

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring

**Einfluss von Velcade®, Rapamycin, Dithiothreitol und
Arsentrioxid auf Proliferation, Apoptose und
Iodidstoffwechsel bei den Schilddrüsenkarzinom-
Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1**

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnheilkunde

der

Medizinischen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Renate Schmidt, geb. Bleicher

aus Duschanbe / Tadschikistan

2010

Dekan: Professor Dr. Ingo B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wahl

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. E. Fröhlich

Meiner Familie gewidmet

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	-Abbildung
APS	-Ammoniumpersulfat
ATO	-Arsentrioxid
As	-Arsen
Bq	-Becquerel, 1 Zerfall pro Sekunde
kBq	-Kilo-Becquel
CPM	-counts per minute
DPM	-desintegrations per minute
DMSO	-Dimethyl-Sulfoxid
DTT	-Dithiothreitol
ECL	-Enhanced Chemiluminescence
FACS	-Fluorescence activated cell sorter
FKS	-fetales Kälberserum
EGF	-epidermal growth factor
EtOH	-Ethanol
Excel	-Statistikprogramm von Microsoft
g	-Gravitation, Erdbeschleunigung
g	-Gramm, 10^{-3} Kilogramm
mg	-Milligramm, 10^{-6} Kilogramm
μ g	-Mikrogramm, 10^{-9} Kilogramm
h	-Stunde
HMW	-high molecular weight marker
M	-Mol
mmol	-Millimol, 10^{-3} Mol
l	-Liter
ml	-Milliliter
μ l	-Mikroliter
min	-Minuten
n	-Anzahl der Proben

NIS	-Natrium-Iodid-Symporter
p	-statistische Wahrscheinlichkeit
PI	-Propidiumiodid
PBS	-phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PDS	-Pendrin
PMSF	-Phenylmethylsulfonylfluorid
Rap	-Rapamycin
s	-Sekunde
SD	-Standardabweichung
SEM	-Standard Error of the mean, mittlerer Fehlerwert des Mittelwertes
Tab.	-Tabelle
TBS	-Tris-buffered saline, trisgepufferte Salzlösung
Temed	-Tetramethylethylendiamin
U	-Unit
mU	-Milliunit, 10^{-3} Unit
u.a.	-und andere
Vel	-Velcade® (Bortezomib)
Vol%	-Volumen-Prozent

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	9
2. Material	17
2.1 Untersuchungsmaterial	17
2.2 Geräte für die Zellkultivierung	17
2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität	18
2.4 Medien und Reagenzien	19
3. Methoden	22
3.1 Zellzählung	22
3.2 Kultivierung der malignen humanen Thyreozyten	22
3.3 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellkulturen	24
3.4 Passagierung der Zellkulturen	25
3.5 Stimulation der Zellkulturen	25
3.6 Zellernte	27
3.7 Messung der Radioaktivität	28
3.8 Immunhistochemischer Nachweis von NIS mittels Westernblot	28
3.8.1 Proteinbestimmung	28
3.8.2 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)	29
3.8.3 Transfer von Proteinen auf Blotmembran mittels Westernblot-Methode	33
3.8.4 Immunreaktion	34
3.9 Immunzytochemische Darstellung von NIS und Pendrin	35
3.10 Mykoplasmenachweis	36
3.11 Facsanalyse	37
3.12 Statistische Auswertung	38
4. Ergebnisse	40
4.1 CGTH-W-1 Zelllinie	40
4.1.1 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen	40
4.1.1.1 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Velcade®	40
4.1.1.2 ¹²⁵ I- Iodidaufnahme unter Rapamycin	41
4.1.1.3 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination	42
4.1.2 ³ H-Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen	43
4.1.2.1 ³ H-Thymidinaufnahme unter Velcade®	44

4.1.2.2	³ H-Thymidinaufnahme unter Rapamycin	45
4.1.2.3	³ H-Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination	46
4.1.3	Immuncytochemischer Nachweis der Wirkung von potentiellen Redifferenzierungssubstanzen auf die NIS- und die Pendrinexpression der Zelllinie CGTH-W-1	47
4.1.3.1	Photographische Darstellung	49
4.1.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4.1.4	Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin in den cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mittels Westernblot	50
4.1.4.1	Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mit Velcade®	51
4.1.4.2	Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mit Rapamycin	52
4.1.4.3	Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mit DTT und Arsentrioxid sowie mit deren Kombination	53
4.1.5	Beeinflussung der Apoptoserate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene potentielle Differenzierungssubstanzen	54
4.1.5.1	Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Velcade®	54
4.1.5.2	Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Rapamycin	56
4.1.5.3	Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit DTT und Arsentrioxid sowie nach deren Kombination	58
4.2	ONCO-DG-1 Zelllinie	60
4.2.1	¹²⁵ I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen	60
4.2.1.1	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Velcade®	60
4.2.1.2	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Rapamycin	61
4.2.1.3	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination	61
4.2.2	³ H-Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen	63
4.2.2.1	³ H-Thymidinaufnahme unter Velcade®	63
4.2.2.2	³ H-Thymidinaufnahme unter Rapamycin	64
4.2.2.3	³ H-Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination	65
4.2.3	Immuncytochemischer Nachweis der Wirkung von potentiellen Redifferenzierungssubstanzen auf die NIS- und die Pendrin-Expression der Zelllinie ONCO-DG-1	66
4.2.3.1	Photographische Darstellung	67
4.2.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	67

4.2.4	Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin in den cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mittels Westernblot	68
4.2.4.1	Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mit Velcade®	68
4.2.4.2	Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mit Rapamycin	69
4.2.4.3	Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mit DTT und DTT plus Arsentrioxid	70
4.2.5	Beeinflussung der Apoptoserate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene potentielle Differenzierungssubstanzen	71
4.2.5.1	Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Velcade®	71
4.2.5.2	Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Rapamycin	72
4.2.5.3	Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit DTT und Arsentrioxid sowie nach deren Kombination	74
4.3	Abschließende Bewertung der untersuchten Substanzen	76
5.	Diskussion	78
5.1	Wirkung von Velcade® auf Apoptose, Proliferation und Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1	80
5.2	Wirkung von Rapamycin auf Apoptose, Proliferation und Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1	81
5.3	Wirkung von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination auf Apoptose, Proliferation und Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1	82
6.	Zusammenfassung	85
7.	Anhang	88
8.	Literatur	122
9.	Danksagung	129

1. Einleitung

Zu den häufigsten endokrinologischen Erkrankungen in Deutschland zählt die die endemische Struma. Der Grund dafür liegt in der Tatsache, dass besonders in Mittel- und Süddeutschland lange Zeit ein schwerer Jodmangel herrschte. Aus epidemiologischer Sicht befindet sich Deutschland derzeit im Übergang von einem Jodmangelgebiet hin zu einer Region mit ausreichender Jodversorgung (Thamm M. et al. 2007). Nach den Ergebnissen der Papillon Studie aus dem Jahr 2007 finden sich bei jedem Dritten erwachsenen Deutschen bei der sonographischen Untersuchung krankhafte Veränderungen im Sinne einer Struma diffusa oder Struma nodosa (Reiners C. et al. 2004). Weitere Risikofaktoren für eine Strumaentstehung sind neben Jodmangel auch Selenmangel, Rauchen, das weibliche Geschlecht, sowie die genetische Prädisposition (Mann K. 2008).

Im Laufe der Strumabildung, die vor allem auf einer Follikelvermehrung beruht, nimmt auch die Gesamtzahl der funktionell autonomen Thyreozyten und Follikel stetig zu. Diese Follikel sind disseminiert, in der ganzen Schilddrüse verstreut oder in kleineren und größeren Gruppen assoziiert. Die funktionelle Autonomie der Struma manifestiert sich szintigraphisch entweder als so genannte multifokale oder als fokale Autonomie, wobei es sich bei letzterer entweder um Pseudoadenome bei regionaler Ansammlung autonomer Thyreozyten oder aber um echte Adenome handelt (Berghout A. et al. 1990) .

Lange Zeit wurde die Strumaentstehung, die mit möglichen malignen Entartungen einhergehen kann, auf den feed-back-Mechanismus zwischen Schilddrüse und übergeordneten Zentren zurückgeführt. Danach sollte als Reaktion auf den Iodmangel die verminderte Schilddrüsen-Hormonproduktion über eine verstärkte Ausschüttung von TSH zu einer Struma führen. Nach heutigen Erkenntnissen zur Pathogenese der Iodmangelstruma und ihren Folgeerkrankungen, zu denen auch die verschiedenen Schilddrüsenmalignome gehören, scheint TSH eher für die Differenzierung und Regulation der zellulären Funktion verantwortlich zu sein. Für die Proliferation jedoch sind

wachstumsfördernde Faktoren wie insulin-like growth factor I (IGF I) (Jockenhövel, 1993; Gärtner, 1992) und insbesondere bei Malignomen auch der epidermal growth factor (EGF) verantwortlich (Glogowska A. et al. 2008).

Parakrin können diese Faktoren auch auf das Strumagewebe einwirken. Die autokrine IGF1-Bildung der Schilddrüsenzellen kann durch Iod dosisabhängig vermindert oder sogar ganz blockiert werden (Hofbauer LC. et al. 1995).

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 N. 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 and Mortimer 2004). Des Weiteren gibt es undifferenzierte (anaplastische) Schilddrüsenkarzinome, medulläre Schilddrüsenkarzinome (C-Zell-Karzinome) und seltene Malignome der Schilddrüse wie das maligne Lymphom oder das Sarkom sowie Metastasen extrathyreoidaler Tumoren. Das differenzierte Schilddrüsenkarzinom ist auch als seltene Ursache einer Schilddrüsenüberfunktion beschrieben worden (Brauckhoff M. et al. 2001).

Fast alle Schilddrüsentumoren haben die Fähigkeit Iod aufzunehmen mehr oder weniger ausgeprägt verloren, jedoch benötigt die Schilddrüse dieses Spurenelement, um Thyroxin und Trijodthyronin zu produzieren. Schilddrüsenhormone haben einen tief greifenden Einfluss auf Organentwicklung und Energiestoffwechsel im Menschen. Es gibt praktisch kein Organ und keinen Stoffwechselweg, der nicht durch Hypo- oder Hyperthyreose beeinträchtigt ist. Die euthyreote Stoffwechsellage ist ein wichtiges Stück Lebensqualität (Weitzel et al. 2003).

Für den Transport von Iodid in die Schilddrüse ist ein Natrium-Iodid-Kotransporter verantwortlich. Dieser „Natrium-Iodid-Symporter“ (NIS) transportiert unter ATP-Verbrauch zwei Na^+ - Ionen und ein I^- - Ion in die Schilddrüse. Der zur Familie der natriumabhängigen Transportmoleküle zählende NIS ist ein integrales Membranprotein mit 13

Transmembrandomänen, dessen Aminoterminus extrazellulär und dessen Carboxyterminus intrazellulär liegen (Smanik PA. et al. 1997; De L. et al. 2000). Das NIS-Protein hat die Aufgabe, der Schilddrüse Iodid für die Hormonsynthese bereitzustellen. Gegenüber dem Blut wird es dort um den Faktor 20 – 40 angereichert. Die treibende Kraft hierfür ist ein Na^+ - Gradient, welcher ins Zellinnere gerichtet ist. Die Iodidaufnahme durch den Natrium-Iodid-Symporter lässt sich auch kompetitiv durch verschiedene Anionen wie zum Beispiel Perchlorat hemmen (Schmutzler C. and Kohrle I. 1998; Lawrence IE. et al. 2000). Maligne transformierte Thyreozyten können nicht mehr genügend Iodid aufnehmen. Grund dafür ist eine mangelhafte Expression eines funktionsfähigen NIS oder der fehlende Transport des NIS aus dem Zytosol zur Zellmembran. Dies hat auch Konsequenzen für eine Radioiodtherapie, die als effektives therapeutisches Mittel bei maligne entarteten Schilddrüsen gilt. 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 Schilddrüsengewebe 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 (Schmutzler C. and Kohrle I. 1998). Eine optimale ^{131}I -Iodinkorporation kann die Ausschaltung von Restschilddrüsengewebe 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 (Kumar A. and Bal CS. 2003).

Die durch NIS vermittelte Anhäufung von Iodid in den Thyreozyten ist eine entscheidende Voraussetzung für den Erfolg der Radioiodtherapie von gut- und bösartigen Schilddrüsenerkrankungen (Spitzweg C. and Morris IC. 2002). Im papillären Schilddrüsenkarzinom wurde zwar eine gesteigerte NIS-Expression, jedoch keine gesteigerte Iodidaufnahme entdeckt. Grund dafür könnte ein Defekt des NIS-Gens sein.

Für die Hormonproduktion muss das Iodid in das Follikellumen mittels des apikalen Iodidtransporters Pendrin transportiert werden. Dieser gehört zu der Gruppe der Chlorid- Iodid- Transporter (Scott et al. 1999; Bidart IM. et al. 2000) und benötigt im Gegensatz zum NIS keine weitere Energiequelle (Wolff I. 2005). Des Weiteren wurde von Rodriguez et al. ein zweiter apikaler Iodidtransporter (AIT) identifiziert, der ebenfalls einen passiven Iodidtransport in das Kolloid ermöglicht (Rodriguez AM. et al. 2002).

Es wäre somit von großem therapeutischem Interesse, die Iodinkorporation in maligne transformierte Thyreozyten wiederherzustellen, damit diese für eine Radioiodtherapie zugänglich würden. Aus diesem Grund wird versucht, entdifferenzierte maligne Zellen mit verschiedenen Substanzen zu einer Redifferenzierung anzuregen. Zu solchen Redifferenzierungssubstanzen gehören Retinol (Vitamin A) und seine Derivate. Sie regulieren wichtige Stoffwechsel- und Entwicklungsprozesse und haben daher auch großen Einfluss auf entdifferenzierte Gewebe. Ihr Einfluss auf die Genregulation und die Redifferenzierung des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) von Schilddrüsenmalignomzellen wurde mehrfach nachgewiesen (Schmutzler C. 2001; Simon D. et al. 2002). Ihre günstige Wirkung bei der Therapie von differenzierten Schilddrüsenmalignomen beruht auch auf der Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod, durch den die Möglichkeit besteht, gezielt Zellen absterben zu lassen (Iwata et al.1992; Nagy et al. 1995; Zhang et al. 1995b).

Ziel dieser Arbeit ist es den potentiell redifferenzierenden Einfluss folgender Substanzen zu untersuchen: Velcade®, Rapamycin und Arsentrioxid in Kombination mit DTT.

Velcade® mit dem Wirkstoff Bortezomib ist seit April 2004 zur Rezidivtherapie für Patienten mit Multiplen Myelom zugelassen. Es zeigte sich im Vergleich zu dem sonst üblichen hochdosierten Dexamethason ein signifikanter Überlebensvorteil für die mit diesem Proteasom-Inhibitor behandelten

Patienten. So hat die Analyse unter Bortezomib eine Verlängerung der Zeit bis zum Fortschreiten der Erkrankung (Time to Progression = TTP) um 78% ergeben (Paubelle E. et al. 2005). Die Wirkungsweise von Velcade® basiert auf einer Blockierung der Stoffwechselwege der Krebszellen, die sich durch unkontrolliertes Wachstum auszeichnen. Proteasomen spielen eine wichtige Rolle bei dem Abbau von Proteinen, die den Zellzyklus und somit das Zellwachstum regulieren. Kommt es zu einer Proteasom-Blockade, werden vitale Proteolyse-Prozesse unterdrückt. Dies führt dazu, dass sich viele Signale in der Krebszelle gegenseitig aufheben oder verhindert werden. Im Ergebnis führt dies zur Hemmung des Tumorwachstums, Hemmung der Angiogenese (Ausbildung neuer Blutgefäße zur Versorgung des Tumors), Apoptose der Krebszellen und Hemmung der Interaktion mit Bindegewebszellen des Knochenmarks (Dou QP. and Goldfarb RH. 2002). Auch gesunde Zellen sind von der Therapie betroffen. Allerdings wurde festgestellt, dass sich diese Zellen – im Gegensatz zu den Krebszellen – wieder regenerieren, wenn die Behandlung turnusgemäß nach 4 Injektionen für zehn Tage unterbrochen wird. Offensichtlich sind Krebszellen besonders auf die Funktion der Proteasomen angewiesen und reagieren daher empfindlicher auf deren Hemmung, als normale Zellen (Schenkein D. 2002). Das Boratom des Bortezomib bindet mit einer hohen Affinität und Selektivität als Ligand an die katalytische Einheit des 26S Proteasoms und inaktiviert dieses. Das Multiple Myelom (Plasmozytom) gilt bisher als behandelbar, aber unheilbar. Bortezomib kann zwar dessen Heilung nicht bewirken, ist aber eine weitere Alternative für Patienten, bei denen mindestens eine der übrigen Therapien bereits fehlgeschlagen ist (Richardson PG. et al. 2004).

In unserer Arbeit wollen wir untersuchen inwiefern Bortezomib sowohl auf die Apoptose als auch auf die Re-Differenzierung der Schilddrüsenmalignomzellen Einfluss nimmt.

Rapamycin (Sirolimus, SRL) ist ein makrozyklisches Immunsuppressivum, ein Makrolidantibiotikum aus Streptomyceten (*Streptomyces hygroscopicus*). Dieser Bakterienstamm wurde erstmals im Boden der Insel Rapa Nui, auch

bekannt als Osterinsel, gefunden. Daher auch der Name RapaMycin. Rapamycin ist ein neuartiges Medikament, das zur Verhinderung der Organabstoßung bei Patienten nach Nierentransplantation eingesetzt wird, meist in Kombination mit Ciclosporin und Corticosteroiden. In der Kardiologie werden die antiproliferativen Effekte des Sirolimus ausgenutzt, um Wiederverengungen (Restenosen) durch eine Hyperplasie der Gefäß-Intima nach Implantation eines Stents in den Herzkranzgefäßen zu verhindern. Mit Sirolimus beschichtete Stents zeigen in mehreren Studien die Ausbildung von weniger Restenosen im Vergleich zum konventionellen Metallstent (Ruygrok et al. 2003; Lemos et al. 2004). Aufgrund seiner antiproliferativen Effekte auf Zellen rückte Rapamycin auch ins Blickfeld der Antitumorthherapie. Wie Rapamycin seine starke immunsuppressive und zellabtötende Wirkung im Einzelnen entfaltet, war bisher unklar. Man wusste lediglich, dass die Substanz die Herstellung von Eiweißen in Zellen hemmt. Die Arbeitsgruppe um Professor Ingrid Grummt aus der Abteilung Molekularbiologie der Zelle im Deutschen Krebsforschungszentrum hat nun entdeckt, warum das so ist: Rapamycin blockiert die Produktion von Ribosomen. Diese molekularen Maschinen benötigt die Zelle, um damit ihre Eiweiße zu fabrizieren. Über einen Zwischenschritt hemmt Rapamycin ein Protein, das die Bereitstellung eines wichtigen Bauteils für die Ribosomen regelt. Ist das Protein lahm gelegt, fehlt es an Nachschub für die Ribosomen. Damit kommt auch die Synthese der Eiweiße zum Erliegen. Da schnell wachsende Gewebe wie z.B. Tumoren einen besonders hohen Bedarf an Ribosomen haben, werden sie durch Rapamycin auch besonders getroffen. Besonders viel versprechend erscheint Rapamycin auch aus einem weiteren Grund: Es ist die einzige bekannte Wirksubstanz, deren direktes Angriffsziel ein einzelnes Enzym ist (Mayer C. and Grummt I. 2006).

