NIS mRNA and
NIS-Protein-Expression in cultured porcine thyrocytes.
J. Endocrinol. Invest. (Suppl.to no 6),24

Zarnegar R, Brunaut L, Kanauchi H, Wong M, Fung M, Ginzinger D, Duh QY,
Clark OH
(2002) Increasing the effectiveness of radioactiveiodine therapie in the
treatment of thyroid cancer using Trichostatin A, a histone deacetylase
inhibitor
Surgery, 132; 984-90

7 Anhang

7.1 Statistische Tabellen

Tab.1 zu Abb.7 Iodaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten in cpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentration pro Kulturloch, die Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes angegeben, n=4. Signifikante Unterschiede liegen vor, wenn die Radioiodidaufnahme um mehr als das 1,4-fache von jener der Kontrolle (= Thyreozyten ohne Stimulation) abweicht ($p < 0,05$).

Zeit (Stunden)	2 h	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation					
Kontrolle	235,6	359,8	205,2	224,4	247,0
SD	83,5	115,0	37,6	36,7	73,9
SEM	41,77	57,5	18,79	18,33	36,95
TSH 1,3 mU/ml	168,5	237,8	138,4	423,1	339,9
SD	45,6	72,4	52,5	12,9	69,3
SEM	22,8	36,18	26,25	6,43	34,66
Signifikant	-	-	-	1,89	-
Kontrolle mit DMSO	165,1	173,2	112,3	158,2	207,6
SD	27,8	55,0	7,4	20,1	61,8
SEM	13,9	27,52	3,72	10,06	30,92
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 5µM	121,4	149,4	93,4	180,7	155,4
SD	40,6	32,2	32,2	82,7	41,1
SEM	20,32	16,11	16,09	41,33	20,54
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 10,0 µM	660,0	604,0	449,2	396,7	458,7
SD	384,8	145,6	141,2	90,4	88,3
SEM	192,38	72,79	70,58	45,19	44,14
Signifikant	2,8	1,68	2,19	1,77	1,86
Rosiglitazon 50,0 µM	315,9	373,9	231,2	304,2	269,5
SD	28,1	52,7	19,3	117,1	44,7
SEM	14,1	26,3	9,6	58,6	22,4
Signifikant	-	-	-	-	-

Tab.2 zu Abb.8 Iodaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten in cpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentration pro Kulturloch, die Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes angegeben, n=4. Signifikante Unterschiede liegen vor, wenn die Radioiodidaufnahme um mehr als das 1,4-fache von jener der Kontrolle (= Thyreozyten ohne Stimulation) abweicht ($p < 0,05$).

Zeit (Stunden)	2 h	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation					
Kontrolle	441,2	439,7	641,4	539,1	326,2
SD	125,8	195,0	248,4	228,9	76,5
SEM	62,92	97,52	124,18	114,45	38,25
TSH 1,3 mU/ml	386,0	457,1	786,8	640,1	262,4
SD	109,8	70,9	201,0	177,2	45,0
SEM	54,92	35,45	100,48	88,59	22,51
Signifikant	-	-	-	-	-
Kontrolle mit DMSO	385,8	319,3	681,9	541,9	282,8
SD	113,0	129,8	114,9	225,6	39,7
SEM	56,48	64,88	57,46	112,82	19,84
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 5µM	191,1	640,9	382,1	392,6	232,7
SD	42,5	521,0	80,4	75,2	69,5
SEM	21,23	260,49	40,18	37,58	34,74
Signifikant	-	1,46	-	-	-
Rosiglitazon 10,0 µM	651,8	979,6	1948,4	943,5	591,7
SD	122,7	324,6	564,5	168,3	195,1
SEM	61,33	162,32	282,27	84,16	97,53
Signifikant	1,48	2,23	2,04	1,75	1,81
Rosiglitazon 50,0 µM	455,3	500,1	1146,3	781,9	432,0
SD	24,1	73,5	366,8	102,8	161,5
SEM	12,0	36,8	183,4	51,4	80,8
Signifikant	-	-	1,79	1,45	-

Tab.3 zu Abb.9 Iodaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten in cpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentration pro Kulturloch, die Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes angegeben, n=4. Signifikante Unterschiede liegen vor, wenn die Radioiodidaufnahme um mehr als das 1,4-fache von jener der Kontrolle (= Thyreozyten ohne Stimulation) abweicht ($p < 0,05$).

Zeit (Stunden)	2 h	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation					
Kontrolle	78,9	303,2	436,3	875,5	138,6
SD	19,8	102,0	141,0	69,9	51,1
SEM	9,92	51	70,49	34,94	25,53
TSH 1,3 mU/ml	177,5	297,5	524,9	670,0	288,3
SD	18,4	95,6	152,4	161,1	146,8
SEM	9,22	47,8	76,22	80,53	73,42
Signifikant	2,25	-	-	-	2,08
Kontrolle mit DMSO	152,3	237,6	366,1	513,3	114,3
SD	31,1	86,2	161,5	99,4	38,3
SEM	15,56	43,08	80,75	49,69	19,17
Signifikant	1,93	-	-	-	-
Rosiglitazon 5µM	221,0	142,5	258,9	490,5	132,4
SD	249,2	59,8	116,2	204,2	41,7
SEM	124,58	29,9	58,12	102,12	20,87
Signifikant	2,8	-	-	-	-
Rosiglitazon 10,0 µM	254,1	749,8	1166,9	832,8	276,5
SD	75,6	194,4	469,6	111,1	74,8
SEM	37,8	97,22	234,8	55,53	37,42
Signifikant	3,22	2,47	2,67	-	2
Rosiglitazon 50,0 µM	211,6	381,8	838,4	645,2	191,7
SD	44,1	76,1	199,0	99,0	16,5
SEM	22,1	38,1	99,5	49,5	8,3
Signifikant	2,68	-	1,92	-	-

Tab.4 zu Abb.10 Thymidineinbau in humane karzinogene Thyreozyten in dpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes angegeben, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um das 1,4 -fache oder weniger als das 0,7 -fache von der Einbaurrate bei der Kontrolle abweichen.

Zeit (Stunden)	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation				
Kontrolle	8282,6	14781,6	50894,4	46365,3
SD	3802,5	1856,7	11681,6	22672,9
SEM	1901,26	928,34	5840,78	11336,43
TSH 1,3 mU/ml	10679,5	18101,1	93353,6	70750,9
SD	1299,1	3968,5	41457,4	18791,7
SEM	649,57	1984,27	20728,69	9395,84
Signifikant	-	-	1,83	1,53
Kontrolle mit DMSO	8142,3	14954,0	72628,6	61609,7
SD	1362,0	1068,4	40229,2	7122,9
SEM	681,02	534,22	20114,6	3561,46
Signifikant	-	-	1,43	-
Rosiglitazon 1,0 μ M	7490,5	15537,0	78622,2	71067,7
SD	502,0	1719,4	19478,2	16553,5
SEM	251,02	859,68	9739,1	8276,74
Signifikant	-	-	1,54	1,53
Rosiglitazon 2,5 μ M	6607,9	14696,1	81581,6	80490,4
SD	995,2	2418,4	26471,3	12992,2
SEM	497,58	1209,18	13235,65	6496,12
Signifikant	-	-	1,6	1,74
Rosiglitazon 10,0 μ M	8704,1	18003,8	82959,9	73943,7
SD	1082,9	1631,3	13969,7	23704,9
SEM	541,5	815,6	6984,9	11852,4
Signifikant	-	-	1,63	1,59

Tab.5 zu Abb.11 Thymidineinbau in humane karzinogene Thyreozyten in dpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes angegeben, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um das 1,4 -fache oder weniger als das 0,7 -fache von der Einbaurrate bei der Kontrolle abweichen.