Außerdem besitzt Rapamycin die Fähigkeit in den Zellzyklus einzugreifen. Es verstärkt die Wirkung von TGF- β (Transforming growth factor B), das den Stillstand des Zellzyklus induziert. Es ist bekannt, dass Karzinomzellen meist nicht mehr sensibel für TGF- β sind. Rapamycin kann die Wirkung von TGF- β verstärken und somit die Proliferation von Krebszellen unterbinden (Law et al.

2002). Es ist interessant zu wissen, ob Rapamycin diese Wirkung auch in beiden Zelllinien unserer Schilddrüsenmalignomzellen hervorruft.

Eine weitere viel versprechende Redifferenzierungssubstanz stellt das Arsentrioxid dar. Seit einigen Jahren wird es erfolgreich in der Therapie der akuten promyeloischen Leukämie (APL) eingesetzt (Chen et al. 1997). Die APL stellt eine der acht Unterarten der akuten myeloischen Leukämie (AML) dar. Sie ist durch das Vorhandensein einer abnormalen Translokation von Chromosom 17 auf 15 und/oder des Promyelozyten-Leukämie/Retinsäurerezeptor-alpha-Gens gekennzeichnet (Soignet 2001; Chan et al. 2006). Diese genetische Veränderung führt zur Unterdrückung der Reifung von Leukozyten-Vorläuferzellen. Die Therapie mit Arsentrioxid ist nach Versagen einer Standardtherapie indiziert (Brunner 2002). Die toxische Wirkung von Arsentrioxid wird vor allem der Hemmung des mitochondrialen Pyruvatdehydrogenase-Multienzymkomplexes zugeschrieben (Maiorino, Aposhian 1989), wodurch es zu einer zellulären Energieverarmung bis hin zum Zelluntergang kommt. Arsentrioxid induziert in bestimmten Konzentrationen auch die Apoptose von Tumorzellen und zeigt zusätzlich Zell-differenzierende Effekte (Miller et al. 2002). Desweiteren wurde eine Entfaltung anti-tumorigener Wirkung bei Mamma-, Cervix-, Prostatakarzinomen und Karzinomen des Gastrointestinaltraktes beobachtet (Zhang et al.1995; Maeda et al. 2001; Vuky et al. 2002).

Es ist bekannt, dass Arsentrioxid mit anderen Substanzen, wie beispielsweise den Retinoiden in seiner apoptotischen Wirkung ein synergistisches Verhalten zeigt (Wang 2002; Au et al. 2002).

In der vorliegenden Arbeit werden nun der synergistische Effekt von Arsentrioxid und Dithiothreitol und die re-differenzierenden Eigenschaften dieser Substanzkombination untersucht.

Dithiothreitol (DTT) ist eine chemische Verbindung, die auch Clelands Reagenz genannt wird. Es leitet sich formal vom Zuckeralkohol Threit oder Threitol ab,

der zum Strukturtyp der Threose gehört. DTT findet Verwendung in der Proteinbiochemie. Es konserviert Proteine des Zellinneren in ihrer funktionalen Form, indem es die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen (SH-) zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff verhindert. Andererseits kann es die Faltung von Proteinen, deren Struktur durch Disulfidbrücken stabilisiert wird, durch deren Reduktion zerstören. Es ist auch ein wichtiges Reagenz für die SDS-PAGE bzw. das Western-Blotting.

Der Synergismus zwischen Arsenitoxid und DTT wurde bereits an den NB-4 Zellen der akuten myeloischen Leukämie-Zelllinie untersucht. Diese Studien belegten, dass DTT, bekannt als Antidot für dreiwertiges, anorganisches Arsen, die Toxizität von Arsenitoxid in Leukämiezellen verstärkt und somit die Apoptoserate der Krebszellen erhöht. Möglicher Wirkmechanismus ist die Modulation der Phosphorylierung benachbarter Thiole an DTT. Bei Patienten mit akuter promyeloischer Leukämie kam es darunter zur Remission (Gurr et al. 1999b).

2. Material

2.1 Untersuchungsmaterial

- Humane cancerogene Zellen der Zelllinie CGTH-W-1 (DSZM no.: ACC 360)
- Humane cancerogene Zellen der Zelllinie ONCO-DG-1 (DSZM no.: ACC 507)

2.2 Geräte für die Zellkulturen

- Sterile Werkbank:
 - Heraeus Herasafe, Heraeus
- Zentrifuge:
 - Hettich Rotixa / RP, Hettich
 - Beckmann Coulter CH-AVJ 20 XP
 - Heraeus Biofuge primo R
- Lichtmikroskop:
 - Olympus IX 51
- Brutschrank:
 - Heracell, Heraeus
 - Heracell 240, Heraeus
- Zellzählgerät:
 - Schärfe Systeme, Casy® Model TTC
- Spektrometer:
 - Ultrospec 2100 pro (UV-visible Spectrometer), Amersham Biosciences
- Luminometer:
 - Mithras LB 940, Berthold Technologies
- Westernblots:
 - The Joey Gel Caster, Modell JG C-4, JG C-2, JG C-3, owl

- P8DS Emperor Penguin, Vertical Electrophoresis System, owl
- VEP-2 Bandit, Mini Tank Electroblotting System, owl
- Membran Immobilon-P, Cat.No: 1PVH 00010, Poresize: 0,45mm, Millipore
- Zellkulturflaschen:
 - Costar 3150, 162 cm², Corning Incorporated
 - Falcon 35 3108, 50 cm²
- Kulturgefäße:
 - Costar 3548, 48 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated
 - Costar 3596, 96 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated
- Zentrifugenröhrchen:
 - 50 ml Cellstar, Cat.No. 227261, greiner bio-one
- Facsanalyse:
 - Zentrifuge Hettich Roto Silenta/K, Hettich
 - Facs- Gerät, Modell "Calibur", Becton Dickson, USA
 - Facsröhrchen, Becton Dickson, USA

2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität

- Zur Messung von Beta-Strahlung:
 - Microbeta-Trilux, 1450 Microbeta (liquid scintillation & luminescence counter), Wallac
 - Printed Filtermat 1450-421, Glass Fibre Filter, 90 x 120 mm, Wallac
 - Sample Bag 1450-432, 90 x 120 mm, Perkin Elmer
 - Tri-carb 2900 TR (liquid scintillation Analyzer), Packard (Biosciences Company)
 - Zellerntegerät Cellharvester IH 280, Inotech AG
- Zur Messung von Gamma-Strahlung:

- “Wizard 3”, 1480 Automatic Gamma Counter, Wallac
 - Filtermat 11731, 102 x 256 mm, Skatron Instruments
 - Zellerntegerät Cellharvester IH 280, Inotech AG
- Erfassung der Chemolumineszenz auf Blotmembran
 - LAS 3000 Image Reader (Fuji Photo Film)
 - Dokumentation mit Advanced Image Data Analyser, Version 3.4

2.4 Medien und Reagenzien

- (6-³H)- Thymidin, TRK 61, Amersham Biosciences
- ¹²⁵I-Iodid, IMS. 30, Amersham Biosciences
- Acrylamid/ N,N- Methylenebisacrylamid 37,5:1 (40% w/v)
- Ammoniumpersulfat, A 3678, Sigma
- Ampuwa, steriles pyrogenfreies Aqua ad injectabilia, Fresenius AG
- Arsen (III)-tri-oxid (arsenige Säure), Universitätsapotheke Tübingen
- Aza-deoxycytidine, 11390, Fluka
- Bio-Rad Protein Assay, Cat: 500-0006, Bio- Rad Laboratories GmbH
- Blotpuffer nach Tobwin [pH 8,5]: 3,03 g Trizma Base + 14,41 g Glycin + 200 ml Methanol + 1000 ml Ampuwa
- Bortezomib als Handelspräparat Velcade®, Millenium Pharmaceuticals Limited, London, verwendet. Im folgendem immer als Velcade® bezeichnet.
- Casyton, Isotone Kochsalzlösung, Schärfe Systeme Cat. BE 17-517 Q, Cambrex
- Chromogensubstrat-Lösung: 4 mg Naphthol-AS-MX-Phosphat (Sigma) + 100 µl DMFA + 4,9 ml 0,1 M Tris/HCl pH 7,0 + 1 M Levamisol (Sigma) + 5 mg Fast red TR salz (Sigma)
- Ciprobay® 200 (Ciproflaxin), Bayer: 300 ml/L NCTC- Medium

- Dimethylsulfoxid (DMSO), D-8418, Sigma
- DTT (1,4 Dithiothreitol), Merck, No. 1.12013.0001
- ECL-Lösung: Lösung A (0,5 M Luminol (Sigma-Aldrich) + 0,5 M p-Jodphenol (Sigma-Aldrich) + 0,1 M Tris/HCl pH 9,35);
Lösung B (30% H₂O₂ im Verhältnis 1:4000 in 0,1 M Tris/HCl pH 9,35)
- Fetales Kälberserum: fetal bovine serum, F 7524, Sigma
- H₂O₂ 30%, A 2473,0500; AppliChem
- HMW (high molecular weight marker) Calibration Kit for SDS-Electrophoresis, Mix of protein standard, Cat. 17-0615-01, Amersham Biosciences
- Homogenisationspuffer (20 mM Tris- HCl [pH 7,5], 0,5 mM EGTA, 0,1 mM Proteaseinhibitor PMSF, 140 mM Dithiothreitol)
- Kulturmedium: NCTC-135 + L- Glutamine, Ref. 3052264, Gibco
- Kulturmedium: RPMI 1640 + L-Glutamine, Ref. 21875-034, Gibco
- Laufpuffer für SDS- PAGE nach Laemmli: 30 g Trizma®-base (Sigma-Aldrich Ref. T1503) + 144 g Glycin + 10 g SDS + 1000 ml Ampuwa
- Myco Alert Mycoplasma Detection Kit, Cambrex, USA
- NIS-Antikörper, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. B. Czarnocka, Dep. Biochemie und Molekularbiologie, Universität Warschau.
- PBS, phosphate buffered saline without Ca and Mg 1x, Biowhittaker Europe
- Pendrin-Antikörper, (G-19), Santa Cruz biotechnology sc-23779
- Ponceau S 0,5 %, (Anfärbung der Blotmembran), 33429, Serva
- Probenpuffer nach Laemmli für SDS-PAGE: Tris-HCl 126 mM, 4% SDS (Sodium dodecyl sulphate), 20% Glycerin, 10%, 0,02% Bromphenolblau, pH 6,8, 5% 2-Mercaptoethanol
- Rapamycin, Weyth Pharmaceuticals, New York, RB 1655/B in DMSO gelöst
- Spinnerlösung: 900 ml Ampuwa + 100 ml Salzlösung nach Earle, mit 10%iger NaHCO₃ (ca. 6 ml) auf pH 7,2 eingestellt

- Sammelgelpuffer für SDS- PAGE (0,5 M Tris Base [pH 6,8]: 6,1 g Trizma®-base in ca. 50 ml lösen und mit 2,8 ml HCl 32% auf pH 6,8 einstellen, mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen
- Staurosporin, 1055682, Roche Diagnostics
- Streptavidin-AP-Konjugat, Kat.Nr.: 0396, (DAKO)
- Szintillationsflüssigkeit (Szintillator: Betaplate-Scint; PerkinElmer)
- Temed, Tetramethylethyldiamin, T 9281, Sigma
- Trenngelpuffer für SDS-PAGE (1,5 M Tris Base [pH 8,8]): 18,2 g Trizma®-base (Sigma Aldrich Ref. T1503) in ca. 50 ml lösen und mit ca. 2,8 ml HCl 32% auf pH 8,8 einstellen, mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen
- Tris-buffered saline (TBS) (20 mM Tris, 0,9% NaCl, pH 8,0)
- Trypsin-EDTA (10x), Cat. 15400-054, Invitrogen Corporation
- TWEEN 20, 37470, Serva
- Ultrosor G, insulinhaltiger Serumersatz, BIOSEPRA: 30ml/L NCTC-Medium
- Valproic acid sodium salt, P 4543, Sigma
- Velcade®, Millenium Pharmaceuticals Limited, London, siehe auch Bortezomib
- Zweitantikörper, horseradish peroxidase conjugated secondary antibody

3. Methoden

3.1 Zellzählung

Für die Zellzählung werden 10 µl hochkonzentrierter Zelllösung in 10 ml Casyton®, eine Verdünnungslösung für Zellkulturen, pipettiert und in das Casy Zellzählgerät gestellt. Das Gerät Casy® Model TTC der Firma Schärfe Systeme aus Reutlingen beruht auf dem Prinzip der Widerstandsmessung, kombiniert mit der modernen Technik der elektronischen Pulsflächenanalyse. Jedes Mal, wenn eine Zelle durch die Messpore tritt, wird Elektrolytlösung verdrängt, welches sich in einer Widerstandsänderung äußert. Die Anzahl der Widerstandsänderungen, auch als elektrischer Impuls bezeichnet, ist ein Maß für die Zellzahl der Suspension und seine Höhe ein Maß für das Volumen der Zellen.

Das Gerät ist so kalibriert, dass alle Messergebnisse reproduzierbar und vergleichbar sind, außerdem kann man die Mindestgröße der detektierbaren Zellen festlegen.

Die Zellzählung wurde zur Feststellung der benötigten Zellzahl pro Kultur und für den Vergleich des Zellwachstums unter verschiedenen Bedingungen benutzt.

3.2 Kultivierung der malignen humanen Thyreozyten

Es wurden für die Versuche zwei menschliche maligne Thyreozyten-Zelllinien verwendet. ONCO-DG-1, wurde einer 49-jährigen Frau mit gut differenziertem, azidophilen, papillären Schilddrüsenkarzinom entnommen.

Die immortalisierte Zelllinie CGTH-W-1 stammt von Brustbeinmetastasen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms einer 70 Jahre alten Chinesin.

Die Zelllinien wurden in Ampullen in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach der Entnahme der Ampullen aus dem flüssigen Stickstoff wurden sie in ein auf 40 – 50 °C erhitztes Wasserbad gelegt. Somit wurden die Zellen aufgetaut. Anschließend wurden die Ampullen mit den aufgetauten Zellen auf Eis gegeben. Die Zellen wurden mit einer Pipette entnommen und in ein vorgekühltes 50 ml Falconröhrchen gegeben. Zu den Zellen wurde nun dasselbe Volumen an vorgekühltem FKS tropfenweise zugegeben. Anschließend kamen noch 10 ml ebenfalls vorgekühltes Medium dazu. Die Zellen wurden bei 7°C, 120 x g, 7 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert.

Das Medium wurde in 500 ml Flaschen geliefert und vor Gebrauch mit 55 ml fetalem Kälberserum vermennt, davon wurden 20 ml in eine 75 cm² und 45 ml in eine 162 cm² Flasche gegeben, in der die Zellen kultiviert wurden.

Das Kulturmedium besteht aus einem Gemisch von Kohlenhydraten, insbesondere Glukose, welche als Energiequelle für die Biosynthese dient. Außerdem Aminosäuren, anorganische Salze (wie Kalzium, Kalium, Magnesium, Natrium, Phosphate, Chloride, Sulfate, Bikarbonate), die nicht nur für das Zellwachstum notwendig, sondern auch für das Aufrechterhalten des osmotischen Drucks der Zellmembran wichtig sind. Vitamine wirken als Katalysatoren für metabolische Vorgänge. Das fetale Kälberserum begünstigt das Zellwachstum und die Proliferation. Der pH-Wert des Mediums von 7,2-7,4 wird durch eine Bikarbonat-Puffer und Luft-/CO₂-Begasung (95% und 5%) stabilisiert. Um der Verdunstung des Mediums entgegenzuwirken, ist die Atmosphäre im Inkubator wasserdampfgesättigt. Die Temperatur beträgt 37°C. Dadurch wird gewährleistet, dass die Zellen ohne Probleme weiterarbeiten können und möglichst nicht übersäuern. Für einen rechtzeitigen Mediumwechsel ist desweiteren Phenolrot als Indikator hinzugefügt, damit ein Übersättigen des Mediums mit H⁺-Ionen am Farbumschlag nach gelb bemerkt werden kann. Zusätzlich ist L-Glutamin (essentielle Aminosäure) hinzugefügt, welches bei den vorhandenen Bedingungen im Brutschrank jedoch schneller abgebaut wird als andere Aminosäuren.

Vor dem Ablösen der Thyreozyten vom Kulturflaschenboden, werden die Zellen mikroskopisch beurteilt. Danach wird das Medium, das später verworfen wird, bis auf ca. 10 ml für den Mykoplastentest dekantiert. Die Flasche wird mit 10-20 ml sterilem, auf ca. 37°C vorgewärmten PBS-Puffer (1-fach) gewaschen, um die Zellen von unerwünschten Lösungsresten zu befreien. Anschließend wird 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung (1:10 in PBS verdünnt) auf die Zellen gegeben. Trypsin ist eine Endopeptidase, ein Verdauungsenzym, welches insbesondere die extrazellulären Adhäsionsproteine der Thyreozyten spaltet. Es folgt eine kurze Inkubationszeit von 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank, bei der sich die Zellen vom Gefäßboden lösen. Nach Abschluss der Inkubation werden 10 ml Kulturmedium hinzu gegeben, um das Trypsin wieder zu inaktivieren und dessen Wirkung zu hemmen. Der Flascheninhalt, gut gemischt, wird in vorbereitete 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 7 Minuten bei 4°C und 120 g abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wird vorsichtig abpipettiert und das übrig gebliebene Zellpellet in frischen 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Für die Zellzählung werden 10 µl resuspendierte Zellen mit steriler Pipettenspitze in ein mit 10 ml filtriertem Casyton® gefülltes Cup pipettiert, die Probe 2-3mal geschwenkt und die Zählung wie in 3.1 beschrieben durchgeführt.

3.3 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellkulturen

Für ein optimales Zellenwachstum werden die Zellkulturflaschen in Brutschränken (Heraeus) aufbewahrt. Unter vollkommenen Lichtabschluss herrschen hier konstante 37° C. Der Inkubator wird mit 95% Luft und 5% CO₂ begast. Des Weiteren ist er wasserdampfgesättigt. Die Dauer der Inkubation variiert zwischen 24 und 120 Stunden.

3.4 Passagierung der Zellkulturen

Unter Passagierung versteht man das Aufteilen (Splitten) der bis dahin gewachsenen Zellen. Dadurch wird eine Kontaktinhibition verhindert und ein stetiges Wachstum garantiert. Dafür werden die Zellen wie in 3.2 beschrieben abtrypsinisiert und die Zellsuspension in einem Becherglas gesammelt. Um das weitere Wachstum zu bewirken, muss die Zellsuspension nun auf zusätzliche Kulturflaschen verteilt werden. Werden bei einem Versuchsansatz Zellen verbraucht, so können die restlichen Zellen, die nicht für den Ansatz benötigt wurden, auf weitere Kulturflaschen passagiert werden.

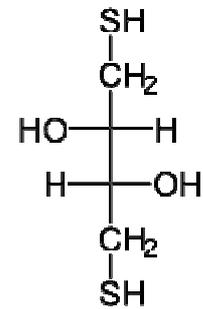
Wird keine Splittung vorgenommen, kommt es nicht nur zur Kontaktinhibition der Thyreozyten, sondern auch zu einem Nahrungsmangel. Beide Einflüsse können ein weiteres Wachstum verhindern.

3.5 Stimulation der Zellkulturen

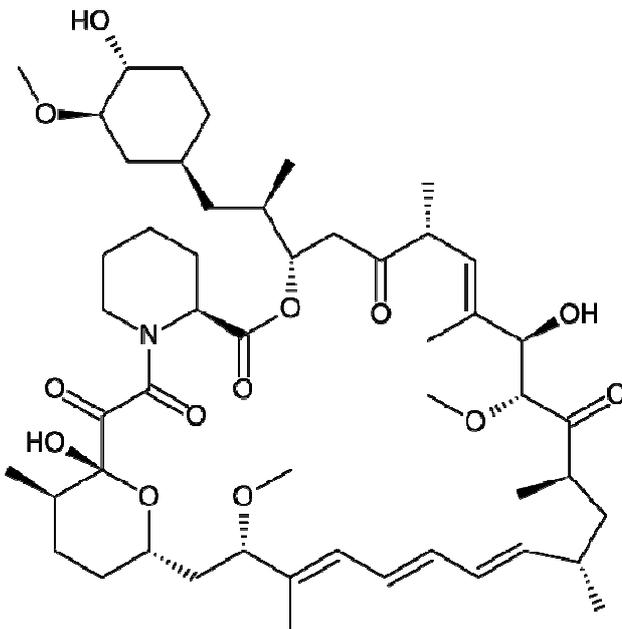
Für die Versuchsansätze wurden die Zellen wie in 3.2 beschrieben abtrypsinisiert und einer Zellzählung unterzogen und die Kulturen auf die benötigte Zellzahl eingestellt. Die aus den Kulturflaschen entnommene Lösung mit Zellen ist allerdings so hochkonzentriert an Zellen, dass sie erst mit Medium verdünnt werden muss, um auf die gewünschte Zellanzahl in der Suspension zu kommen. Benötigt werden für die 48-well-Platte 200 µl Zellsuspension mit jeweils 0,133 Millionen Zellen pro Kulturloch und für die 96-well-Platte 100µl Zelllösung mit 0,065 Millionen Zellen. Dem zum Verdünnen verwendeten Medium wurden bereits zu testenden Substanzen in entsprechender Konzentration zugesetzt.

An den Thyreozyten wurden folgende Substanzen getestet:

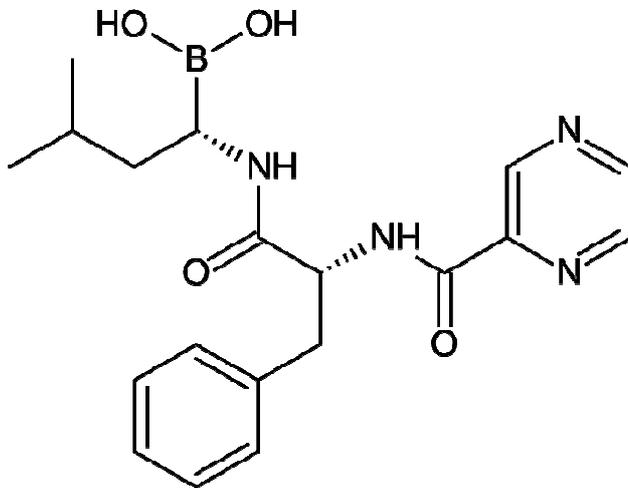
- **DTT: 1,4 Dithiothreitol.** Mit folgenden Endkonzentrationen: 5 μM ; 10 μM ; 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM .



- **Arsentrioxid** (As_2O_3). wird den Thyreozytenkulturen in der Endkonzentration 2 μM , 1 μM , 0,5 μM hinzugefügt.
- **Arsentrioxid + DTT.**
- **Rapamycin.** Endkonzentrationen: 20 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 500 nM, 200 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM, 5 nM.



- **Velcade®**. Endkonzentrationen: 2 µg/ml, 1 µg/ml, 100 ng/ml, 20 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml.



Radioaktives Iodid und radioaktives Thymidin werden zu Beginn der Kultur dem Medium zugegeben. Die 48-well-Platten werden mit jeweils 10 µl ¹²⁵Iod (4 kBq) versehen und die 96-well-Platten mit 10 µl ³H-Thymidin (6 kBq).

3.6 Zellernte

Vorbereitungen für die Messung des ¹²⁵I-Iodeinbaus

Nach bestimmten Inkubationszeiten, in denen die Zellen die Möglichkeit hatten das radioaktive Jod einzubauen, werden sie geerntet. Mittels Zellharvester werden die Thyreozyten auf ein Filterpapier gesaugt und die ausgestanzten Filterpapierstücke in Reagenzgläser gegeben.

Vorbereitung für die Messung des ³H-Thymidineinbaus

Nach der gewählten Inkubationszeit werden die Zellen bei -20°C eingefroren. Beim Einfrieren und Auftauen wird die Zellmembran zerstört und die DNA freigelegt. Nachdem die Zellfragmente und die DNA mittels Zellharvester auf spezielle Filterpapieren (90 x 120 mm) gesammelt wurden, werden diese in eine Tasche aus Plastikfolie der entsprechenden Größe gegeben. In diese Tasche wird dann noch jeweils 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Szintillator: Beta

Scint; PerkinElmer TM Life science) zupipettiert. Die Plastikfolien werden dann zugeschweißt. Die eingetüteten Filterpapiere wurden dann in eine Kassette gelegt und die Radioaktivität im Mikrobeta-Trilux β -Zähler gemessen.

3.7 Messung der Radioaktivität

Messung von ¹²⁵I-Iod

Die Radioaktivität des ¹²⁵I-Iodideinbaus in die Thyreozyten wird im Gamma-Counter "Wizard 3" von Wallac gemessen. Hierbei werden die mit den ausgestanzten Filterpapier bestückten Reagenzgläser eine Minute gemessen.

Messung von ³H-Thymidin

Während der Replikationsphase (S-Phase) des Zellzyklus wird Thymidin als Nukleosidbaustein in den DNA-Strang eingebaut. Das zugegebene Thymidin liegt in einer Spurendosis (tracer) vor und verhält sich wie das zelleigene Thymidin ohne dieses zu beeinflussen. Aufgrund der β -Strahlung lässt sich der Weg des Thymidins in die DNA verfolgen.

Die gemessene Aktivität entspricht weitgehend der in die DNA eingebauten Thymidinmenge. Es lässt sich so auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen zurückschließen.

3.8 Immunhistologischer Nachweis von NIS mittels Westenblot

3.8.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wird mit der von Bradford 1976 entwickelten Methode durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Bindung der Proteine mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250. Im sauren Milieu bewirkt der gebundene Farbstoff eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Verwendet wird der kommerzielle Protein-Assay von BioRad und

eine Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung, mit der eine Standardreihe von 0-12 µg/ml Protein hergestellt wird.

Um für die Proteinbestimmung Proben zu gewinnen, müssen die kultivierten Thyreozyten wie in 3.2 beschrieben abtrypsiniert werden. Dann werden sie in 50 cm² Kulturflaschen mit dem jeweiligen Stimulanzium ausgesät und 24 bis 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit löst man die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden, sammelt sie in Zentrifugenröhrchen und zentrifugiert sie 7 Minuten bei 4°C und 120 g ab. Der dabei entstandene Überstand wird dekantiert, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und dann eine Zellzählung, wie in 3.1 beschrieben, durchgeführt. Danach werden die Zellen unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in ungefähr 1 ml PBS resuspendiert. Dieser Milliliter wird in ein Eppendorfröhrchen überführt und 10 Minuten bei 4°C und 16 000 x g abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wird abdekantiert und die Eppendorfröhrchen für 2 bis 3 Minuten über Kopf auf ein saugfähiges Tuch gestellt. Danach wird das Zellpellet bei -20°C bis zur Proteinbestimmung eingefroren.

3.8.2 SDS- Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS- PAGE)

Das Ziel der Gelelektrophorese ist es, Proteine auf Grund ihres Molekulargewichts zu trennen. Dafür wird ein Gel benötigt, welches mittels Siebfunktion die unterschiedlichen Moleküle entsprechend ihrer Größe sortiert. Es besteht aus zwei verschiedenen Gelarten, dem Sammelgel 5% und dem Trenngel 7% für NIS und 12% für Pendrin. Diese beiden Gele bestehen aus einer Basis von 40% Bis-Acrylamid und SDS.

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-bis-Lösung 40%	3,13 ml	1,25 ml
Trenngelpuffer	10 ml	-
Sammelgelpuffer	-	10 ml
Destilliertes Wasser	4,27 ml	6,15 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
Temed	15 µl	15 µl
APS 10 %	30 µl	30 µl

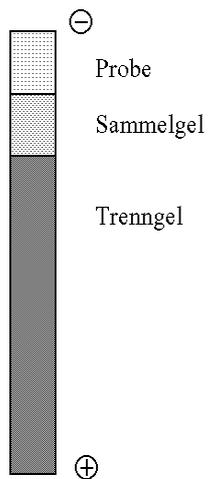
Als Sammelgelpuffer wurde eine, auf den pH 6,8 mit Salzsäure (32%) und 0,5 M Trismabase eingestellte Lösung, hergestellt. Für den Trenngelpuffer wurde 1,5 M Trismabase verwendet und ebenfalls mit Salzsäure auf einen pH von 8,8 eingestellt. Sowohl bei der Trenngel- als auch bei der Sammelgelherstellung wird APS und Temed als letztes hinzugefügt, da sie als Starter der Polymerisation fungieren. Die Polymerisationszeit der Gele beträgt jeweils ungefähr 15-30 min. Als erstes wurde das Trenngel hergestellt, in den Gelgießstand eingefüllt und eine dünne Schicht Ethanol (20 µl) darüber pipettiert. Die Ethanolschicht bewirkt einen geraden Abschluss zum Sammelgel und wird nach der Polymerisation entfernt. Danach wird das letzte Viertel der Gelgießkammer mit Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm, der Taschen für die Proteinproben im Sammelgel bewirkt, eingefügt. Auf Grund des geringen Vernetzungsgrades des Sammelgels wandern die Proteine hier schneller hindurch und werden an der Grenze zum Trenngelpuffer aufgehalten und zusammen geschoben. Dies bewirkt eine verbesserte Auflösung. Diese Art der Proteinauftrennung wird auch als diskontinuierliche Gelelektrophorese bezeichnet.

In die Taschen des Sammelgels wird jeweils 30 µg Protein von den zu analysierenden Proben mittels Pipetten gegeben. Daher musste zuvor die Gesamtmenge der Proteine bestimmt und dann auf 30 µg eingestellt werden. Die Proteinproben wurden dann im Verhältnis 1:1 (abhängig vom Volumen der

auf 30 µg eingestellten Proben) mit einem Probenpuffer in einem Eppendorf-Gefäß gemischt. Der Probenpuffer wird üblicherweise zweifachkonzentriert hergestellt und enthält ein Reduktionsmittel für Disulfidbrücken. Eine Tasche des Gels wird mit einem High Molecular Weight Längenmarker befüllt. Dieser enthält die Proteine Myosin, Alpha₂-Makroglobulin, β-Galactosidase, Transferrin, Glutamat Dehydrogenase.

Myosin hat ein Molekulargewicht von 212 000 Dalton und ist damit dem Molekulargewicht von Thyreoglobulin (300 000 - 330 000 Dalton) ähnlich. Der Natrium-Iod-Symporter hat ein Molekulargewicht von 80 000- 90 000 Dalton und liegt damit dem Molekulargewicht von Transferrin (76 000 Dalton) sehr nahe. Die Proben des Markers müssen allerdings vor dem Auftrag mit Probenpuffer nach Laemmli (siehe 2.4) vermengt werden, welcher aus destilliertem Wasser, SDS, Sammelgelpuffer, Glycerin, 2-Mercaptoethanol und Bromphenolblau besteht, wobei die im Probenpuffer gelösten Proben bei 95 °C ungefähr 5 Minuten erhitzt werden. Die Aufgabe des Probenpuffers und der Erhitzung besteht in der Denaturierung und Dissoziation der Proteine. Des Weiteren wird durch die Einfärbung der Proteinlösung ein rechtzeitiges Stoppen der Elektrophorese zum Zeitpunkt des kompletten Gel-Durchlaufs aller Proteine ermöglicht. Da Proteine aus unterschiedlich großen und geladenen Molekülen bestehen, besitzen sie unterschiedliche Beweglichkeit. Große Moleküle mit einer hohen Ladungszahl würden in einem elektrischen Feld schneller wandern als kleine Moleküle mit geringerer Ladungszahl. Die Rolle der negativ geladenen Sulfatgruppen im SDS ist die Nivellierung der positiven Ladungen der Proteine. Je größer das Molekül, desto mehr SDS-Moleküle lagern sich an und desto negativer wird der Komplex. Jedoch bekommen alle Moleküle das gleiche Verhältnis von Ladung zu Masse und damit die gleiche Mobilität, welche sie in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe und nicht ihrer Ladung wandern lässt.

Nachdem die Proben aufgetragen wurden, wurden die Gelplatten vertikal in die

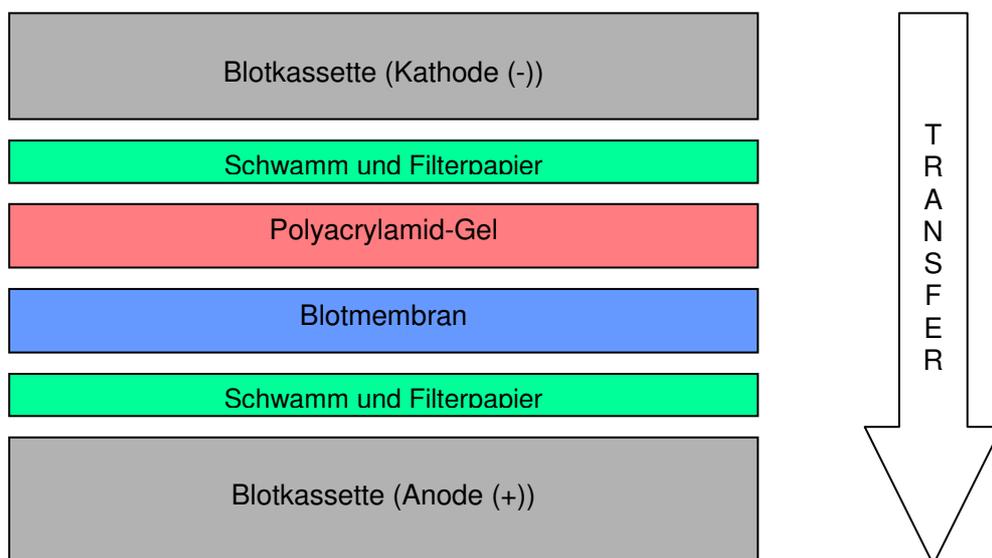


Elektrophoreseapparatur gestellt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Laufpuffer besteht aus einer Mischung von Wasser, Glycin, SDS und Tris (genaue Zusammensetzung siehe 2.4) und soll während der Elektrophorese den pH-Wert konstant halten. Es wurde eine Spannung von 80 Volt für ca. 120 Minuten an den Elektrophoreseapparat gelegt. Die negativ geladenen Moleküle wanderten hierdurch zur positiv geladenen Anode nach unten und entfernten sich zusehends von der negativ geladenen Kathode.

3.8.3 Transfer von Proteinen auf Blotmembran mittels Westernblot- Methode

Die in den Gelen befindlichen Proteine besitzen immer noch die Fähigkeit aus dem Elektrophorese-Gel zu diffundieren. Aus diesem Grund werden sie auf eine Membran (Immobilion P, Millipore) übertragen, auf der sie durch hydrophobe Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken ruhig gestellt werden und renaturieren. Das durch die elektrophoretische Auftrennung erhaltene Muster wird beibehalten. Dies ist notwendig für den immunhistochemischen Nachweis von NIS und Pendrin.

Um die Gele auf die Membran zu übertragen, werden sie in einem mit Blotpuffer gefüllten Tablett aus den Glasträgern entfernt. Dabei ist darauf zu achten, das Gel nicht zu drehen, um ein Durcheinanderbringen der Proben zu vermeiden. Derweilen wird die Blotmembran für 15 Sekunden in 100%iges Methanol und dann ebenfalls in Blotpuffer gelegt. Dann erfolgt das Zusammenführen aller Lagen in der Blotkassette.