Zeit (Stunden)	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation				
Kontrolle	3940,2	10405,7	36976,1	58598,9
SD	1014,9	2202,0	12978,8	17034,4
SEM	507,46	1100,98	6489,41	8517,19
TSH 1,3 mU/ml	5758,8	14414,1	61958,6	72597,7
SD	1329,7	1009,4	19254,3	15444,8
SEM	664,87	504,69	9627,17	7722,42
Signifikant	1,46	-	1,68	-
Kontrolle mit DMSO	4806,9	12081,0	53889,0	64319,2
SD	1427,0	707,8	7091,2	8805,4
SEM	713,51	353,89	3545,62	4402,69
Signifikant	-	-	1,46	-
Rosiglitazon 1,0 μ M	5793,0	12780,8	59542,0	78049,1
SD	1281,0	3982,1	26516,4	9900,7
SEM	640,48	1991,03	13258,22	4950,36
Signifikant	1,47	-	1,61	-
Rosiglitazon 2,5 μ M	5366,3	13501,6	68251,1	90521,8
SD	943,9	2350,2	1783,9	15990,3
SEM	471,94	1175,08	891,93	7995,14
Signifikant	-	-	1,85	1,54
Rosiglitazon 10,0 μ M	6619,8	12829,0	69132,6	81463,7
SD	475,9	650,5	7082,3	7325,6
SEM	238,0	325,2	3541,1	3662,8
Signifikant	1,68	-	1,87	-

Tab.6 zu Abb.12 Thymidineinbau in humane karzinogene Thyreozyten in dpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes angegeben, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um das 1,4 -fache oder weniger als das 0,7 -fache von der Einbaurrate bei der Kontrolle abweichen.

Zeit (Stunden)	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation				
Kontrolle	6462,4	9754,7	29908,2	44942,9
SD	2152,7	3510,6	15566,7	11154,8
SEM	1076,34	1755,28	7783,34	5577,41
TSH 1,3 mU/ml	10837,2	12804,6	64133,2	69798,5
SD	1629,4	1920,0	19280,8	16377,8
SEM	814,7	959,98	9640,38	8188,92
Signifikant	1,68	-	2,14	1,55
Kontrolle mit DMSO	9530,2	11497,1	60054,2	75519,8
SD	1640,7	918,4	7841,7	11788,7
SEM	820,36	459,18	3920,85	5894,36
Signifikant	1,47	-	2,01	1,68
Rosiglitazon 1,0 μ M	7305,0	12343,8	69095,2	71593,4
SD	1673,9	2400,6	17496,5	44079,3
SEM	836,93	1200,31	8748,27	22039,63
Signifikant	-	-	2,31	1,59
Rosiglitazon 2,5 μ M	8292,1	13164,9	83642,6	87486,5
SD	2205,6	1820,6	13703,5	12781,3
SEM	1102,81	910,3	6851,75	6390,67
Signifikant	-	-	2,8	1,95
Rosiglitazon 10,0 μ M	11035,6	10965,2	50427,2	65162,3
SD	2475,3	520,7	10575,1	7967,8
SEM	1237,7	260,4	2,8	3983,9
Signifikant	1,71	-	-	1,45

Tab.7 zu Abb.13 Thymidineinbau in humane karzinogene Thyreozyten in dpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes angegeben, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um das 1,4 -fache oder weniger als das 0,7 -fache von der Einbaurrate bei der Kontrolle abweichen.

Zeit (Stunden)	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation				
Kontrolle	3954,5	9540,6	36798,8	61033,3
SD	1155,3	2186,7	14276,6	17190,8
SEM	577,63	1093,36	7138,32	8595,42
TSH 1,3 mU/ml	8315,0	9211,8	60735,8	75060,1
SD	1839,9	187,5	12427,8	22147,5
SEM	919,96	93,77	6213,89	11073,75
Signifikant	2,1	-	1,65	-
Kontrolle mit DMSO	6410,0	6635,2	69940,5	69948,9
SD	1703,7	818,1	27429,5	3807,8
SEM	851,84	409,03	13714,77	1903,91
Signifikant	1,62	0,7	1,9	-
Rosiglitazon 1,0 μ M	7950,9	7643,1	66037,8	87517,6
SD	1151,5	1218,6	20600,5	15547,2
SEM	575,74	609,29	10300,25	7773,62
Signifikant	2,01	-	1,79	1,43
Rosiglitazon 2,5 μ M	5798,5	7876,1	67435,4	100298,5
SD	1642,1	1503,5	23178,2	7644,2
SEM	821,05	751,76	11589,09	3822,11
Signifikant	1,47	-	1,83	1,64
Rosiglitazon 10,0 μ M	8445,1	10135,3	70867,5	82785,9
SD	1134,2	274,8	15155,2	17793,5
SEM	567,1	137,4	7577,6	8896,7
Signifikant	2,14	-	1,93	-

Tab.8 zu Abb.14 Iodaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes dargestellt, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Iodidinkorporation um das 1,4-fache von der Inkorporationsrate der Kontrollthyreozyten abweicht.

Zeit (Stunden)	2 h	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation					
Kontrolle	1751,4	534,1	3405,9	2127,4	1538,4
SD	617,0	100,0	791,2	852,8	464,5
SEM	308,48	50,02	395,61	426,41	232,23
TSH 1,3 mU/ml	1906,4	414,0	2548,7	2378,9	2144,0
SD	403,6	63,6	1745,1	551,9	462,0
SEM	201,78	31,81	872,57	275,95	231,01
Signifikant	-	-	-	-	-
Kontrolle mit DMSO	1350,1	481,2	3673,5	3041,5	2050,3
SD	942,5	74,0	400,5	678,6	436,7
SEM	471,23	36,99	200,27	339,31	218,35
Signifikant	-	-	-	1,42	-
Rosiglitazon 7,5 µM	2116,2	579,0	4205,4	2843,6	1999,1
SD	269,3	62,4	650,8	1139,6	481,5
SEM	134,67	31,19	325,41	569,81	240,76
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 10,0 µM	2304,4	450,5	3897,1	3354,5	2448,7
SD	107,7	28,8	263,4	111,5	386,5
SEM	53,83	14,39	131,72	55,76	193,27
Signifikant	-	-	-	1,58	1,6
Rosiglitazon 50,0 µM	324,1	51,2	788,7	478,3	570,3
SD	280,7	44,3	683,1	414,2	493,9
SEM	162,07	25,6	394,36	239,13	285,14
Signifikant	-	-	-	-	1,52
Rosiglitazon 100,0µM	1554,1	458,3	3060,7	2736,7	2424,0
SD	41,6	67,9	696,7	409,9	693,7
SEM	20,81	33,94	348,33	204,93	346,87
Signifikant	-	-	-	-	1,58

Tab.9 zu Abb.15 Iodaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes dargestellt, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Iodidinkorporation um das 1,4-fache von der Inkorporationsrate der Kontrollthyreozyten abweicht.

Zeit (Stunden)	2 h	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation					
Kontrolle	1989,2	982,8	5351,5	2811,9	3259,3
SD	134,9	146,0	1095,8	1149,0	565,3
SEM	67,5	73,0	547,9	574,5	282,7
TSH 1,3 mU/ml	2116,5	909,4	5919,7	4352,3	3608,9
SD	150,1	134,8	661,7	481,7	657,6
SEM	75,05	67,42	330,87	240,86	328,78
Signifikant	-	-	-	1,55	-
Kontrolle mit DMSO	2375,9	954,9	6297,0	4993,9	3534,2
SD	185,3	110,1	1348,0	400,3	462,1
SEM	92,65	55,05	674	200,14	231,03
Signifikant	-	-	-	1,78	-
Rosiglitazon 7,5 µM	2404,4	1195,4	4584,4	3362,0	3157,4
SD	484,7	92,9	1524,5	1349,5	1175,0
SEM	242,37	46,43	762,23	674,73	587,51
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 10,0 µM	2372,7	1056,3	6602,5	4254,9	4109,1
SD	217,3	92,7	323,4	1017,1	325,5
SEM	108,66	46,33	161,72	508,55	162,76
Signifikant	-	-	-	1,51	-
Rosiglitazon 50,0 µM	2168,0	1216,1	6295,1	4706,7	3282,2
SD	356,2	423,3	1278,0	957,0	770,0
SEM	178,08	211,67	639,02	478,5	384,98
Signifikant	-	-	-	1,67	-
Rosiglitazon 100,0µM	1791,1	833,0	5041,4	3947,4	3222,6
SD	172,0	73,3	1010,3	326,6	1098,8
SEM	86	36,66	505,13	163,31	549,4
Signifikant	-	-	-	1,4	-

Tab.10 zu Abb.16 Iodaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes dargestellt, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Iodidinkorporation um das 1,4-fache von der Inkorporationsrate der Kontrollthyreozyten abweicht.