Das so genannte „Blotsandwich“ wird bei einer Stromstärke von 80 mA für ca. 120 Minuten geblottet. Danach werden das Gel und die Membran entnommen und angefärbt. Vor der Immunreaktion und der Färbung der Blot-Membran mit

Ponceau S (0,5 %) muss man die Membran bei Raumtemperatur für ca. 2 Stunden trocknen lassen, um der Bildung eines starken Hintergrundes vorzubeugen. Danach wird die Membran durch 100 % Methanol gezogen, in Wasser gespült und anschließend mit Ponceau S (0,5 %) für ca. 1 Minute angefärbt. Dann wird mit Wasser bis zum gewünschten Kontrast entfärbt. Aufgrund der Hydrophobie der Blot-Membran wird sie nachbehandelt und durch 100 % Methanol gezogen. Die hydrophilisierende Wirkung des Methanols kommt dadurch zustande, dass es durch die OH-Gruppe einerseits hydrophil und durch die 25 Kohlenstoffatome andererseits hydrophob ist. Anschließend wird für ca. 3 Stunden in 5 % Lactalbumin eine Präinkubation durchgeführt. Danach wird die Membran für 3 x 5 Minuten in TBS/Tween 20 gewaschen; Tween 20 verhindert unspezifische Bindungen auf der Blot-Membran. Für die Färbung des Gels wird Millipore Coomassie Brilliant Blue R verwendet, welches die noch im Gel befindlichen Proteine denaturierte, fixierte und sichtbar machte.

3.8.4 Immunreaktion

Um eine besonders gute Immunreaktion zu erzielen, muss die zuvor in Methanol getränkte Blotmembran für 3 Stunden in 5% Lactalbumin vorinkubiert werden (siehe 3.8.3.). Hierbei werden die freien Bindestellen der Membran blockiert und somit für Antikörper unzugänglich gemacht. Dies ist notwendig, damit bei der späteren Anfärbung nur Antikörper sichtbar gemacht werden, welche an den Proteinen gebunden sind. Wären die Bindestellen der Membran nicht blockiert, würden diese ebenfalls angefärbt und somit das Ergebnis verfälschen.

Nach der Vorinkubation wird die Membran mit TBS-Puffer, der mit 0,1% TWEEN versetzt wurde, 3mal jeweils 5 Minuten gewaschen, bevor sie mit dem Erstantikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht bei 8°C auf einem Schüttler inkubiert wird. Hierbei wird für den NIS-Nachweis der NIS-4-Antikörper und für den Pendrin-Nachweis der PDS-1-Antikörper (Verdünnung 1:1000 in TBS) verwendet. Am nächsten Morgen wird die Membran wieder 3mal 5

Minuten mit TBS/Tween gewaschen, um die verbleibenden ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nun erfolgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur (eingesetzte Verdünnung: 1:2000 in TBS). Dieser bindet an den ersten und ist für die Visualisierung notwendig. Erneut muss die Membran gewaschen und danach für 3 bis 5 Minuten im Dunkeln in die ECL-Lösung gelegt werden. Mit Hilfe des „Enhanced Chemiluminescence“-Verfahrens (ECL) der Firma Amersham Pharmacia Biotech wird der Blot entwickelt. Hierbei wird aus Luminol 3-Aminophthalsäure, was mit einer Lichtemission einhergeht. Sofern die entsprechenden Proteine (NIS, Pendrin) in den Thyreozyten exprimiert wurden, werden sie auf der Blotmembran visualisiert und dokumentiert mit dem Image Reader LAS-3000 (Fuji Photo Film) und dem Advanced Image Data Analyser Version 3.4.

3.9 Immunzytochemische Darstellung von NIS und Pendrin

Hierfür werden 10 ml Zellsuspension mit circa 6,6 Millionen Thyreozyten und der jeweiligen Differenzierungssubstanz in 75 cm² Kulturflaschen für 24 und 48 Stunden kultiviert. Anschließend werden die Zellen abtrypsiniert, eine Zellzählung wie in 3.1 beschrieben durchgeführt und die Zellzahl auf 9 Millionen Zellen pro Milliliter vorbereitet. Es werden 5 Objektträger pro Substanz hergestellt: Zwei für die Darstellung der Proteine NIS und Pendrin, ein weiterer für die HE-Färbung und der letzte dient als Ersatz. Jeder Objektträger wird mit 50 µl Zellsuspension beträufelt und die Zellen wie bei einem Blutausstrich ausgestrichen. Danach werden die Objektträger bei 37°C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet. Sobald der Zellausstrich trocken ist, werden die Objektträger für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd gelegt, was eine Fixierung der Zellen bewirkt. Die Objektträger werden nun für weitere 10 Minuten in das Holt'sche Gemisch gestellt und dann erneut getrocknet.

Prinzip des Nachweises von NIS und Pendrin auf der Zelloberfläche durch Immunenzymtechnik:

- Bindung des ersten Antikörpers (z. B. NIS- Antikörper vom Kaninchen) an das Antigen
- Bindung des biotinylierten Zweitantikörper (Ziege- anti- Kaninchen) an den Erstantikörper
- Zugabe von enzymmarkiertem Streptavidin, welches mit dem Biotin des Zweitantikörpers einen festen Komplex bildet
- Zugabe von Chromogen-Substratlösung, wodurch das fixierte Enzym sichtbar wird

Hierzu erfolgt nach der Vorbehandlung die Auftragung von 1:20 verdünntem NIS-3 oder PDS1 – Antikörper (ca. 200 µl / Objektträger) und die Inkubation bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer. Die Objektträger werden nun mit PBS gespült und es wird verdünnter biotinylierter IgG Zweit-Antikörper (goat-anti-rabbit IgG 1:100 mit Antikörperverdünnungspuffer verdünnt) für 60 Min. bei Raumtemperatur zugegeben. Anschließendes Spülen mit PBS-Puffer und Auftrag des Streptavidin-alkalische Phosphatase (AP) – Konjugates (1:150 in PBS verdünnt) für 40 Min. bei Raumtemperatur. Erneutes Spülen mit PBS und Aufbringen von Chromogen-Substratlösung für AP. Inkubation ca. 50 Min. bei Raumtemperatur. Dadurch wird der Antikörper-Rezeptor-Komplex rot angefärbt. Zuletzt erfolgt ein Abgießen und Deckeln der Objektträger mit Glyceringelatine. Die Auswertung der zytochemischen Darstellung von NIS-3 und PDS-1 erfolgt durch Auszählen der markierten positiven Zellen unter dem Mikroskop.

3.10 Mykoplasmenachweis

Bei den vorliegenden Zellkulturen besteht die Möglichkeit einer Kontamination mit Mykoplasmen (Mollicutes). Es handelt sich hierbei um die kleinsten, selbstständig vermehrungsfähigen Bakterien, die die Möglichkeit besitzen Thymidin aufzunehmen. Wenn diese mitgemessen würden, könnten die Ergebnisse des Thymidineinbaus fälschlicherweise erhöht ausfallen. Allerdings besitzen die Mykoplasmen eine durchschnittliche Größe von 0,8 µm und der verwendete

Glasfaserfilter eine Porengröße von 1,5 µm. Aus diesem Grund dürften sie ungehindert die Poren des Filters passieren und somit die Messung nicht beeinflussen. Dennoch werden die Proben mittels Myco Alert Mycoplasma Detection Kit (Cambrex, USA) überprüft.

3.11 Facsanalyse (Durchflusszytometrie)

Zellaufbereitung und Zellernte für Apoptosemessung mittels FACS-Analyse nach der Methode von Nicoletti et al.(1991).

Das Messprinzip der FACS- Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung. Hierbei werden die mit Propidiumiodid (PI) angefärbten Zellproben in Form einer Suspension in die Trägerflüssigkeit eingebracht, welche kontinuierlich an einer Lichtquelle vorbeifließt. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit können die Zellen oder isolierte Zellkerne einzeln und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt werden. Die PI- positiven Zellkerne werden durch das Argon- Laserlicht (488 nm) angeregt, das Propidiumiodid emittiert dabei Fluoreszenzlicht (625 nm), welches von mehreren Photozellen aufgefangen werden kann. Zellkerne mit DNA- Fragmentierung (hypodiploider DNA) werden als apoptotisch betrachtet und können gut von Kernen mit normalem (diploidem) DNA- Gehalt unterschieden werden. Des Weiteren ist eine Differenzierung zu primär nekrotischen Zellen möglich, da es bei ihnen zu keiner DNA- Fragmentierung kommt. Ausschließlich sekundäre Nekrosen, welchen eine Apoptose vorausgeht, sind nicht mit der Nicoletti- Methode zu erfassen.

Von den malignen humanen Thyreozyten werden jeweils 100 µl aus einer Zellsuspension von 500 000 Zellen pro ml in ein Kulturloch einer 96- well- Platten ausgesät. Während der Aussaat werden entweder die zu testenden Redifferenzierungssubstanzen oder die Zellgifte Staurosporin oder H₂O₂ hinzu gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden werden die Zellen in den Kulturschalen zentrifugiert (7 min, 4 °C, 300 x g). Anschließend werden die Überstände dekantiert, die Zellen in 500 µl PBS- Puffer resuspendiert und in ein

Facsröhrchen überführt. Nach weiterem Zentrifugieren, Dekantieren und Resuspendieren werden die Thyreozyten mit einem hypotonen Puffer (Propidiumiodid (PI), 50µg/ml zusammen mit 0,1%igem Natrium- Zitratsäure und 0,1%igem TritonX-100 in destilliertem Wasser gelöst) lysiert und die Zellkerne sofort mit der Durchflusszytometrie analysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid lagert sich in die DNA des Zellkerns. Die Analyse wird mit dem FACS-Gerät, Modell („FACS Calibur“, Becton Dickson, Software: cellquest) durchgeführt.

Für die Auswertung der FACS-Analyse danke ich Frau Stephan aus der AG von Prof. Brossart, Abt. II, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen.

3.12 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse der ^{125}I -Iodid und ^3H -Thymidin-Aufnahme in Thyreozyten erfolgt nach der Benferroni-Holm-Methode. Signifikante Ergebnisse sind in den Graphiken durch rote Pfeile markiert, welche eine Alpha-Adjustierung nach Benferroni-Holm, getrennt nach Einbaustoff (Jod bzw. Thymidin), kennzeichnen. Da die Werte logarithmisch normal verteilt sind, werden die Berechnungen mit den Logarithmen durchgeführt. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Die Einbauraten werden nach logarithmischer Transformation mit einer Varianzanalyse mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkungen beschrieben.

Von den Versuchsreihen werden mehrere Ansätze durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung werden die jeweiligen Versuchsreihen zusammen betrachtet und die Werte von stimulierten Zellen immer mit der Kontrolle (unstimulierte Zellen) verglichen. Wenn also im Text von signifikanten Daten die Rede ist, so sind immer alle Ansätze einer Versuchsreihe berücksichtigt.

Für die Durchführung wird das Statistikprogramm JMP (Version 7.0.2) eingesetzt. Für die statistische Beratung danke ich Prof. Dr. Klaus Dietz, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

Die Statistik ist im Anhang aufgeführt. Des Weiteren finden sich dort Abbildungen, in denen die Einbauraten von ^{125}I -Iodid und ^3H -Thymidin aller Inkubationszeiten gemittelt wurden.

4. Ergebnisse

Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 42 und 43.

4.1 CGTH-W-1 Zelllinie

4.1.1 ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen

Maligne menschliche Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit verschiedenen Redifferenzierungssubstanzen während der Aussaat stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation.

Die Iodaufnahme in die Schilddrüsenzellen wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen und die Ergebnisse mit der Kontrolle verglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich zwischen den eingesetzten Konzentrationen angestrebt. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 1-3 dargestellt.

4.1.1.1 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Velcade®

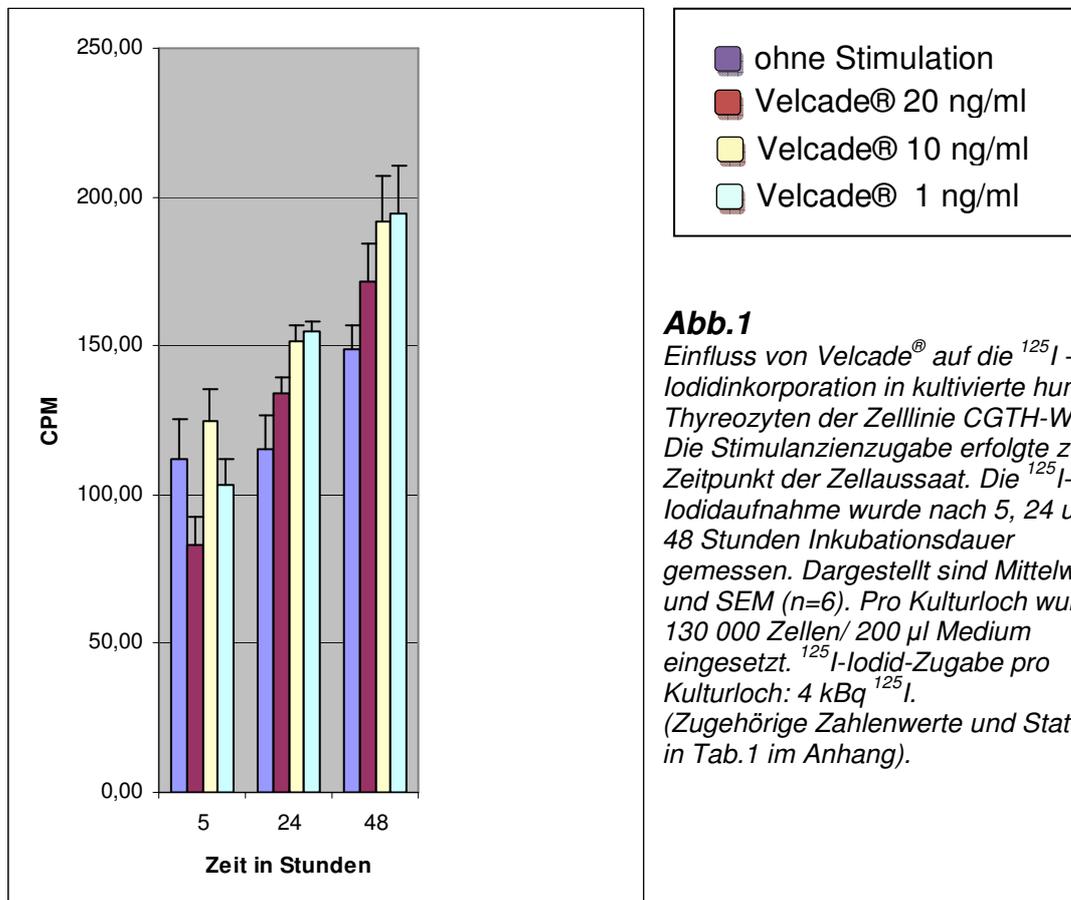


Abb.1
Einfluss von Velcade® auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. ^{125}I -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.1 im Anhang).

In Abb. 1 ist nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer unter Velcade® ein tendenziell leichter Anstieg der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen, der jedoch statistisch keine Signifikanz zeigt. Es fällt dabei auf, dass der Anstieg der Radioiodinkorporation umgekehrt proportional zur Substratkonzentration (20 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml) ist.

4.1.1.2 ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter Rapamycin

Abb. 2 zeigt die Radioiodidaufnahme in die malignen Zellen unter Rapamycin. Nach fünf stündiger Inkubationsdauer wird kein relevanter Einfluss der Redifferenzierungssubstanz beobachtet. Nach 24 Stunden lässt sich bereits ein leichter, statistisch nicht signifikanter, Rückgang der Radioiodinkorporation erkennen. Wie die Abbildung zeigt, kam es nach 48 Stunden im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu einer signifikant niedrigeren Iodidaufnahme unter 20 µM, 5 µM, 1 µM wie auch 0,5 µM Rapamycin. Dabei korreliert die Höhe der Rapamycinkonzentration nicht mit dem Rückgang der Inkorporation.

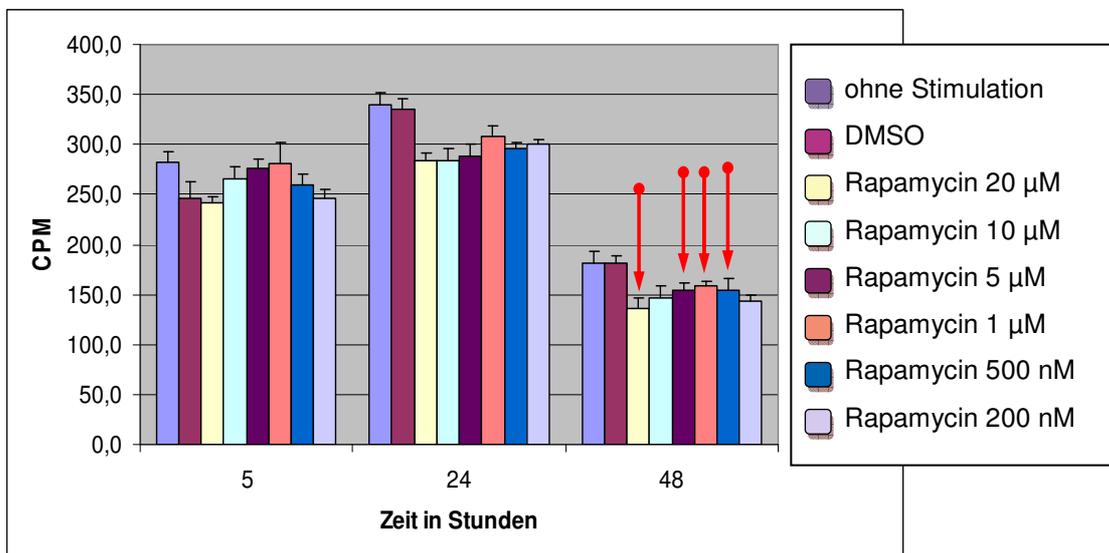


Abb.2 Einfluss von Rapamycin auf die ¹²⁵I-Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. ¹²⁵I-Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ¹²⁵I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.2 im Anhang). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit Pfeil markiert.

4.1.1.3 ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination

Die Abbildung 3a lässt nach 5, sowie nach 48 Stunden DTT-Stimulation in unterschiedlichen Konzentrationen einen tendenziellen Anstieg der ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten erkennen. Auch unter der Kombination mit 2 µM Arsentrioxid zeigt sich keine statistische Signifikanz. Allerdings ist nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der Iodidaufnahme bei folgenden Substanzkombinationen zu erkennen: 20 µM, 25 µM und 30 µM DTT unter Beimengung von 2 µM Arsentrioxid.

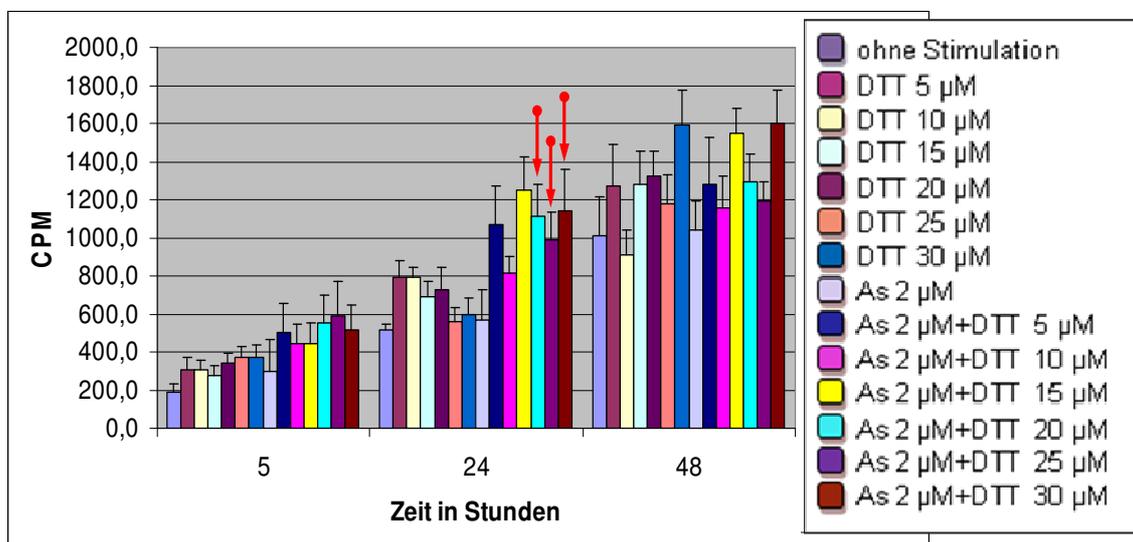


Abb.3a Einfluss von DTT und Arsentrioxid auf die ¹²⁵I-Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. ¹²⁵I-Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ¹²⁵I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.3 im Anhang). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit Pfeil markiert.

In Abbildung 3b sieht man nach 5 Stunden Inkubationszeit einen signifikanten Rückgang der ¹²⁵I-Iodidaufnahme bei folgenden Substanzkonzentrationen: 1 µM, 0,5 µM Arsentrioxid ohne DTT-Zusatz, 1 µM Arsentrioxid plus 15 µM DTT, 30 µM DTT sowie 0,5 µM Arsentrioxid plus 15 µM DTT, 30 µM DTT. Nach 24 Stunden Inkubationszeit lässt sich ein signifikanter Anstieg der

^{125}I -Iodidaufnahme erkennen unter 1 μM Arsentrioxid, 1 μM Arsentrioxid plus 15 μM DTT, 30 μM DTT sowie unter 0,5 μM Arsentrioxid plus 15 μM DTT. Nach 48 Stunden ist ein tendenzieller, nicht signifikanter Rückgang der ^{125}I -Iodidinkorporation zu verzeichnen.

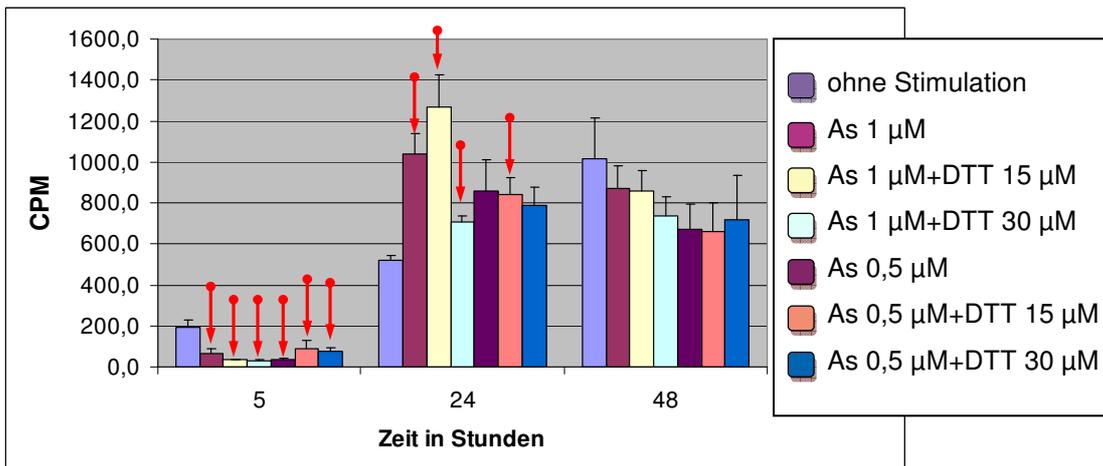


Abb.3b Einfluss von DTT und Arsentrioxid auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. ^{125}I -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.3 im Anhang). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit Pfeil markiert.

4.1.2 ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen

Den Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden Redifferenzierungssubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen während der Aussaat zugefügt und nun die ^3H -Thymidinaufnahme zu verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Die Versuchsbedingungen waren dieselben wie unter 4.1.1. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4-6 dargestellt.

4.1.2.1 ^3H -Thymidinaufnahme unter Velcade®

In Abb. 4 wurden die CGTH-W-1-Zellen mit Velcade® stimuliert. Nach 5, 24 und 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und die ^3H -Thymidininkorporation gemessen. Wie die Abbildung zeigt, kommt es bei keiner Zeit zu einem einheitlichen Anstieg oder Rückgang der ^3H -Thymidineinbaurrate, unabhängig von der Velcade®-Konzentration.

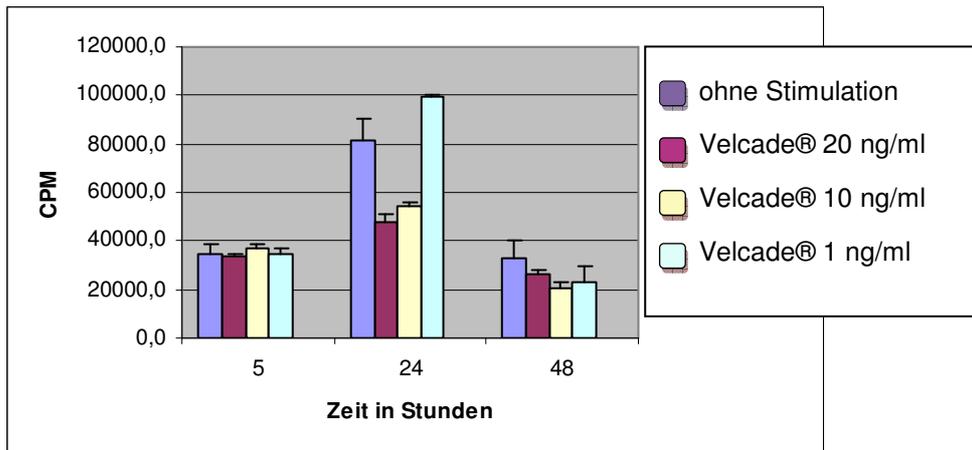


Abb.4 Einfluss von Velcade auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ($n=8$). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 μl Medium eingesetzt. ^3H -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ^3H . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.4 im Anhang).

4.1.2.2 ³H-Thymidinaufnahme unter Rapamycin

In Abb. 5 ist die Untersuchung von Rapamycin dargestellt. Unstimulierte maligne Thyreozyten dienten als Kontrolle. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten gemessen. Dabei kam es unter 20 µM, 10 µM, 5 µM und 1 µM nach 5 und 24 Stunden zu einem signifikanten konzentrationsabhängigen Rückgang des ³H-Thymidineinbaus im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48 Stunden Inkubationszeit zeigt sich ebenfalls ein signifikantes Absinken der ³H-Thymidinaufnahme unter Rapamycinkonzentrationen von 20 µM, 10 µM und 5 µM.

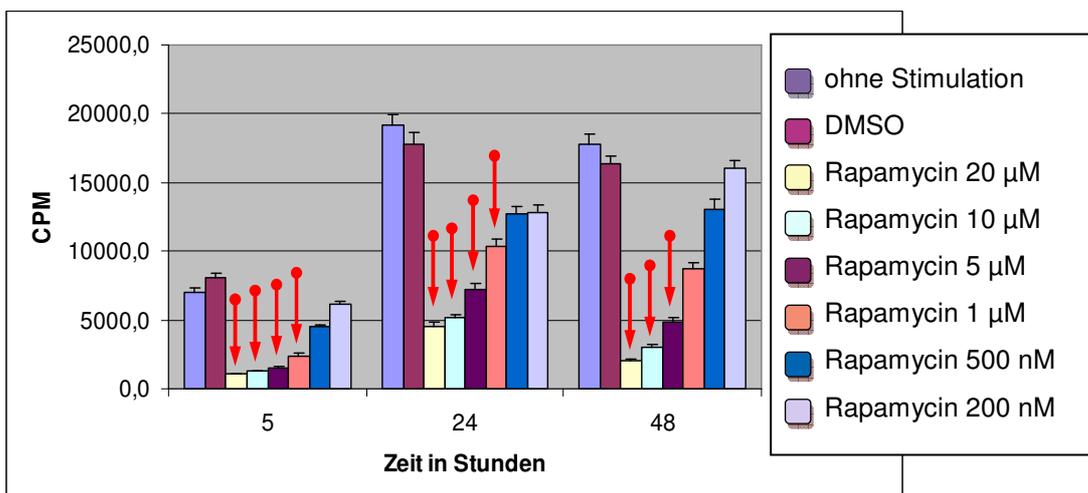


Abb.5 Einfluss von Rapamycin auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=8). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. ³H-Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ³H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.5 im Anhang). Signifikante Unterschiede zur Kontrolle sind mit Pfeil markiert.

4.1.2.3 ³H-Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination

Wie die Abbildungen 6a und 6b zeigen, lässt sich nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubation unter DTT oder Arsentrioxid sowie unter deren Kombination kein Unterschied in der ³H-Thymidinaufnahme im Vergleich zur Kontrolle erkennen.

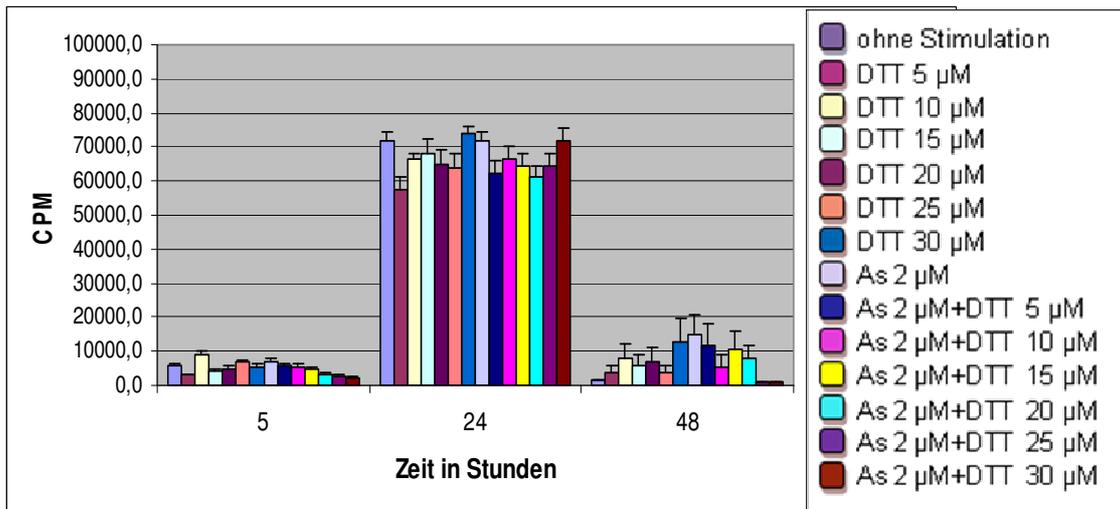


Abb.6a Einfluss von DTT und Arsentrioxid auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=8). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. ³H-Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ³H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.6 im Anhang).

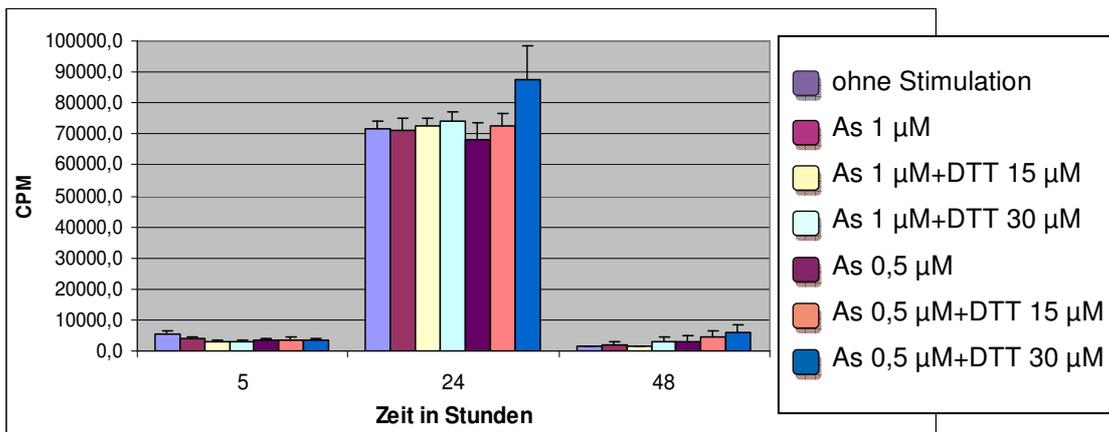


Abb.6b Einfluss von DTT und Arsenitrioxid auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ($n=8$). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 μl Medium eingesetzt. ^3H -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ^3H . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.6 im Anhang).

4.1.3 Immunocytochemischer Nachweis der Wirkung von potentiellen Redifferenzierungssubstanzen auf die NIS- und die Pendrin-Expression der Zelllinie CGTH-W-1

Zur Detektion von NIS und Pendrin wurden immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung von anti-NIS-3- und anti-PDS-1-Antikörpern durchgeführt. Mittels der Avidin-Biotin-Technik, die im Methodenteil dieser Arbeit erklärt wurde, erfolgte die Darstellung der Immunreaktion. Die Zellausstriche wurden qualitativ ausgewertet.

Die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit Velcade® (20 ng/ml, 10 ng/ml, 1 ng/ml), Rapamycin (20 μM , 10 μM , 5 μM , 1 μM , 500 nM, 200 nM) und DTT (5 μM , 10 μM , 15 μM , 20 μM , 25 μM , 30 μM) in Kombination mit Arsenitrioxid (2 μM , 1 μM , 0,5 μM) stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Zellen, wie sie in Abbildung 7 zu sehen sind. Es zeigen sich hier die typischen Tumorzellmerkmale: großer Nukleus, große Nukleoli. Die immunhistochemischen Nachweise mit Antikörpern gegen

das darzustellende Antigen wurden nach 24- und 48-stündiger Stimulation der CGTH-W-1 Zellen vorgenommen.

Die Beurteilung der Farbintensität wurde nach folgender etablierter Einteilung vorgenommen:

keine Anfärbung	keine Proteinexpression
sehr schwache Anfärbung	1 – 20 %
schwache Anfärbung	21 – 30 %
mäßige Anfärbung	31 – 60 %
starke Anfärbung	> 60 %

der Zellen exprimieren NIS-3 bzw. PDS-1

4.1.3.1 Photographische Darstellung

Im Folgenden sind die aussagekräftigsten Bilder von Zellausstrichen mit kanzerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, welche mit den anti-NIS-3- und PDS-1-Antikörpern immunhistochemisch untersucht wurden, dargestellt.

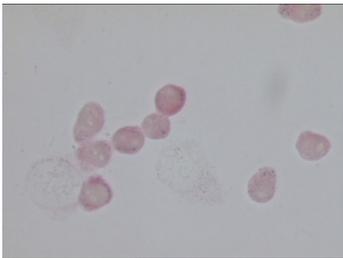


Abb.7 Unstimulierte
Aussaat
30% der Zellen Pendrin +

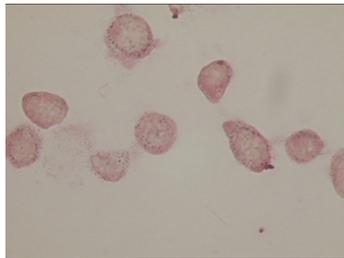


Abb.8 Velcade 20 ng/ml
24h
40% der Zellen NIS +

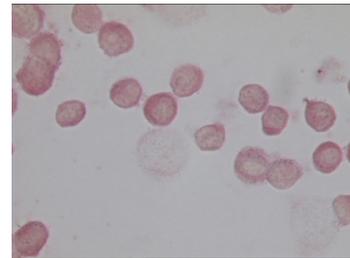


Abb.9 Rapamycin 10 μ M
24h
40% der Zellen NIS +

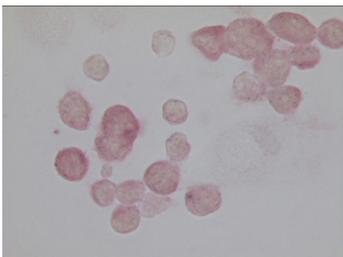


Abb.10 Rapamycin 10 μ M
24h
30% der Zellen Pendrin +

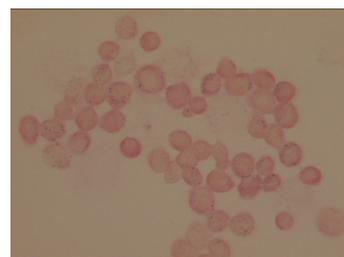


Abb.11 DTT 5 μ M +
ATO 2 μ M
24h
30% der Zellen Pendrin +

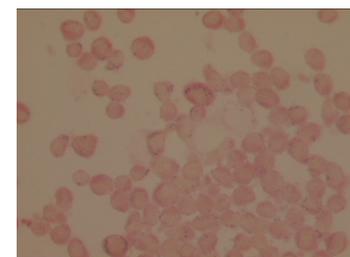


Abb.12 DTT 15 μ M
48h
20% der Zellen NIS +

Abb.7-Abb.12: Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin bei CGTH-W-1- Thyreozyten, die 24h und 48h mit Velcade® oder Rapamycin stimuliert wurden. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrolle

4.1.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei 30% der unstimulierten Zellen kann Pendrin direkt bei der Aussaat nachgewiesen werden. Ein Nachweis von NIS mit Hilfe des NIS-3-Antikörpers lässt sich nach 24-stündiger Stimulation mit Velcade® (20 ng/ml) bei 40 % der Thyreozyten nachweisen. Bei den kanzerogenen Thyreozyten lässt sich nach 24-stündiger Stimulation mit Rapamycin (10 μ M) eine mäßig starke Anfärbung

des NIS mit dem NIS-3-Antikörper nur bei 40 % der Zellen und des Pendrins mit dem PDS-1-Antikörper nur bei 30 % der Zellen nachweisen.