Zeit (Stunden)	2 h	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation					
Kontrolle	2672,9	1227,7	9581,5	7514,4	2699,3
SD	628,6	210,8	1433,2	1545,0	1279,4
SEM	314,3	105,4	716,6	772,5	639,7
TSH 1,3 mU/ml	3163,4	1053,5	6976,6	7274,2	3838,6
SD	672,8	92,4	1744,0	3190,6	732,4
SEM	336,38	46,2	871,99	1595,32	366,18
Signifikant	-	-	-	-	1,42
Kontrolle mit DMSO	3564,8	1098,8	9311,4	7871,5	3624,1
SD	486,2	93,3	1816,5	1438,9	851,2
SEM	243,11	46,64	908,27	719,44	425,6
Signifikant	1,41	-	-	-	-
Rosiglitazon 7,5 µM	3763,8	1382,5	6778,4	6132,6	3282,2
SD	2663,2	269,4	3406,8	3539,8	1640,2
SEM	1331,61	134,7	1703,42	1769,89	820,1
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 10,0 µM	2491,3	1184,5	8106,9	7229,3	2941,8
SD	149,9	123,4	486,4	586,1	265,7
SEM	74,95	61,68	243,2	293,06	132,83
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 50,0 µM	2992,2	1054,6	6089,2	7345,3	3014,9
SD	391,5	140,4	1827,7	1596,0	1217,5
SEM	195,76	70,21	913,83	797,99	608,75
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 100,0µM	2363,2	1090,6	7634,2	6919,4	3967,7
SD	17,6	102,5	1292,7	1033,3	2033,6
SEM	8,78	51,27	646,37	516,67	1016,8
Signifikant	-	-	-	-	1,5

Tab.11 zu Abb.17 Iodaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. In der Tabelle sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und der Standardfehler des Mittelwertes dargestellt, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Iodidinkorporation um das 1,4-fache von der Inkorporationsrate der Kontrollthyreozyten abweicht.

Zeit (Stunden)	2 h	4 h	16 h	40 h	64 h
Stimulation					
Kontrolle	2624,3	1530,4	4435,1	4052,3	3655,6
SD	533,6	133,7	1662,6	1738,8	482,3
SEM	266,8	66,8	831,3	869,4	241,2
TSH 1,3 mU/ml	3130,8	1173,7	5532,6	5471,9	4741,3
SD	275,8	118,2	492,2	461,0	1149,4
SEM	137,88	59,1	246,11	230,49	574,69
Signifikant	-	-	-	-	-
Kontrolle mit DMSO	3222,2	1150,0	7124,1	5691,1	4783,6
SD	131,0	170,7	698,5	509,0	624,8
SEM	65,5	85,34	349,24	254,52	312,39
Signifikant	-	-	1,61	1,4	-
Rosiglitazon 7,5 µM	3258,7	1386,1	6267,9	4240,5	1900,5
SD	2358,1	210,8	2503,2	1727,9	512,2
SEM	1179,06	105,42	1251,61	863,97	256,09
Signifikant	-	-	1,41	-	-
Rosiglitazon 10,0 µM	2684,4	1307,8	6387,1	5269,2	4977,4
SD	391,8	34,6	795,6	1942,2	1480,5
SEM	195,88	17,29	397,81	971,11	740,25
Signifikant	-	-	1,44	-	-
Rosiglitazon 50,0 µM	2797,4	1290,8	6202,9	6097,5	4635,5
SD	448,6	339,4	1421,4	812,9	337,0
SEM	224,31	169,7	710,71	406,43	168,5
Signifikant	-	-	-	1,5	-
Rosiglitazon 100,0µM	2360,5	890,2	6290,2	6727,3	3332,8
SD	311,9	63,6	1127,4	506,1	528,0
SEM	155,97	31,78	563,69	253,04	264,02
Signifikant	-	-	1,42	1,66	-

Tab.12 zu Abb.18 Thymidineinbau in Schweinethyreozyten in dpm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um mehr als das 1,4-fache oder um weniger als das 0,7-fache von der Inkorporationsrate der Kontrolle abweicht.

Zeit (Stunden)	2 h	16 h	40 h	64 h	88 h
Stimulation					
Kontrolle	1011,4	652,4	460,0	4857,4	3643,5
SD	27,5	180,6	181,8	774,5	349,6
SEM	13,75	90,3	90,88	387,24	174,82
TSH 1,3 mU/ml	1098,4	528,1	544,7	5352,8	3654,4
SD	296,7	225,0	123,5	2130,5	517,4
SEM	148,34	112,48	61,74	1065,24	258,7
Signifikant	-	-	-	-	-
Kontrolle mit DMSO	542,7	476,1	461,0	4423,7	3053,5
SD	92,2	236,2	12,6	649,4	272,3
SEM	46,1	118,12	6,29	324,69	136,16
Signifikant	0,5	0,73	-	-	-
Rosiglitazon 7,5 μ M	1747,7	2582,7	967,5	5091,2	3503,9
SD	327,5	920,4	158,6	1763,6	1673,4
SEM	163,74	460,19	79,28	881,81	836,7
Signifikant	1,73	3,96	2,1	-	-
Rosiglitazon 10,0 μ M	1318,7	2650,5	717,8	6901,8	3785,1
SD	136,2	474,0	84,5	543,8	665,6
SEM	68,1	237	42,23	271,88	332,78
Signifikant	-	4,06	1,56	1,42	-
Rosiglitazon 50,0 μ M	1093,1	2284,7	669,2	6168,9	3365,5
SD	233,0	1056,5	66,0	1307,3	415,8
SEM	116,5	528,3	33,0	653,7	207,9
Signifikant	-	3,5	1,45	-	-

Tab.13 zu Abb.19 Thymidineinbau in Schweinethyreozyten in dpm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um mehr als das 1,4-fache oder um weniger als das 0,7-fache von der Inkorporationsrate der Kontrolle abweicht.

Zeit (Stunden)	2 h	16 h	40 h	64 h	88 h
Stimulation					
Kontrolle	2309,1	2698,0	781,0	4317,2	3097,0
SD	50,9	1334,4	77,5	1060,6	502,5
SEM	25,44	667,19	38,76	530,3	251,25
TSH 1,3 mU/ml	1888,6	3461,6	805,4	4406,3	2632,3
SD	444,8	378,4	146,1	463,3	433,2
SEM	222,4	189,21	73,07	231,67	216,59
Signifikant	-	-	-	-	-
Kontrolle mit DMSO	1751,5	3349,6	489,4	5667,2	3038,5
SD	201,3	647,5	200,6	268,2	573,9
SEM	100,67	323,76	100,3	134,11	286,94
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 7,5 μ M	2579,0	1235,7	2967,0	4756,3	2406,9
SD	856,7	228,2	1153,7	813,9	1253,7
SEM	428,35	114,09	576,86	406,96	626,83
Signifikant	-	0,5	3,8	-	-
Rosiglitazon 10,0 μ M	1883,2	457,0	2527,1	3494,8	2811,3
SD	233,1	141,1	417,6	1560,9	351,6
SEM	116,56	70,56	208,81	780,47	175,8
Signifikant	-	0,2	3,24	-	-
Rosiglitazon 50,0 μ M	1789,4	336,8	2646,1	3804,7	2646,6
SD	189,7	205,1	793,1	1463,9	256,8
SEM	94,9	102,6	396,5	731,9	128,4
Signifikant	-	0,1	3,39	-	-

Tab.14 zu Abb.20 Thymidineinbau in Schweinethyreozyten in dpm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um mehr als das 1,4-fache oder um weniger als das 0,7-fache von der Inkorporationsrate der Kontrolle abweicht.