Auch die Kombination aus DTT und Arsentrioxid induziert nach einer Inkubationsdauer von 24 und 48 Stunden weder eine überdurchschnittlich starke Expression des NIS-3- noch des PDS-Antigens in den Thyreozyten. Nach 24 Stunden zeigen 30% der Zellen, die mit 5 μ M DTT plus 2 μ M Arsentrioxid stimuliert wurden, eine Anfärbung mit dem PDS-1-Antikörper. Durch eine 48-stündige Inkubation der Thyreozyten mit 15 μ M DTT ohne Arsentrioxidzusatz wird das NIS noch weniger stark exprimiert. Hier zeigten nur 20 % der Zellen eine entsprechende Anfärbung.

4.1.4 Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin in den kanzerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mittels Westernblot

Die kanzerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden in unterschiedlichen Konzentrationen mit Velcade®, Rapamycin und DTT, letztere Substanz auch in Kombination mit Arsentrioxid, für 24 oder 48 Stunden inkubiert. Als Kontrollgruppe dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurden die extrahierten Proteine auf eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker lief ein high molecular weight marker (HMW, Amersham Biosciences) mit. Dieser Proteinstandard enthält die Proteine Myosin (220000 Dalton), α 2-Macroglobulin (170000 Dalton), β -Galactosidase (116000 Dalton), Transferrin (76000 Dalton) und Glutamat-Dehydrogenase (53000 Dalton). Der zu bestimmende Natrium-Iodid-Symporter hat ein Molekulargewicht von 80000 – 90000 Dalton; das Molekulargewicht von Pendrin liegt bei 110000 – 120000 Dalton.

4.1.4.1 Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mit Velcade®

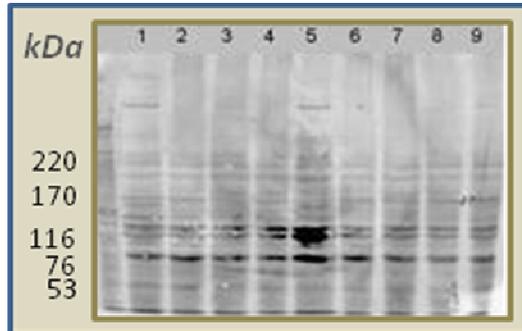


Abb.13 Blot 1 (NIS)

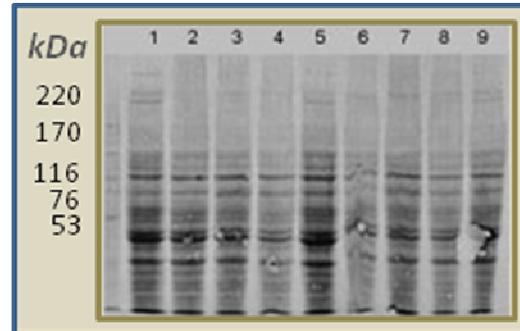


Abb.14 Blot 2 (Pendrin)

Abb.13-Abb.14: Westernblot zum Nachweis des NIS und Pendrin – Antigens bei CGTH-W-1-Thyreozyten, die 24h und 48h mit Velcade® vorbehandelt wurden

Spuren-Nummerierung:

0: HMW

1: ohne Stimulation bei der Aussaat

2: ohne Stimulation nach 24h

3: Velcade® 20 ng/ml nach 24h

4 Velcade® 10 ng/ml nach 24h

5: Velcade® 1 ng/ml nach 24h

6: ohne Stimulation nach 48h

7: Velcade® 20ng/ml nach 48h

8: Velcade® 10ng/ml nach 48h

9: Velcade® 1ng/ml nach 48h

Auf dem mit anti-NIS-3 immunmarkierten Blot sind unter allen getesteten Stimulanzen einschließlich der Kontrollgruppe Banden zu sehen. Unter den unstimulierten Zellen zeigen jene nach 48 stündiger Inkubationsdauer die am stärksten ausgeprägte Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa. Unter Velcade® 20 ng/ml ist hinsichtlich der Bandenausprägung kein Unterschied zu den unstimulierten Zellen zu sehen, was bedeutet, dass Velcade® sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden

Inkubationszeit keinen stimulierenden Effekt in Bezug auf die NIS-Expression zeigt. Der anschließend mit anti-PDS1 immunmarkierte Blot zeigt eine etwas

intensivere Bandenbildung bei 116000 Dalton, wenn die Thyreozyten für 24 Stunden mit Velcade® 1 ng/ml stimuliert werden. Die übrigen untersuchten Substanzkonzentrationen haben keinen relevanten Einfluss auf die Pendrinexpression.

4.1.4.2 Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mit Rapamycin

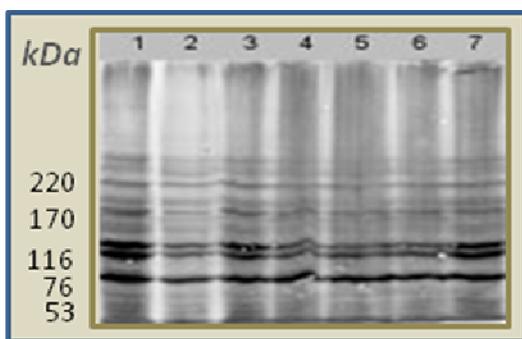


Abb.15 Blot 1 (NIS)

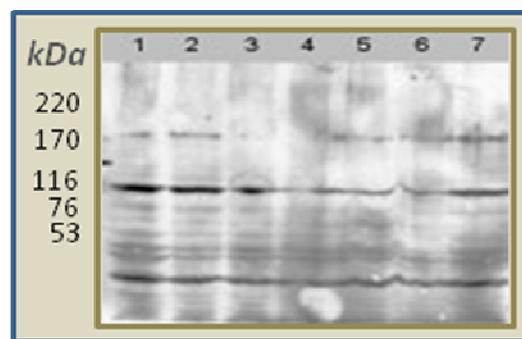


Abb.16 Blot 2 (Pendrin)

Abb.15-Abb.16: Westernblot zum Nachweis des NIS und Pendrin – Antigens bei CGTH-W-1-Thyreozyten, die 24h und 48h mit Rapamycin vorbehandelt wurden

Spuren-Nummerierung:

- 0: HMW
- 1: ohne Stimulation bei der Aussaat
- 2: ohne Stimulation nach 24h
- 3: ohne Stimulation nach 48h
- 4: Lösungsmittel DMSO nach 24h
- 5: Lösungsmittel DMSO nach 48h
- 6: Rapamycin 20 μ M nach 24h
- 7: Rapamycin 20 μ M nach 48h

Auf dem mit anti-NIS-3 immunmarkierten Blot sind unter allen getesteten Stimulanzen einschließlich der Kontrollgruppe Banden zu sehen. Unter den stimulierten Zellen findet sich die breiteste Bande entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa nach einer 48 stündigen Inkubation mit Rapamycin 20 μ M. Auch auf dem anti-PDS1 markierten Blot sind überall Banden zu sehen, doch zeigen hier die Proteine der unstimulierten Zellen die stärkste Pendrinexpression.

4.1.4.3 Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 mit DTT und Arsentrioxid sowie mit deren Kombination

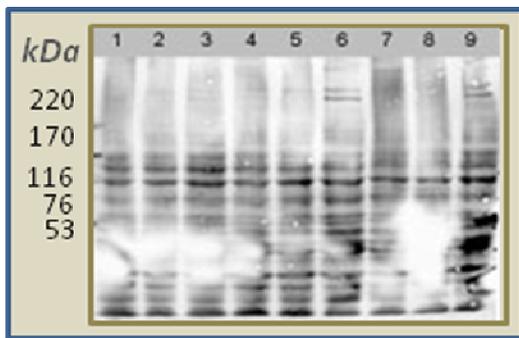


Abb.17 Blot 1 (NIS)

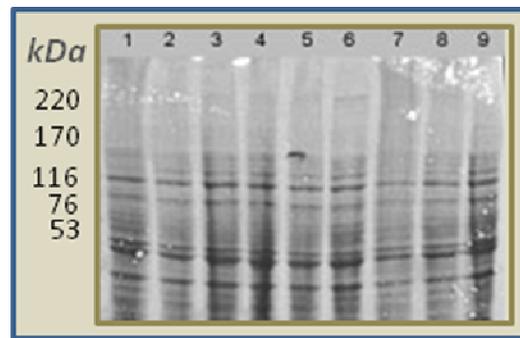


Abb.18 Blot 2 (Pendrin)

Abb.17-Abb.18: Westernblot zum Nachweis des NIS und Pendrin – Antigens bei CGTH-W-1-Thyreozyten, die 24h und 48h mit DTT und Arsentrioxid, sowie mit deren Kombination vorbehandelt wurden

Spuren-Nummerierung:

0: HMW

1: ohne Stimulation bei der Aussaat

2: ohne Stimulation nach 24h

3: Arsentrioxid 2 μ M nach 24h

4: DTT 15 μ M nach 24h

5: DTT 15 μ M plus Arsentrioxid 2 μ M nach 24h

6: ohne Stimulation nach 48h

7: Arsentrioxid 2 μ M nach 48h

8: DTT 30 μ M nach 48h

9: DTT 15 μ M plus Arsentrioxid 2 μ M nach 48h

Auf dem mit anti-NIS-3 immunmarkierten Blot sind unter allen getesteten Stimulanzen einschließlich der Kontrollgruppe Banden zu sehen.

Vergleicht man die unstimulierten Zellen mit den Thyreozyten die unter der Stimulation von Arsentrioxid, DTT sowie deren Kombination standen, so fällt bei einem Molekulargewicht von ca. 90 kDa eine deutlich schwächer ausgeprägte Bande auf. Unter Arsentrioxid allein ist hinsichtlich der Bandenausprägung kein Unterschied zu den mit Arsentrioxid und DTT stimulierten Zellen zu sehen, was bedeutet, dass die Kombination aus beiden Substanzen auch nach 48 Stunden Inkubationszeit keinen weiteren stimulierenden Effekt in Bezug auf die NIS-Expression zeigt.

Der anschließend mit anti-PDS-1 immunmarkierte Blot zeigt hingegen die stärkste Bandenbildung nach 48 Stunden unter einer Stimulation mit DTT 15 μM plus Arsentrioxid 2 μM bei einem Molekulargewicht von ca. 110 kDa.

4.1.5 Beeinflussung der Apoptoserate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene potentielle Differenzierungssubstanzen

Die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 werden mit Velcade®, Rapamycin und DTT plus Arsentrioxid in verschiedenen Konzentrationen stimuliert, um eine darunter ausgelöste Apoptose zu erfassen. Nach 24 und 48 Stunden Stimulation wird der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers gemessen. Als Negativ-Kontrolle dienen unstimulierte Zellen. Für die Positiv-Kontrollen werden die Zellgifte Staurosporin und H_2O_2 eingesetzt, die höhere Raten an apoptotischen Zellen bewirken.

4.1.5.1 Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Velcade®

Bei der Negativ-Kontrolle liegt die Apoptoserate nach 24 Stunden bei 4%. Unter Staurosporin (2,5 μM) liegt die Apoptoserate bei 16% und unter H_2O_2 (1M) liegt der entsprechende Wert bei 60%.

Unter Velcade® steigt nach 24-stündiger Inkubationsdauer die Zahl der apoptotischen Zellen an. Die Apoptoserate der mit Velcade® (1 ng/ml) stimulierten Schilddrüsenzellen liegt zu diesem Zeitpunkt bei 8%, mit Velcade® (10 ng/ml) bei 5% und mit Velcade® (20 ng/ml) sogar bei 13%.

Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle bei 15%. Unter H₂O₂ liegt die Apoptoserate bei 68%, unter Staurosporin liegt sie bei 38%.

Die Differenzierungssubstanz Velcade® bewirkt im Vergleich zur Negativ-Kontrolle keine gesteigerte Apoptose denn, die Apoptoserate liegt bei der Konzentration 20 ng/ml bei 9%. Velcade® 10 ng/ml führt zu einer Apoptoserate von 11% und unter Velcade® 1 ng/ml findet sich bei 2% der Thyreozyten eine Apoptose. Die einzelnen Ergebnisse sind in Abbildung 19 zusammengestellt.

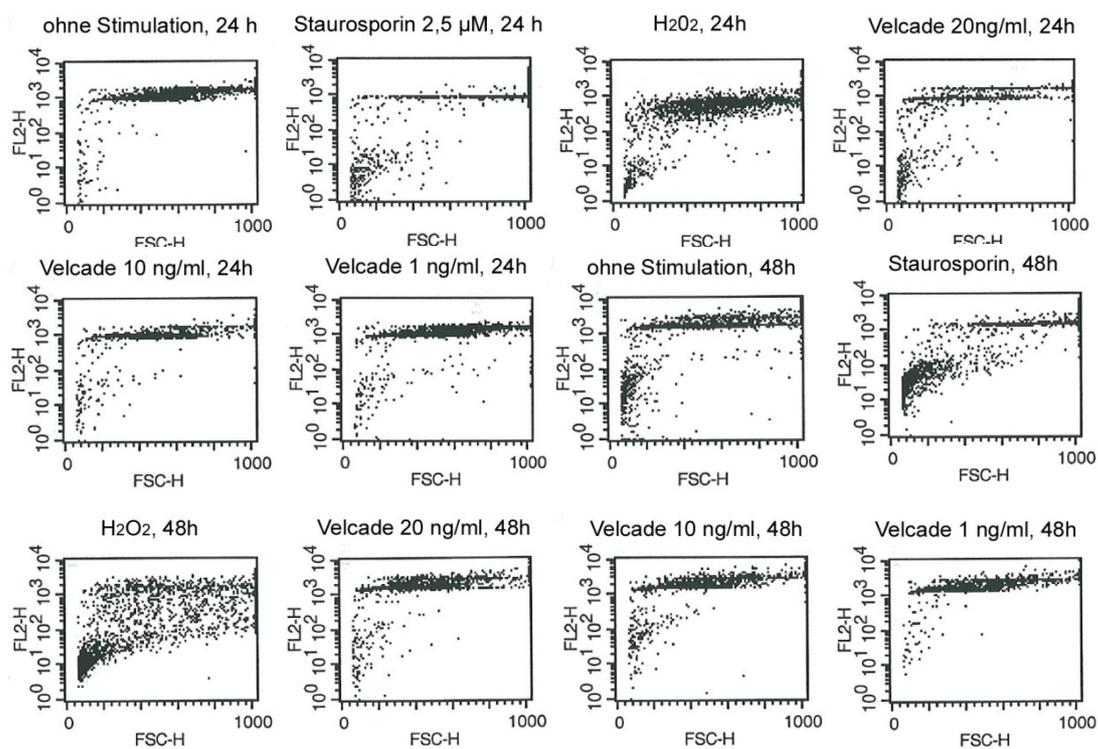


Abb.19 Einfluss von Velcade(20,10 und 1 ng/ml), H₂O₂ und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen. In den Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab.7 im Anhang).

4.1.5.2 Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Rapamycin

Bei der Negativ-Kontrolle liegt die Apoptoserate nach 24 Stunden bei 8%.

Staurosporin (2,5 μM) induziert eine Apoptoserate bei 13% und unter H_2O_2 (1M) liegt der entsprechende Wert bei 20%.

Mit Rapamycin ist nach 24-stündiger Inkubationsdauer bei den Thyreozyten ein leichter Anstieg der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nur bei der Konzentration von 200 nM zu erzielen. Die Apoptoserate erreicht 10%. Die Apoptoseraten unter den restlichen Rapamycin-Konzentrationen (100 nM, 50 nM, 10nM) liegen bei 4%.

Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle bei 3%. Unter H_2O_2 liegt die Apoptoserate bei 48%, unter Staurosporin liegt sie bei 25%.

Nach 48 Stunden bewirkt Rapamycin im Vergleich zur Negativ-Kontrolle wie bereits nach 24h eine nur minimal gesteigerte Apoptose bei der Konzentration von 200 nM. Der Wert beträgt 5%. Die restlichen Konzentrationen (100 nM, 50 nM, 10 nM) bewirken Apoptoseraten von unter 3%. Die einzelnen Ergebnisse sind in Abbildung 20 zusammengestellt.