Zeit (Stunden)	2 h	16 h	40 h	64 h	88 h
Stimulation					
Kontrolle	2283,4	386,4	2823,8	4282,9	3656,1
SD	101,9	42,1	694,4	1361,4	801,1
SEM	50,96	21,07	347,22	680,72	400,56
TSH 1,3 mU/ml	2030,5	355,9	2556,8	4383,6	4789,9
SD	330,2	98,3	460,2	379,9	628,2
SEM	165,08	49,16	230,08	189,95	314,09
Signifikant	-	-	-	-	-
Kontrolle mit DMSO	1838,6	315,5	2458,3	4437,1	4375,9
SD	521,3	151,4	278,5	140,2	1727,5
SEM	260,65	75,71	139,26	70,09	863,73
Signifikant	-	-	-	-	-
Rosiglitazon 7,5 μ M	2279,5	691,1	3355,8	6739,3	4766,4
SD	267,8	167,9	407,7	297,5	2201,7
SEM	133,91	83,95	203,84	148,73	1100,87
Signifikant	-	1,79	-	1,57	-
Rosiglitazon 10,0 μ M	1709,2	555,5	2522,7	5454,7	5769,2
SD	302,0	316,4	594,7	483,4	819,2
SEM	151,01	158,18	297,35	241,71	409,6
Signifikant	-	-	-	-	1,58
Rosiglitazon 50,0 μ M	1646,1	537,1	2369,5	4281,7	4680,3
SD	221,9	132,9	254,6	211,9	792,4
SEM	110,9	66,5	127,3	105,9	396,2
Signifikant	0,7	-	-	-	-

Tab.15 zu Abb.24 2-Deoxy-D-[1-³H]Glucoseeinbau in humane karzinogene Thyreozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle signifikante Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Wenn die Einbauraten um mehr als das 1,4-fache von Glucoseeinbau in die Kontroll-Thyreozyten abweichen, so sind die Werte signifikant.

Zeit (Stunden)	1/2	1	2
Stimulation			
Kontrolle	1284,7	8837,5	1972,6
SD	591,9	2198,3	823,1
SEM	209,3	777,2	291,0
Rosiglitazon 1µM	1594,2	9776,0	1922,0
SD	596,9	601,7	141,8
SEM	298,45	300,83	70,89
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 2,5µM	1781,1	7496,3	1836,0
SD	352,2	1604,7	324,9
SEM	176,1	802,34	162,43
Signifikant	1,4	-	-
Rosiglitazon 5µM	755,8	6723,5	1330,0
SD	289,9	2505,9	252,3
SEM	144,97	1252,93	126,13
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 10µM	767,2	5579,2	1440,9
SD	423,8	1448,1	488,5
SEM	211,92	724,05	244,23
Signifikant	-	-	-

Tab.16 zu Abb.25 ¹²⁵I-Iodaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten in cpm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle signifikante Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Wenn die Einbauraten um mehr als das 1,4-

fache von Glucoseeinbau in die Kontroll-Thyreozyten abweichen, so sind die Werte signifikant.

Zeit (Stunden) Stimulation	1\2	1	2
Kontrolle	530,4	486,1	409,4
SD	220,1	195,4	211,9
SEM	77,8	69,1	74,9
Rosiglitazon 1µM	487,8	329,0	488,9
SD	99,1	23,6	100,1
SEM	49,55	11,78	50,03
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 2,5µM	453,6	295,4	628,8
SD	78,9	38,6	126,5
SEM	39,43	19,32	63,24
Signifikant	-	-	1,54
Rosiglitazon 5µM	269,4	255,8	222,7
SD	67,5	25,6	104,9
SEM	33,73	12,82	52,44
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 10µM	270,5	250,0	302,7
SD	69,1	73,0	82,7
SEM	34,57	36,49	41,34
Signifikant	-	-	-

Tab.17 zu Abb.26 ³H-Thymidineinbau in humane karzinogene Thyreozyten in dpm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=4. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um mehr als das 1,4-fache oder um weniger als das 0,7-fache von der Inkorporationsrate der Kontrolle abweicht.

Zeit (Stunden) Stimulation	1\2	1	2
Kontrolle	3076,94	4268,78	2002,01
SD	1249,6	2755,4	845,0

SEM	441,8	974,2	298,8
Rosiglitazon 1µM	2740,7	2348,3	2261,5
SD	487,7	250,6	361,3
SEM	243,86	125,31	180,67
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 2,5µM	2852,9	1988,1	2599,4
SD	825,3	321,0	474,8
SEM	412,67	160,51	237,38
Signifikant	-	0,5	-
Rosiglitazon 5µM	1545,8	1815,5	1480,3
SD	319,6	300,7	370,5
SEM	159,8	150,34	185,25
Signifikant	0,5	0,4	-
Rosiglitazon 10µM	1745,9	1885,5	1727,7
SD	303,0	276,2	146,1
SEM	151,52	138,11	73,02
Signifikant	0,6	0,4	-

Tab.18 zu Abb.27 2-Deoxy-D-[1-³H]Glucoseeinbau in humane karzinogene Thyreozyten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=8. Außerdem zeigt die Tabelle signifikante Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Wenn die Einbauraten um mehr als das 1,4-fache von Glucoseeinbau in die Kontroll-Thyreozyten abweichen, so sind die Werte signifikant.

Zeit (Stunden)	1\2	1	2
Stimulation			
Kontrolle	1467,3	1623,7	871,3
SD	937,0	563,8	302,2
SEM	331,3	199,3	106,8
Rosiglitazon 1µM	1800,5	1736,6	917,0
SD	371,3	691,6	87,3
SEM	185,67	345,82	43,63
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 2,5µM	1621,2	796,8	1109,6
SD	264,9	98,8	172,0
SEM	132,45	49,39	85,99
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 5µM	1166,4	843,7	933,5

SD	406,0	330,4	342,1
SEM	203,02	165,22	171,06
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 10µM	860,5	594,2	1004,6
SD	369,2	160,0	276,5
SEM	184,58	80,02	138,26
Signifikant	-	-	-

Tab.19 zu Abb.28 ¹²⁵I-Iodaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten in cpm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=8. Außerdem zeigt die Tabelle signifikante Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Wenn die Einbausraten um mehr als das 1,4-fache von Glucoseeinbau in die Kontroll-Thyreozyten abweichen, so sind die Werte signifikant.

Zeit (Stunden)	1\2	1	2
Stimulation			
Kontrolle	231,2	232,4	261,4
SD	118,1	120,9	168,7
SEM	41,8	42,8	59,6
Rosiglitazon1µM	208,0	278,2	284,9
SD	51,5	56,8	45,7
SEM	25,76	28,4	22,87
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 2,5µM	231,5	180,6	256,0
SD	40,9	12,1	66,4
SEM	20,46	6,03	33,22
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 5µM	134,6	149,2	246,1
SD	74,3	30,9	42,7
SEM	37,17	15,43	21,33
Signifikant	-	-	-
Rosiglitazon 10µM	145,3	127,0	209,1
SD	72,0	36,6	55,0
SEM	36,01	18,3	27,5
Signifikant	-	-	-

Tab.20 zu Abb.29 ³H-Thymidineinbau in humane karzinogene Thyreozyten in dpm. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen pro Kulturloch, die Standardabweichungen und die Standardfehler des Mittelwertes, n=8. Außerdem zeigt die Tabelle die signifikanten Unterschiede (p<0,05) zur Kontrolle (=Thyreozyten ohne Stimulation). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle liegen vor, wenn die Thymidinaufnahme um mehr als das 1,4-fache oder um weniger als das 0,7-fache von der Inkorporationsrate der Kontrolle abweicht.

Zeit (Stunden)	1\2	1	2
Stimulation			
Kontrolle	1505,19	2257,44	4541,61
SD	577,3	1376,7	2745,3
SEM	204,1	486,7	970,6
Rosiglitazon 1µM	2233,6	3634,8	6894,6
SD	526,0	384,3	2642,6
SEM	263	192,13	1321,31
Signifikant	1,48	1,61	1,52
Rosiglitazon 2,5µM	3171,1	3048,7	11629,0
SD	2025,3	1196,3	4788,2
SEM	1012,65	598,16	2394,1
Signifikant	2,11	-	2,56
Rosiglitazon 5µM	1624,0	2833,2	9996,2
SD	617,2	1729,2	6836,3
SEM	308,6	864,58	3418,16
Signifikant	-	-	2,2
Rosiglitazon 10µM	1815,3	3401,0	12998,7
SD	239,1	1239,1	4127,7
SEM	119,53	619,55	2063,83
Signifikant	-	1,51	2,86

7.2 Diagramme der Mittelwerte der Ergebnisse und SEM aus den Abbildungen normiert auf die Kontrolle

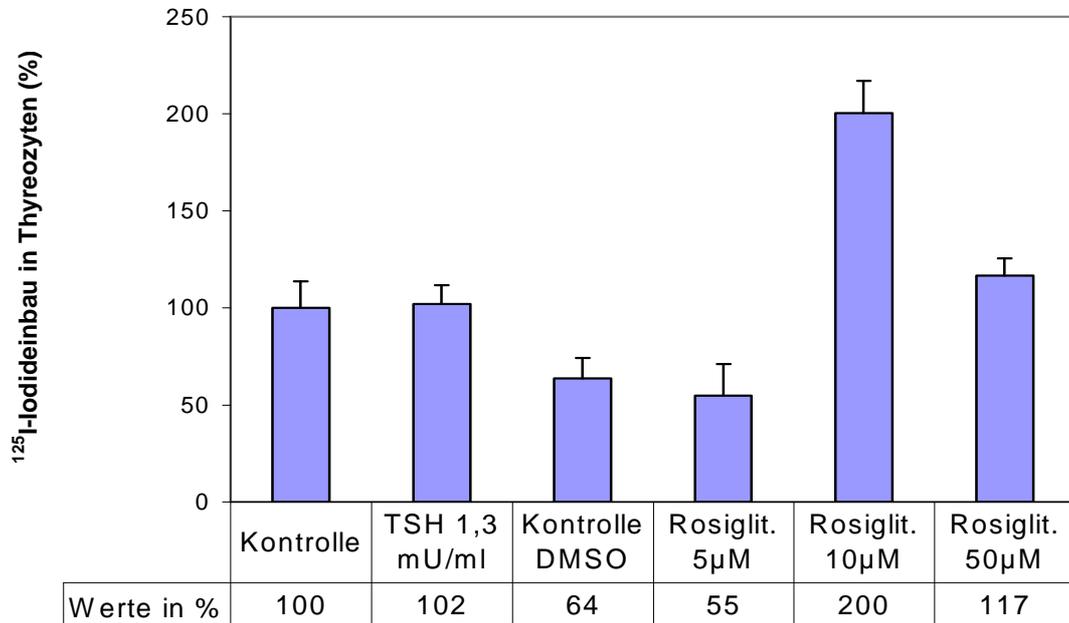


Abb.7a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.7 normiert auf die Kontrolle

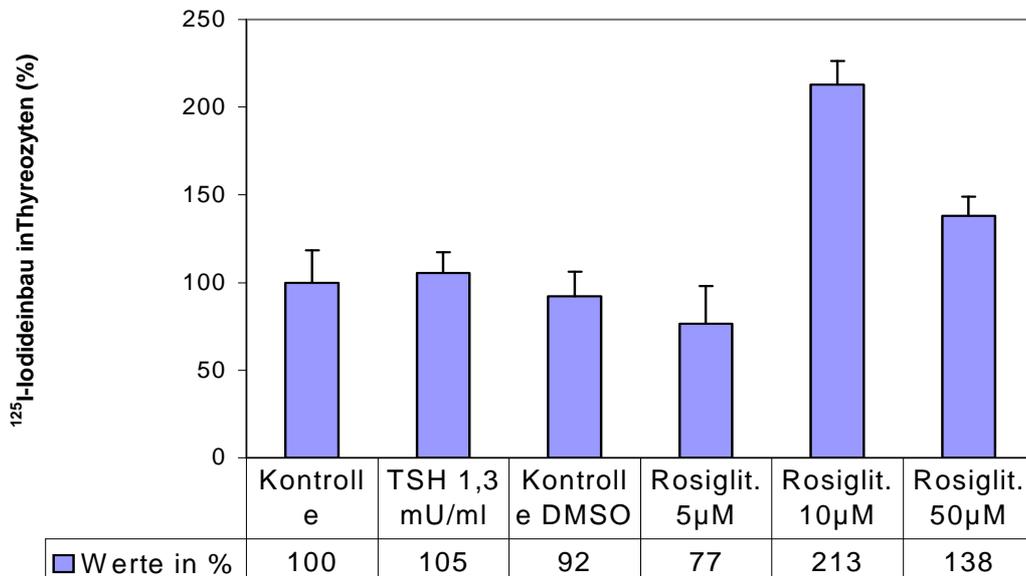


Abb.8a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.8 normiert auf die Kontrolle

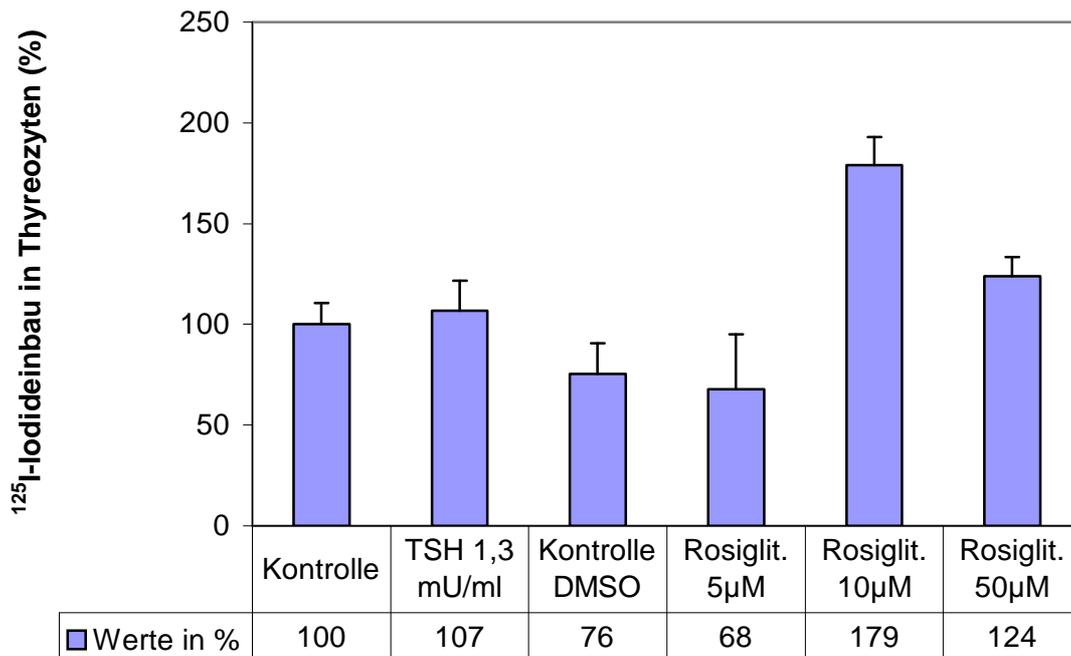


Abb.9a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.9 normiert auf die Kontrolle