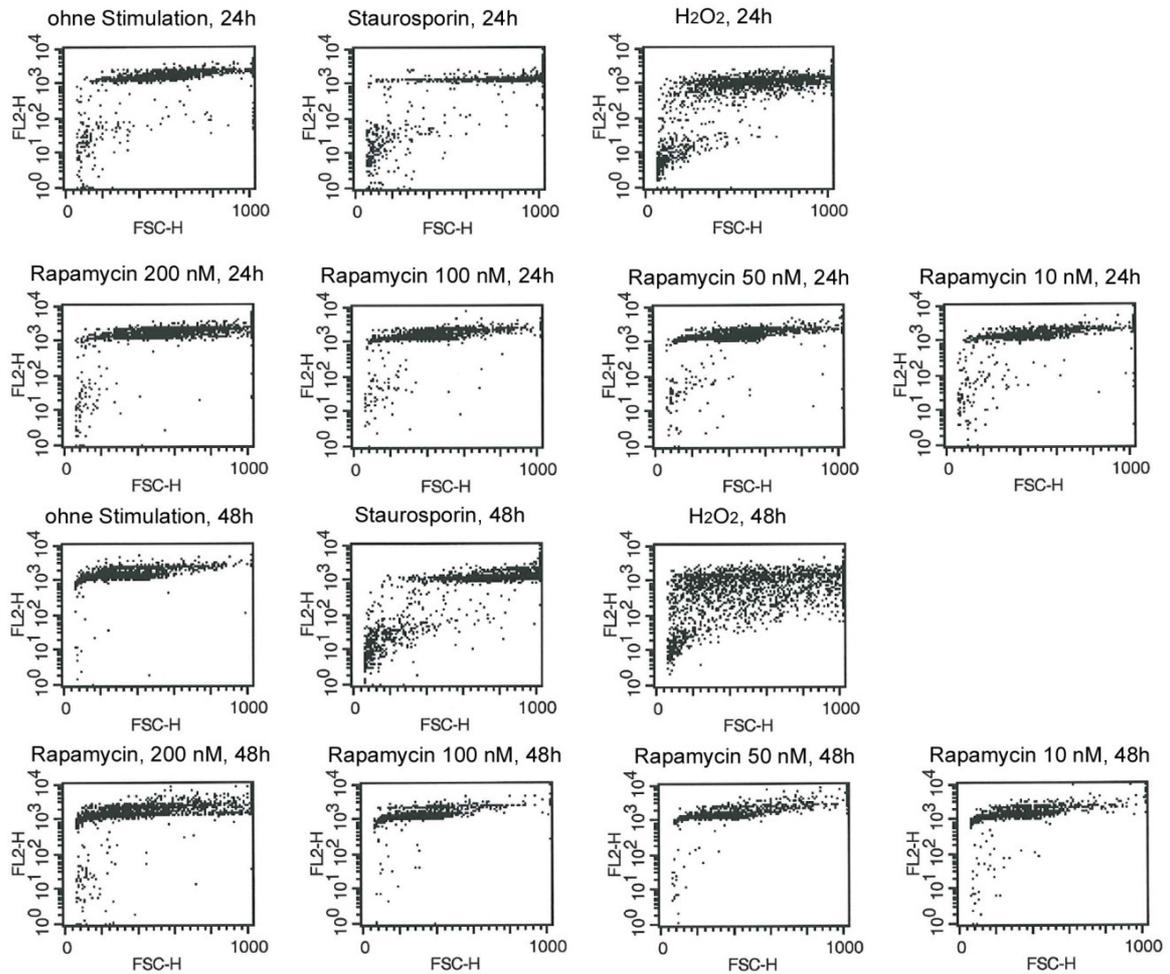


Abb. 20 Einfluss von Rapamycin(200, 100, 50 und 10 nM), H₂O₂ und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen. In den Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab.8 im Anhang).

4.1.5.3 Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit DTT und Arsentrioxid sowie nach deren Kombination

Hier liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle nach 24 Stunden bei 8%. Nach Stimulation mit Staurosporin liegt die Apoptoserate bei 30%. Mit DTT alleine ist nach 24-stündiger Inkubationsdauer kein Anstieg der apoptotischen Zellen zu erkennen. Die Apoptoserate liegt sowohl bei der Konzentration von 10 μM als auch 30 μM bei 6%. Nach 24-stündiger Stimulation mit 2 μM Arsentrioxid wird eine Apoptoserate von 11% erreicht. Auch die Kombination von 2 μM Arsentrioxid und DTT (10 μM , 30 μM) führt zu keiner Erhöhung der Apoptoserate (6%, 7%).

Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle bei 17%. Unter Staurosporin, welches als Positiv-Kontrolle dient, liegt sie bei 44%. Nach Stimulation der Thyreozyten mit 10 μM DTT kommt es zu diesem Zeitpunkt bei 15% der Zellen zu einer Apoptose, 30 μM DTT bewirken eine Apoptoserate von 27%. Die Stimulation mit 2 μM Arsentrioxid zeigt eine Erhöhung der Apoptose auf 40%.

Eine ähnlich hohe Apoptosenrate wird nach Stimulation mit Arsentrioxid (2 μM) zusammen mit DTT gemessen. Beträgt bei der kombinierten Stimulation die DTT- Konzentration 10 μM , so liegt die Apoptoserate bei 43%, beträgt sie 30 μM , so liegt sie bei 40%.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 zusammengefasst.

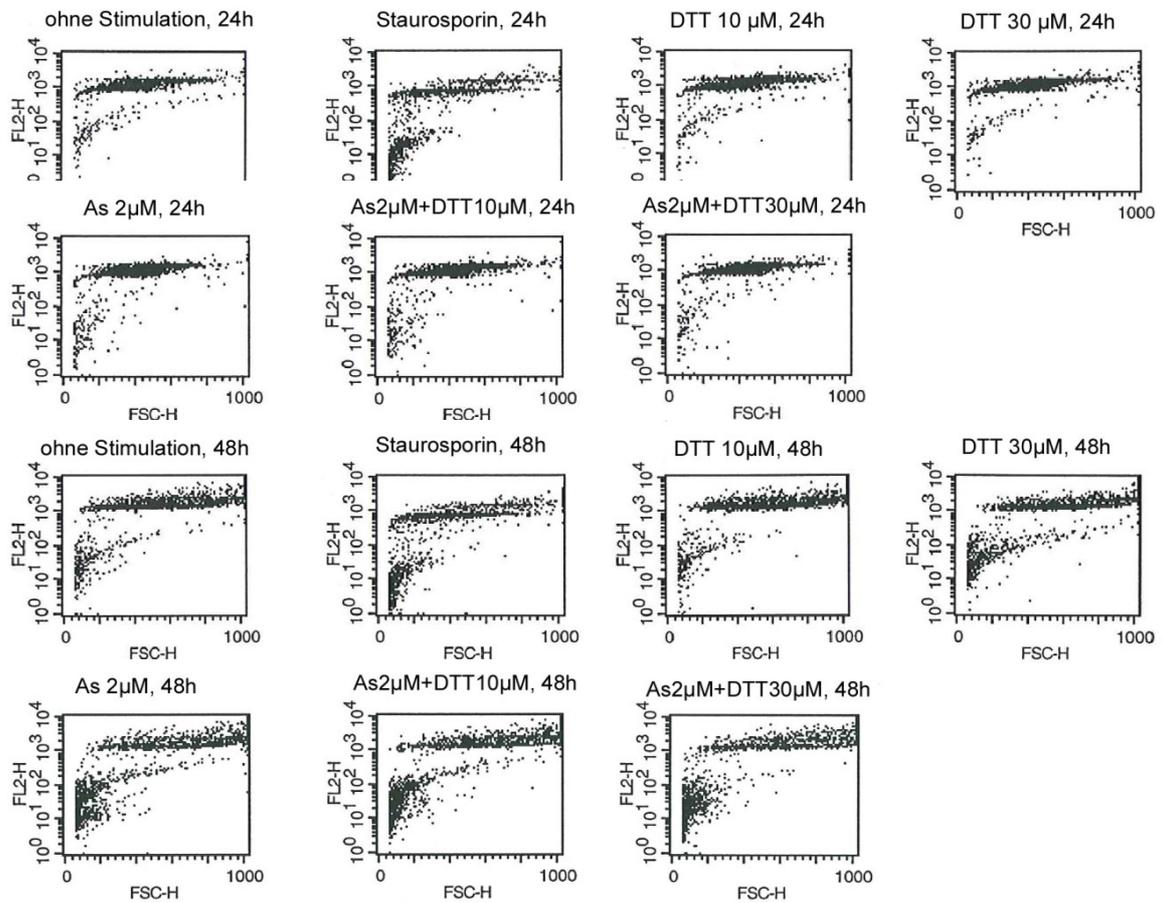


Abb. 21 Einfluss von DTT (10, 30 μ M), As 2 μ M, As 2 μ M + DTT (10 μ M, 30 μ M) und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen. In den Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab.9 im Anhang).

4.2 ONCO-DG-1 Zelllinie

4.2.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen

Maligne menschliche Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 wurden mit verschiedenen Redifferenzierungssubstanzen während der Aussaat stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation.

Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Schilddrüsenzellen wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen und die Ergebnisse mit der Kontrolle verglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich zwischen den eingesetzten Konzentrationen angestrebt. Die Ergebnisse werden in den Abbildungen 22-24 dargestellt

4.2.1.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter Velcade®

In Abb. 22 ist nach 5 und 24 Stunden Inkubationsdauer unter Velcade® ein tendenziell leichter Anstieg der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen, der jedoch statistisch keine Signifikanz zeigt. Nach 48 Stunden ist ein tendenzieller Abstieg der Radioiodaufnahme zu erkennen.

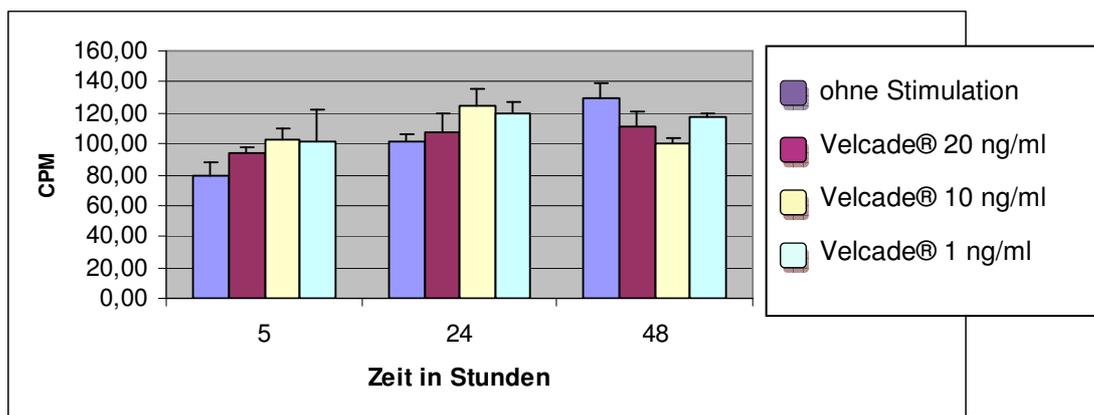


Abb.22 Einfluss von Velcade® auf die ¹²⁵I-Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO–DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. ¹²⁵I-Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ¹²⁵I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.10 im Anhang)

4.2.1.2 ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter Rapamycin

Abbildung 23 zeigt die Radioiodaufnahme in die ONCO-DG-1 Zellen unter dem Einfluss von Rapamycin. Nach fünfstündiger Inkubationsdauer wird ein statistisch relevanter Einfluss dieser Substanz beobachtet. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter Rapamycin erhöht sich bei folgenden Konzentrationen: 5 nM, 10 nM, 50 nM und 100 nM. Nach 24 sowie 48 Stunden wird kein relevanter Unterschied zur Kontrolle beobachtet.

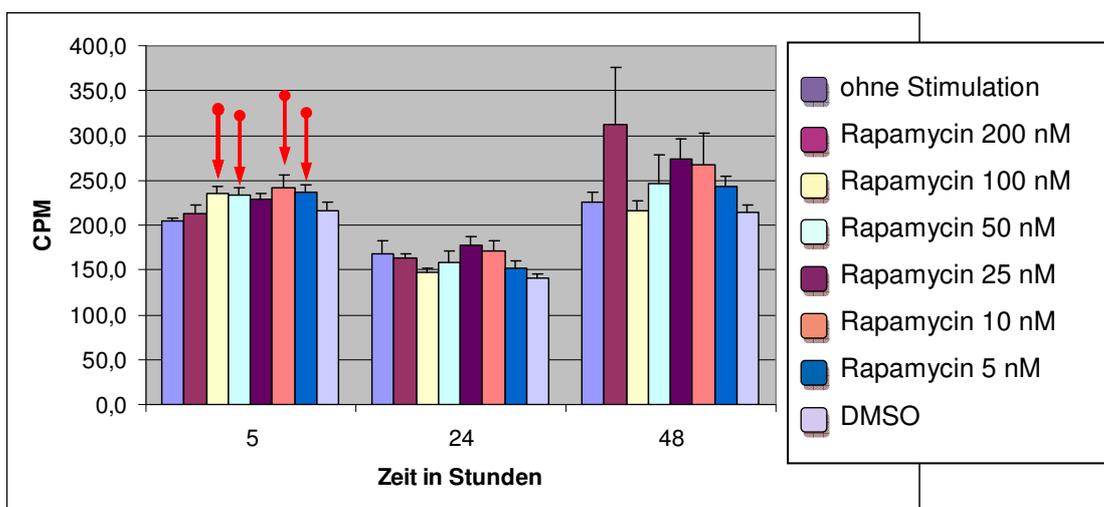


Abb.23 Einfluss von Rapamycin auf die ¹²⁵I-Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO-DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. ¹²⁵I-Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ¹²⁵I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.11 im Anhang). Signifikante Werte sind mit Pfeil markiert).

4.2.1.3 ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination

In Abbildung 24a ist nur nach 24 stündiger Inkubationszeit eine statistisch signifikante Erhöhung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss folgender Substanzkombinationen zu erkennen: 2 µM Arsentrioxid plus 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM und 30 µM DTT.

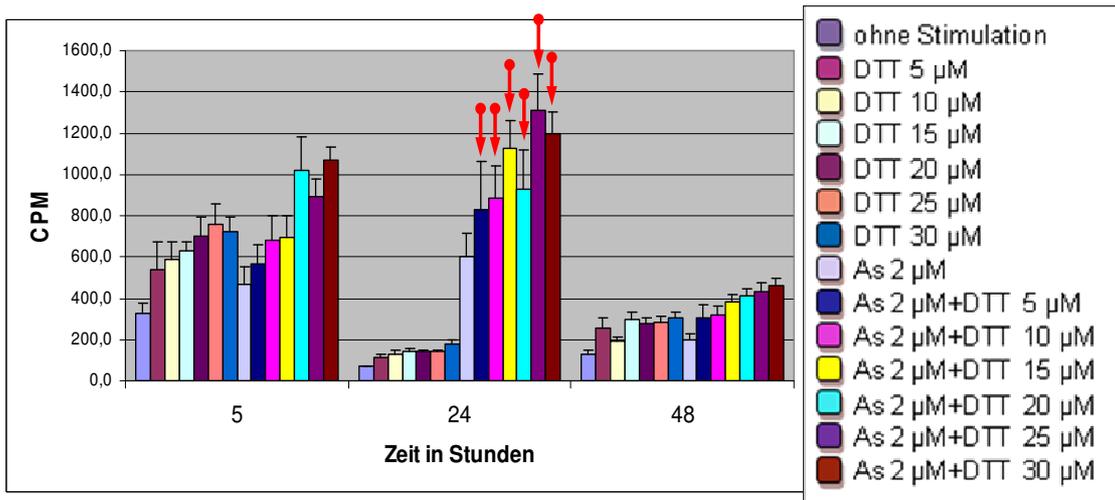


Abb.24a Einfluss von DTT und Arsenitrioxid auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO-DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ($n=6$). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. ^{125}I -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.12 im Anhang). Signifikante Werte sind mit Pfeil markiert).

Die in Abbildung 24b dargestellten Medikamenteneinflüsse bewirken in der Radioiodaufnahme keine relevanten Unterschiede zur Kontrolle.

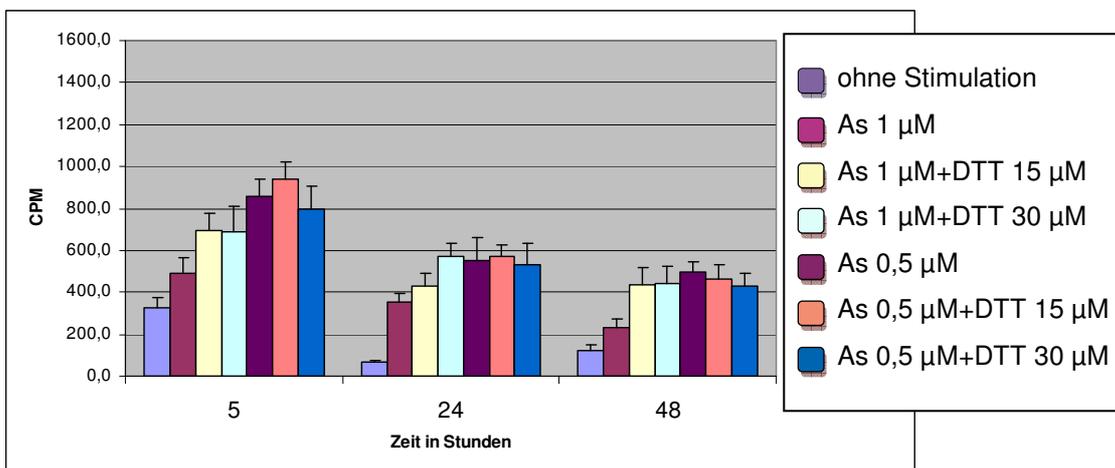


Abb.24b Einfluss von DTT und Arsenitrioxid auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO-DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ($n=6$). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. ^{125}I -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.12 im Anhang).

4.2.2 ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen potentiellen Redifferenzierungssubstanzen

Den Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 wurden Redifferenzierungssubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen während der Aussaat zugefügt und nun die ³H-Thymidinaufnahme zu verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Die Versuchsbedingungen sind dieselben wie unter 4.1.1. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 25-27 dargestellt.

4.2.2.1 ³H-Thymidinaufnahme unter Velcade®

In Abb. 25 ist die Untersuchung von Velcade® dargestellt. Unstimulierte maligne Thyreozyten dienen als Kontrolle. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die ³H-Thymidinaufnahme gemessen. Dabei kommt es unter einer Konzentration von 20 ng/ml Velcade® nach 24 stündiger Inkubationszeit zu einem signifikanten Rückgang des ³H-Thymidineinbaus im Vergleich zur Kontrolle, wobei mit sinkender Velcade®konzentration ein tendenzieller Anstieg der ³H-Thymidinaufnahme zu beobachten ist.

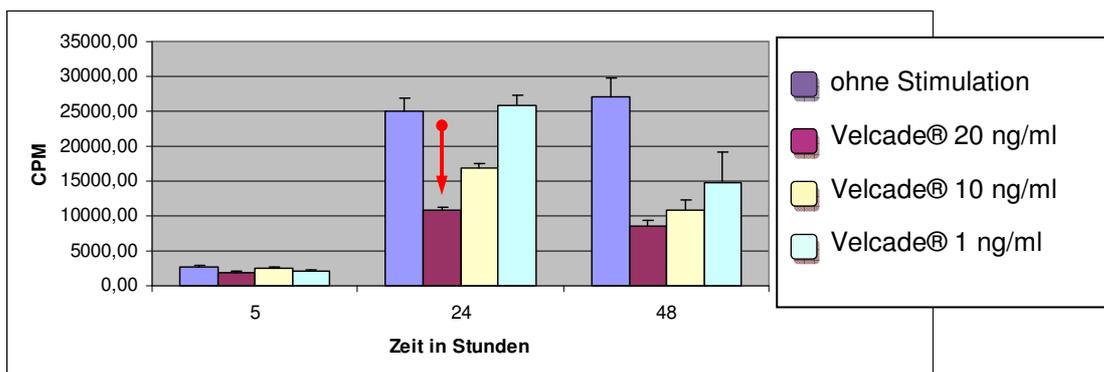


Abb.25 Einfluss von Velcade® auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO-DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=8). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt ³H-Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ³H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.13 im Anhang). Signifikante Werte sind mit Pfeil markiert).