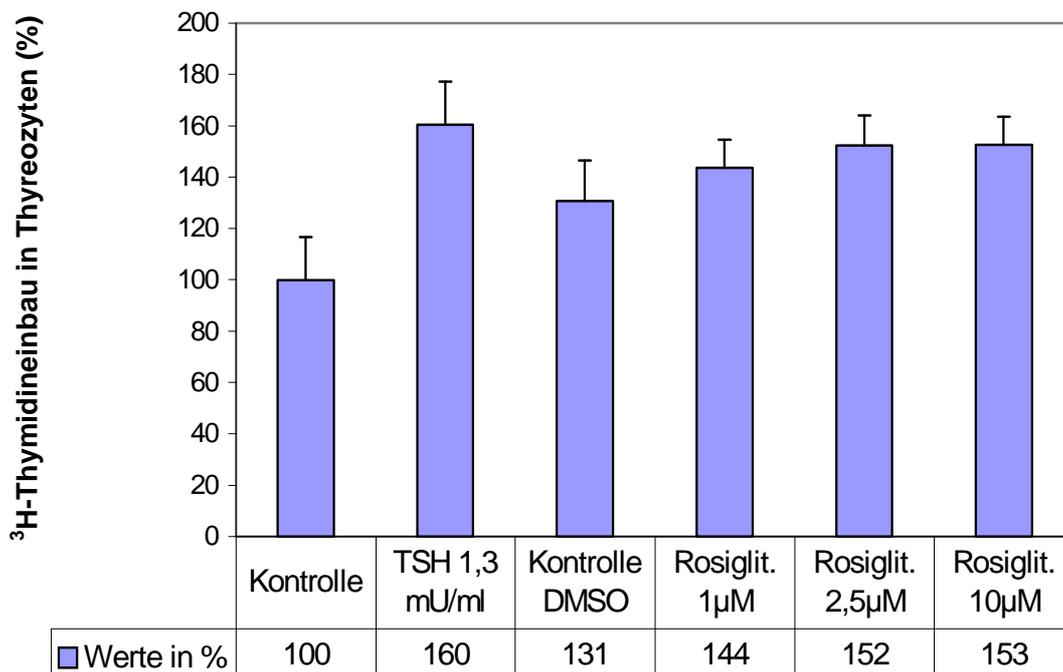


Abb.10a: Mittelwerte/SEM der Ergebnisse aus Abb.10 normiert auf die Kontrolle

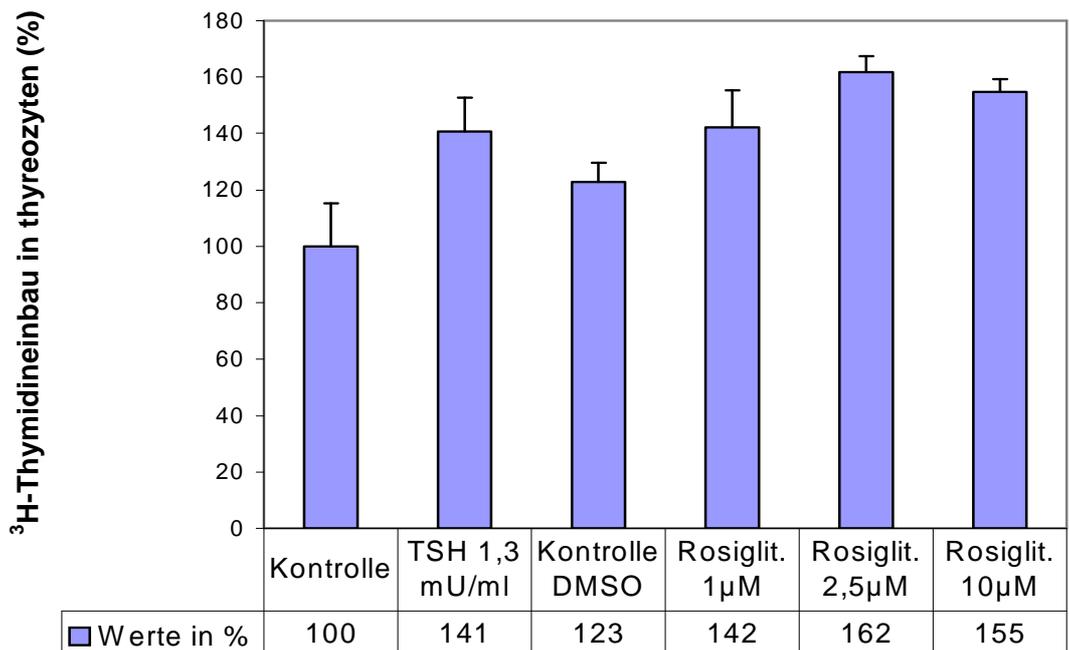


Abb.11a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.11 normiert auf die Kontrolle

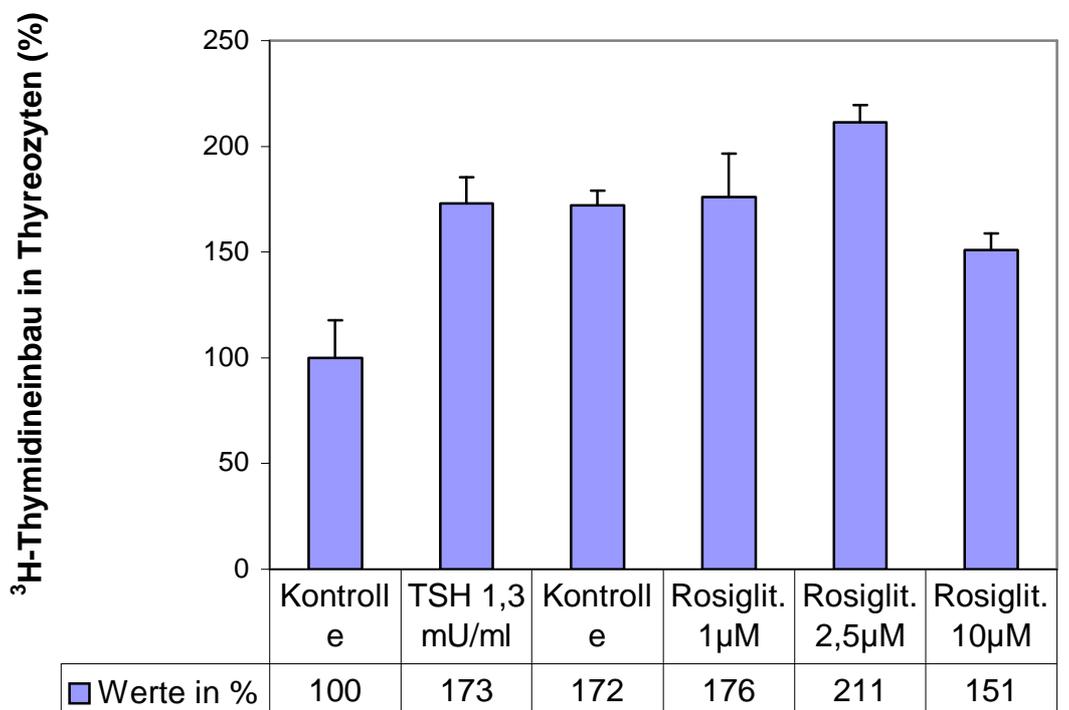


Abb.12a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.12 normiert auf die Kontrolle

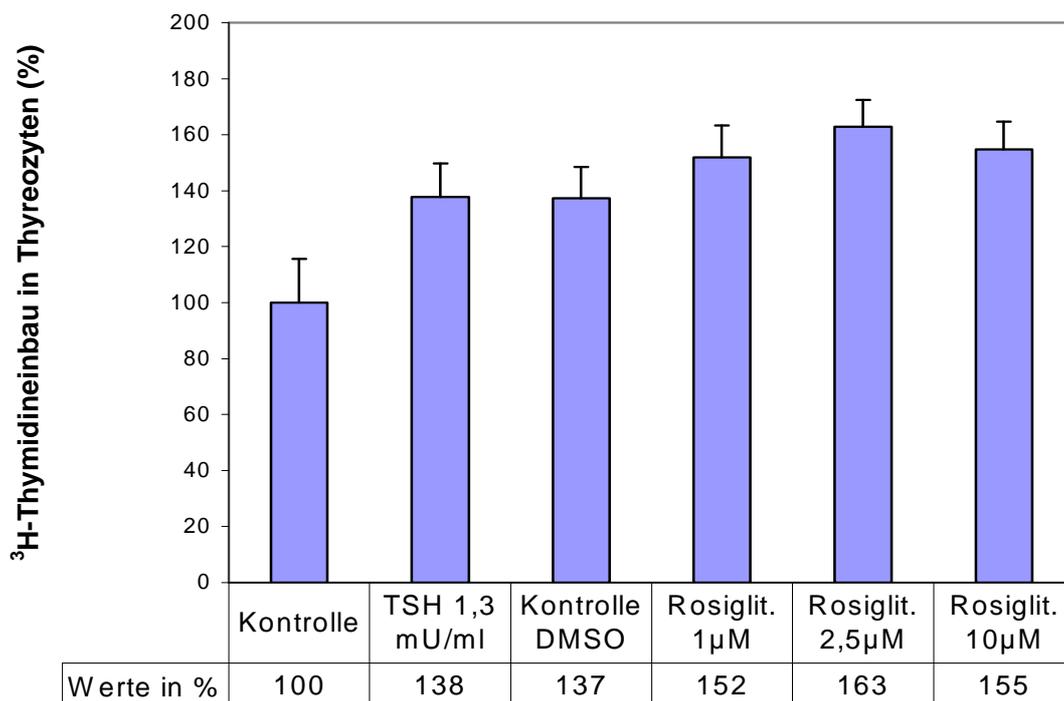


Abb.13a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.13 normiert auf die Kontrolle

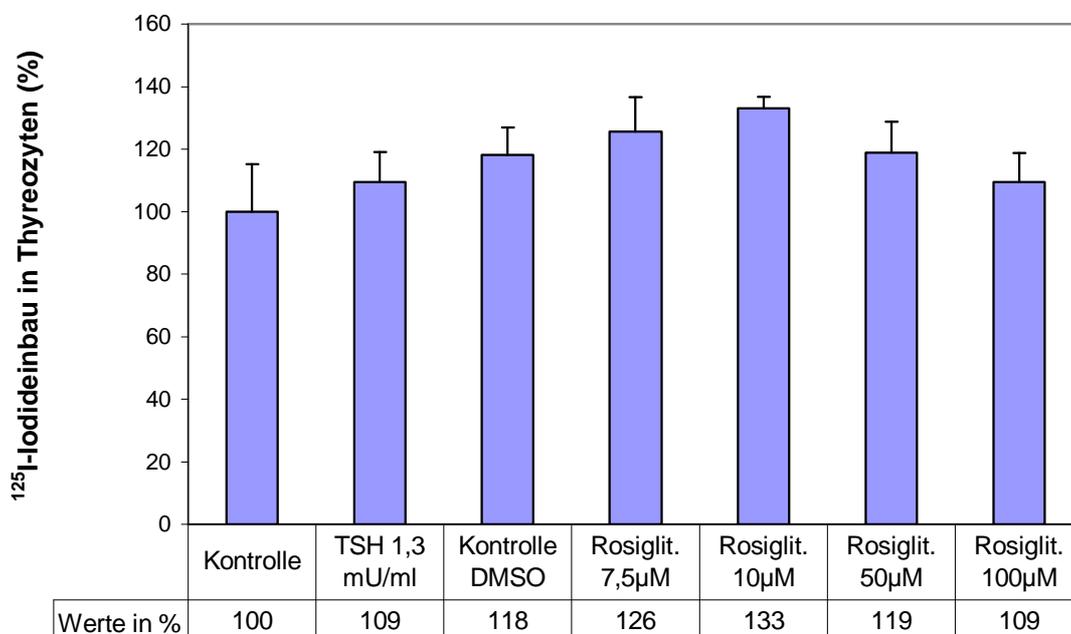


Abb.14a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.14 normiert auf die Kontrolle

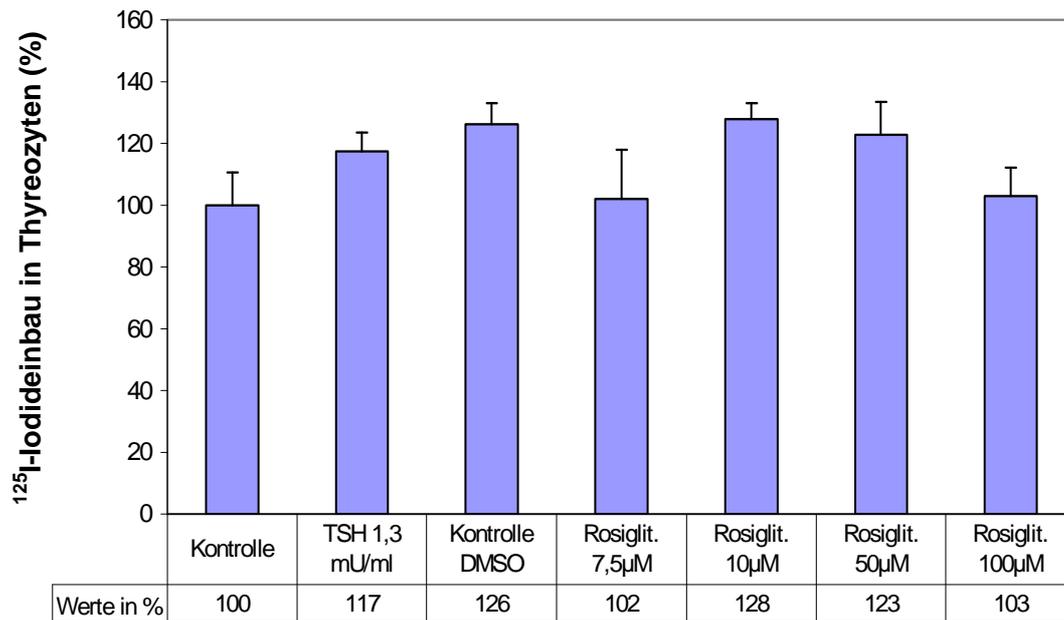


Abb.15a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.15 normiert auf die Kontrolle

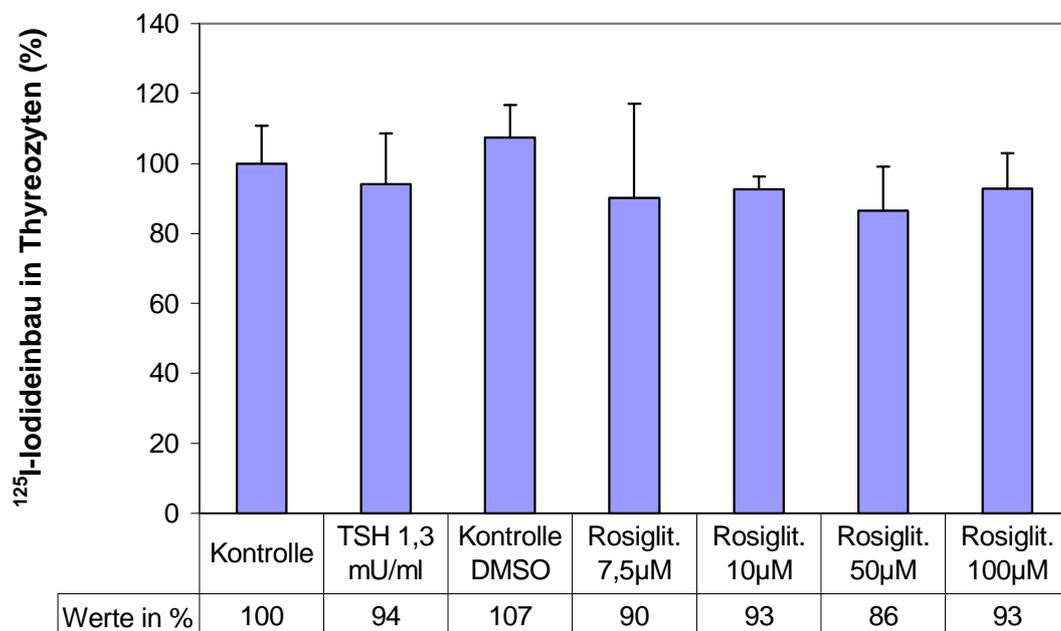


Abb.16a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.16 normiert auf die Kontrolle

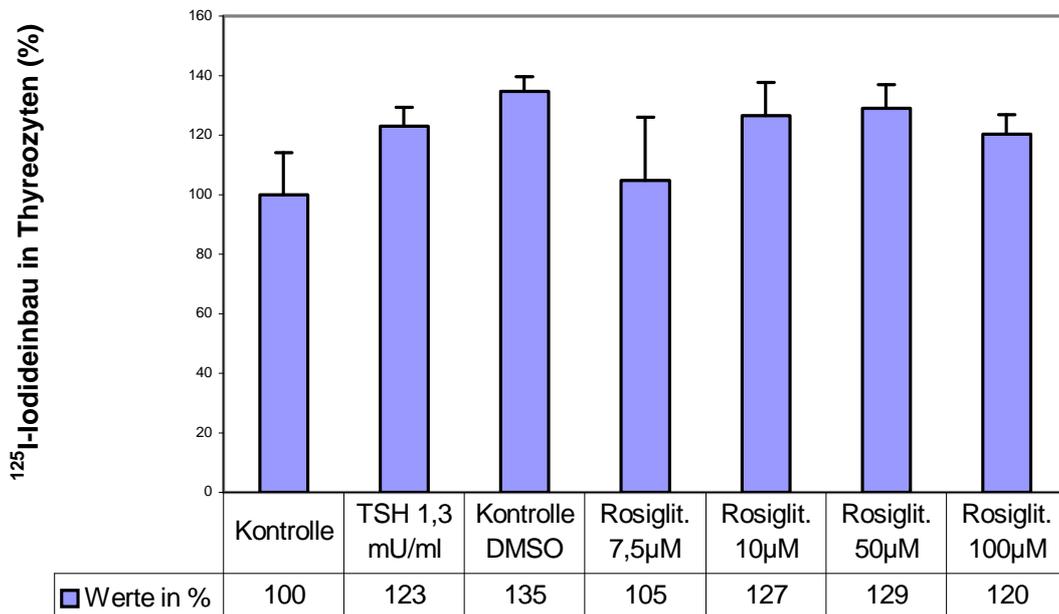


Abb.17a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb.17 normiert auf die Kontrolle

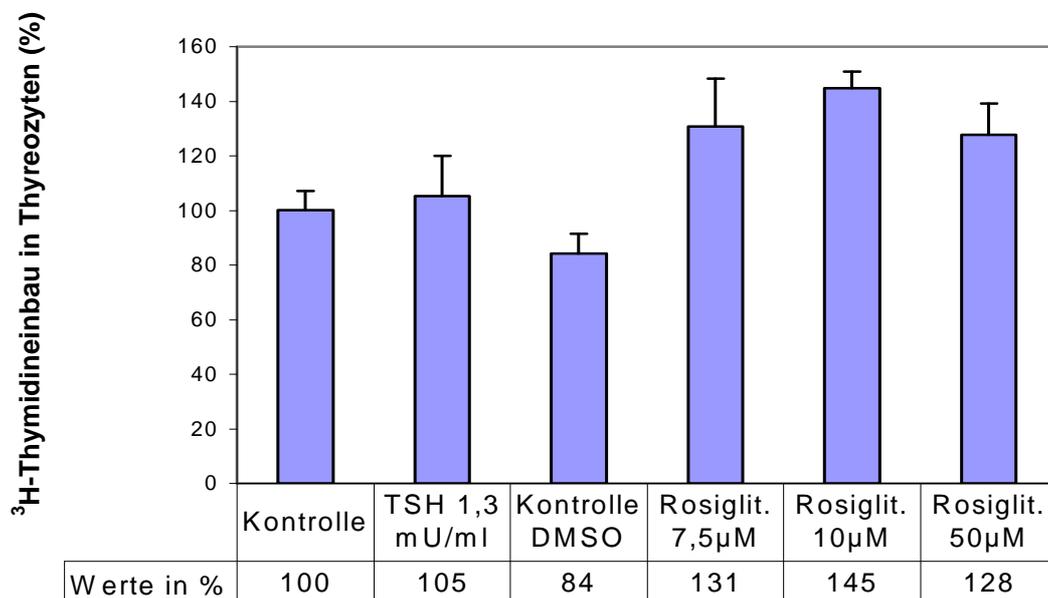


Abb.18a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 18 normiert auf die Kontrolle

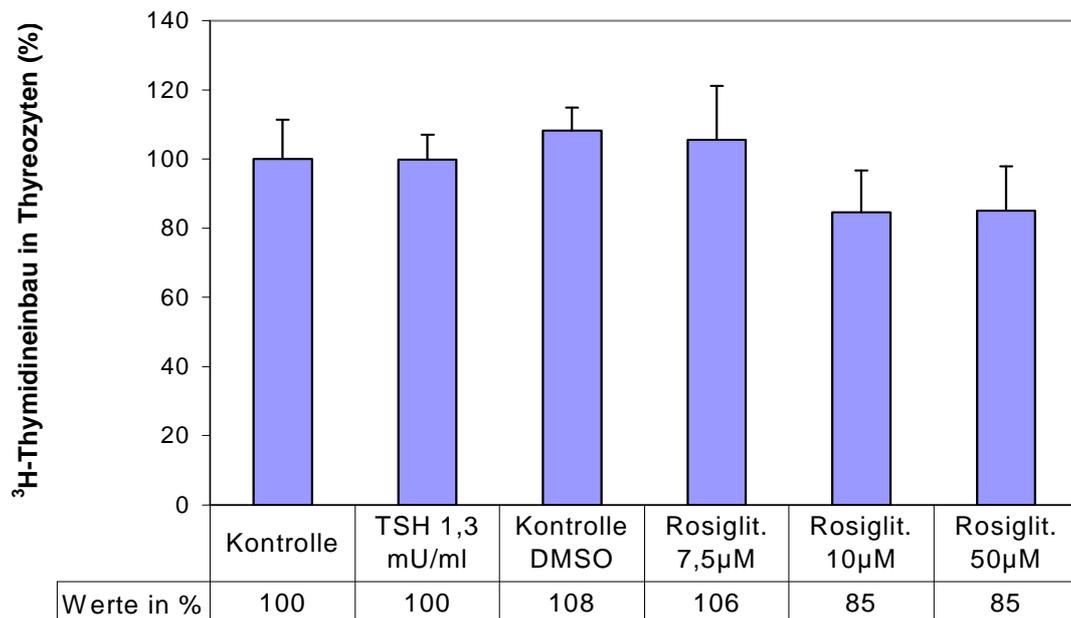


Abb.19a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 19 normiert auf die Kontrolle

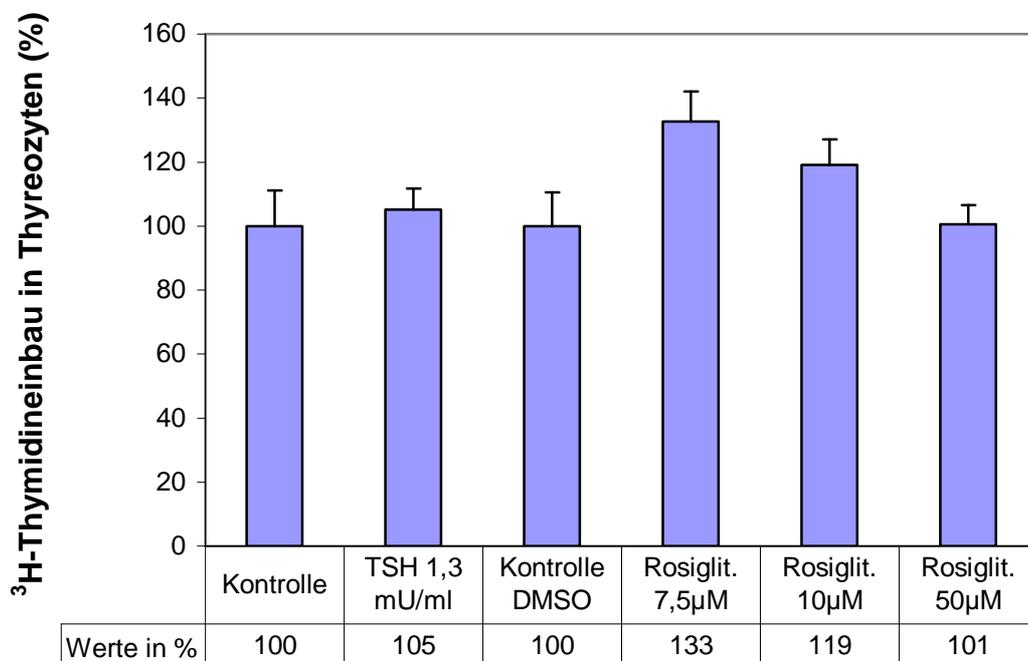


Abb. 20a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 20 normiert auf die Kontrolle

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Herrn Prof. Dr. Wahl danke ich für die freundliche Überlassung dieses Themas, für seine intensive Unterstützung und Betreuung bei dieser Arbeit sowie die Mithilfe bei der Beurteilung der experimentellen Ergebnisse. Herr Prof. Wahl stand mir immer mit gutem Rat und kritischer Anmerkung zur Seite.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau PD Dr. Eleonore Fröhlich und Frau Elke Maier für die Mithilfe und Beratung zur Darstellung der NIS-Rezeptoren herzlich bedanken.

Für die statistische Beratung gebührt mein Dank Herrn Dr. Eichner vom biopmetrischen Institut.

Lebenslauf

Name: Rhea Angeliki Piel

geboren am: 20.02.1979 in Stuttgart

Nationalität: deutsch

Eltern: Prof. Roland Piel, Architekt Dipl. Ing.
Agapi Piel-Stefanaki, Dipl. Agr. Ing.

Schulbildung:	1989-1991	Eberhard-Ludwig-Gymnasium, Stuttgart
	1991-1994	Deutsche Schule, Moskau
	1994-1998	Hölderlin Gymnasium, Stuttgart
	Juni 1998	Abitur

Studium (Zahnmedizin):

10/1998	Universität Tübingen
10/1999	Vorphysikum
4/2001	Physikum
16.06.2004	Staatsexamen