4.2.2.2 ³H-Thymidinaufnahme unter Rapamycin

Abbildung 26 zeigt die Versuchsergebnisse unter Rapamycin. Thyreozyten ohne jegliche Stimulation erfüllen die Aufgabe als Kontrolle. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wird die ³H-Thymidininkorporation gemessen. Dabei kommt es unter 20 µM Rapamycin zu einer signifikanten Abnahme der ³H-Thymidininkorporation bei allen Inkubationszeiten. Unter 10 µM Rapamycin kommt es nur nach 5 Stunden Inkubationszeit zu einer signifikant erniedrigten Thymidinaufnahme.

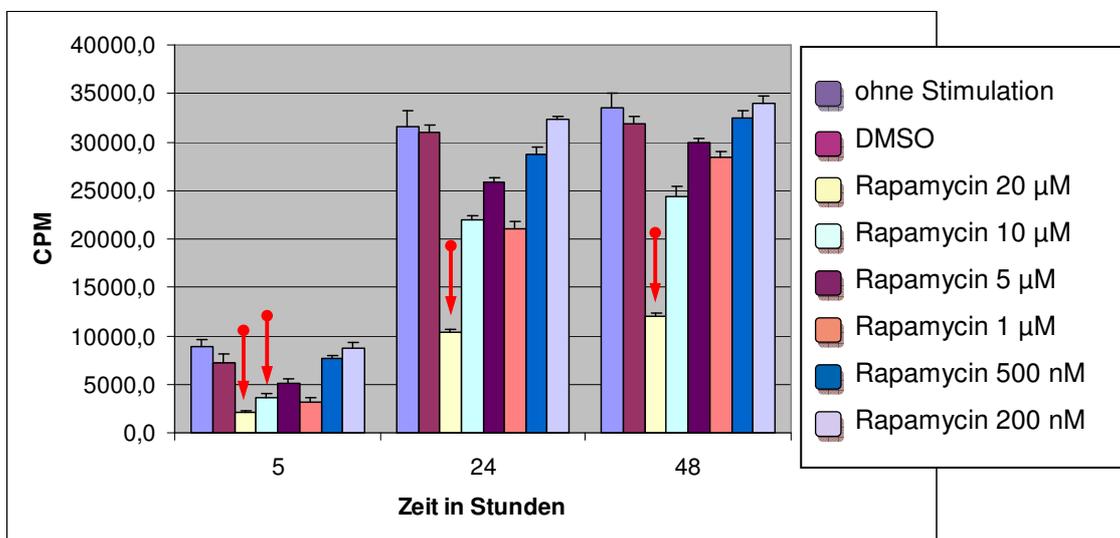


Abb.26 Einfluss von Rapamycin auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO-DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=8). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. ³H-Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ³H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.14 im Anhang). Signifikante Werte sind mit Pfeil markiert).

4.2.2.3 ³H-Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination

Transformierte humane Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 werden mit 5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM und 30 µM DTT und jeweils auch in Kombination mit 2 µM, 1 µM und 0,5 µM Arsentrioxid stimuliert. Eine signifikante Erhöhung der Thymidinaufnahme im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ergibt sich nur bei Zusatz von 20 µM DTT nach 5 stündiger Inkubation. Nach 48 stündiger Inkubation kommt es zu einer statistisch relevanten Abnahme der Thymidininkorporation unter Stimulation mit 10 µM und 15 µM DTT.

Arsentrioxid sowie die Kombination aus Arsentrioxid mit DTT bewirkt zu keiner Messzeit eine signifikante Änderung in der Thymidinaufnahme.

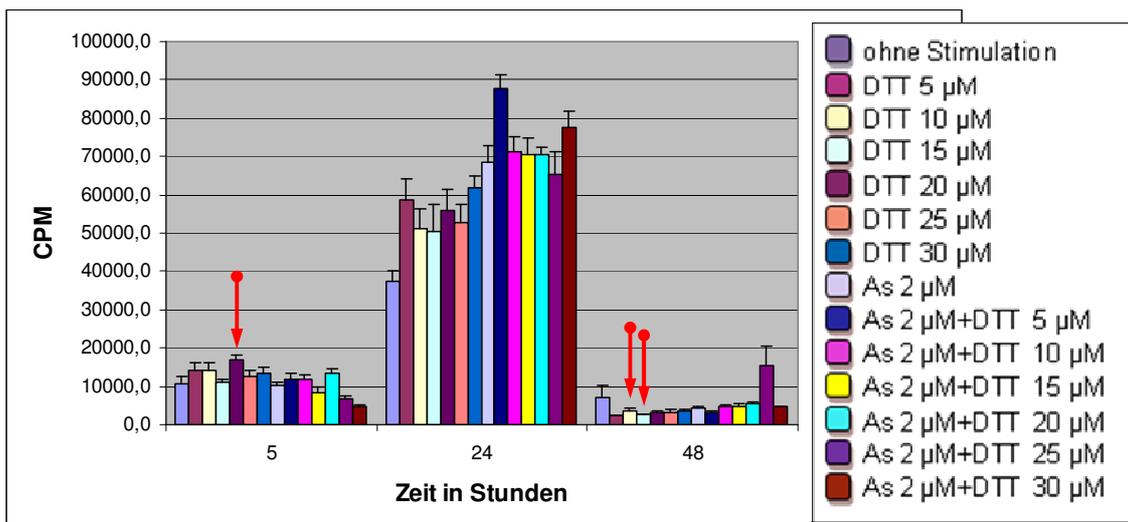


Abb.27a Einfluss von DTT und Arsentrioxid auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO-DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=8). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. ³H- Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ³H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.15 im Anhang). Signifikante Werte sind mit Pfeil markiert).

In Abbildung 27b sind keine statistisch relevanten Ergebnisse zu sehen.

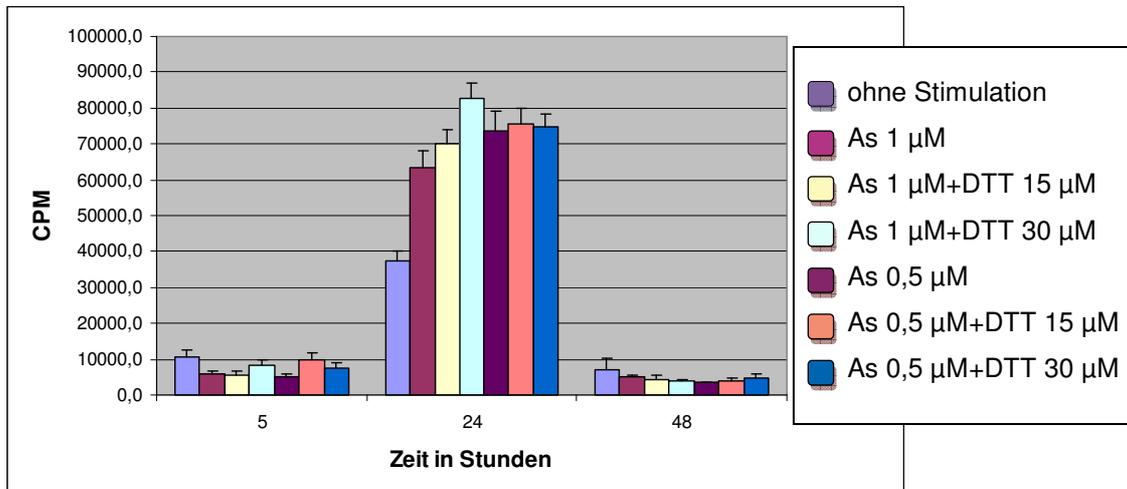


Abb.27b Einfluss von DTT und Arsenitoxid auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (ONCO-DG-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach 5, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ($n=8$). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 μl Medium eingesetzt. ^3H -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq ^3H . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.15 im Anhang).

4.2.3 Immunocytochemischer Nachweis der Wirkung von potentiellen Redifferenzierungssubstanzen auf die NIS- und die Pendrin-Expression in der Zelllinie ONCO-DG-1

Die Versuchsbedingungen sind die gleichen wie unter 4.1.3 beschrieben. Hier werden die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mit Velcade® und Rapamycin in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Als Kontrollgruppen dienen unstimulierte Zellen. Der immunhistochemische Nachweis mit Antikörpern gegen das jeweils darzustellende Antigen erfolgt nach 24-stündiger Stimulation.

4.2.3.1 Photographische Darstellung

Im Folgenden sind die aussagekräftigsten Bilder von Zellausstrichen mit cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1, welche mit den anti-NIS-3- und PDS-1-Antikörpern immunhistochemisch untersucht wurden, dargestellt.

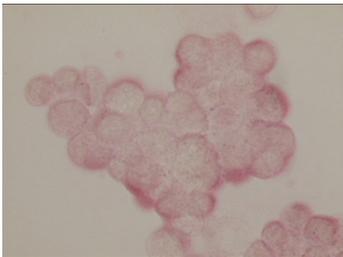


Abb.28 Unstimulierte
Aussaat
40% der Zellen Pendrin +

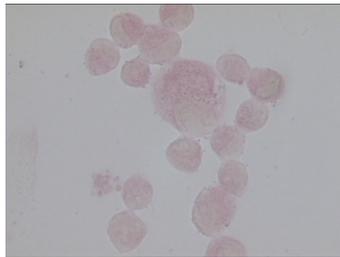


Abb.29 Rapamycin 20 µM
24h
30% der Zellen NIS +

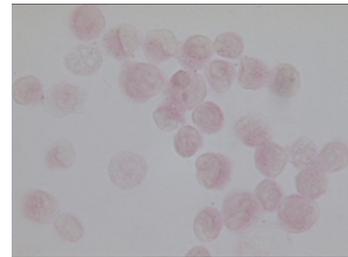


Abb.30 Rapamycin 20 µM
24h
10% der Zellen Pendrin +

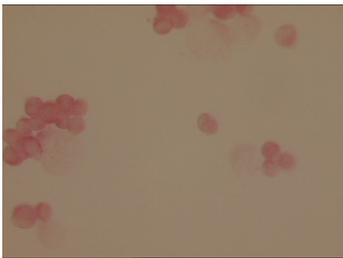


Abb.31 Unstimulierte
Aussaat
20% der Zellen NIS +

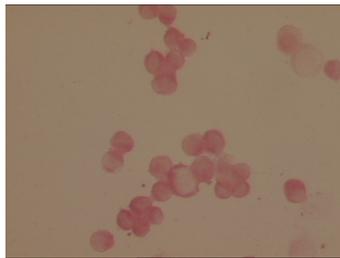


Abb.32 Velcade 1 µM
24h
40% der Zellen NIS +

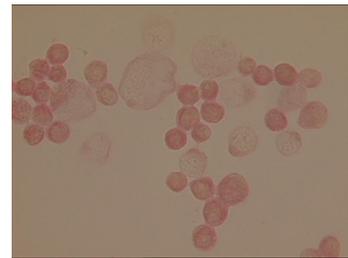


Abb.33 Velcade 20 µM
24h
30% der Zellen Pendrin +

Abb.28-Abb.33: Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin bei ONCO-DG-1- Thyreozyten, die 24h mit Velcade® oder Rapamycin stimuliert wurden. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrolle

4.2.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Von den unstimulierten Zellen zeigen 40% bei der Aussaat eine Pendrin-Expression und bei ungefähr 20% der Zellen eine NIS-Expression.

NIS lässt sich durch den NIS-3-Antikörper nach 24-stündiger Stimulation mit Rapamycin (20 µM) bei 30 % der Thyreozyten nachweisen. Die 24-stündige Stimulation mit der selben Rapamycinkonzentration bewirkt nur bei 10% der Zellen eine Anfärbung des Pendrins.

Unter Stimulation mit Velcade® (1µM) kommt es nach 24 Stunden zu einer Anfärbung des NIS Antigens bei 40% der Zellen. Nach einer 24-stündigen Inkubation der Thyreozyten mit 20 µM Velcade® lässt sich Pendrin bei 30% der Zellen darstellen.

4.2.4 Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin in den cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mittels Westernblot

4.2.4.1 Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mit Velcade®

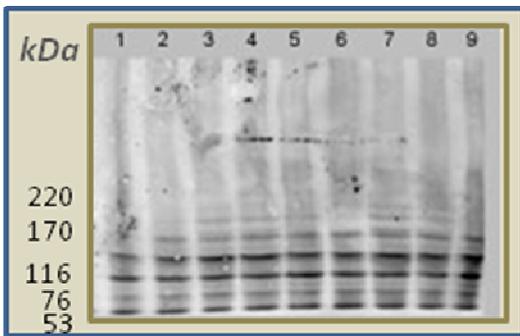


Abb.34 Blot 1 (NIS)

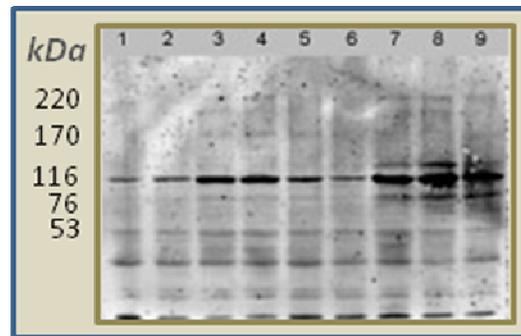


Abb.35 Blot 2 (Pendrin)

Abb.34-Abb.35: Westernblot zum Nachweis des NIS und Pendrin – Antigens bei ONCO-DG-1-Thyreozyten, die 24h und 48h mit Velcade® vorbehandelt wurden

Spuren-Nummerierung:

0: HMW

1: ohne Stimulation bei der Aussaat

2: ohne Stimulation nach 24h

3: Velcade® 20 ng/ml nach 24h

4: Velcade® 10 ng/ml nach 24h

5: Velcade® 1 ng/ml nach 24h

6: ohne Stimulation nach 48h

7: Velcade® 20 ng/ml nach 48h

8: Velcade® 10 ng/ml nach 48h

9: Velcade® 1 ng/ml nach 48h

Im Blot mit anti-NIS-3 sind unter allen getesteten Stimulanzen einschließlich der Kontrollgruppe, bei einer Molekulargröße von ca. 90 kDa, Banden für NIS zu sehen, wobei die unstimulierten Zellen die am schwächsten ausgeprägte Bande zeigen. Das bedeutet, dass die Stimulation mit Velcade® einen positiven Einfluss auf die NIS-Expression hat. Auch beim Blot mit anti-PDS-1 zeigen die unstimulierten Zellen die schwächsten Banden. Eine deutliche Erhöhung der

Pendrin-Expression ist nach einer Stimulation mit Velcade® (20 ng/dl, 10ng/dl) sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden zu sehen.

4.2.4.2 Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mit Rapamycin

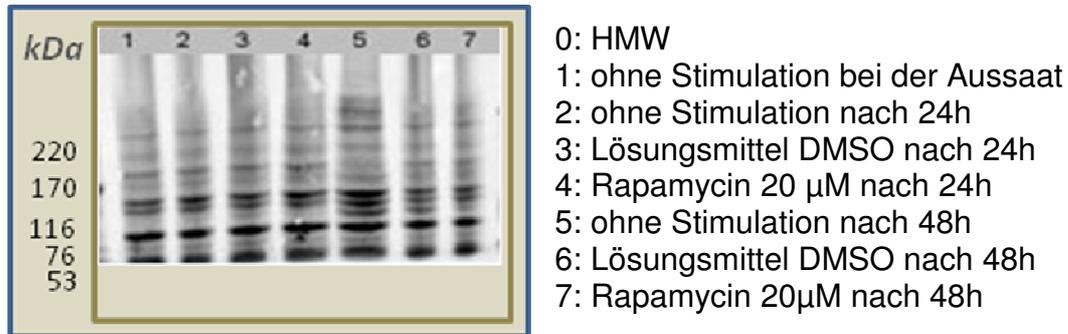


Abb.36 Westernblot zum Nachweis des NIS – Antigens bei ONCO-DG-1-Thyreozyten, die 24h und 48h mit Rapamycin vorbehandelt wurden

Auf dem Blot mit anti-NIS-3 sind unter allen getesteten Stimulanzen einschließlich der Kontrollgruppe Banden zu sehen. Die größte NIS-Expression, bei einer Molekulargröße von ca. 90 kDa zeigen die unstimulierten Thyreozyten nach 48-stündiger Inkubation. Beim Pendrin-Nachweis mittels Westernblot konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

4.2.4.3 Stimulation der Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 mit DTT und DTT plus Arsentrioxid

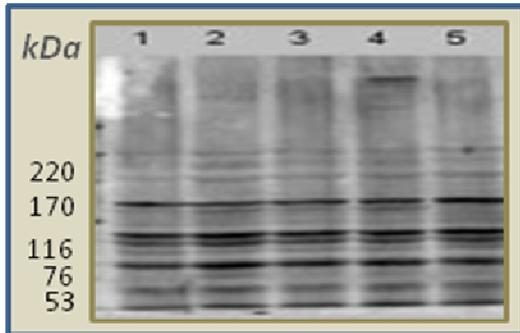


Abb.37 Blot 1 (NIS)

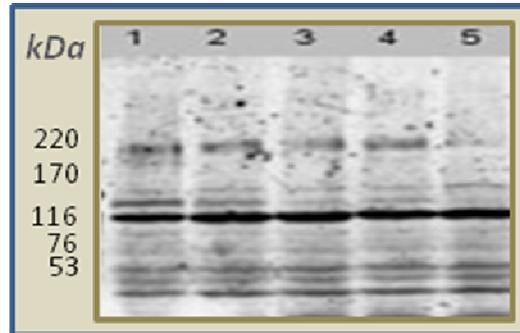


Abb.38 Blot 2 (Pendrin)

Abb.37-Abb.38: Westernblot zum Nachweis des NIS und Pendrin – Antigens bei ONCO-DG-1-Thyreozyten, die 24h und 48h mit DTT und Arsentrioxid, sowie mit deren Kombination vorbehandelt wurden

0: HMW

1: ohne Stimulation bei der Aussaat

2: DTT 30 μ M nach 24h

3: DTT 30 μ M plus Arsentrioxid 2 μ M nach 24h

4: DTT 30 μ M nach 48h

5: DTT 30 μ M plus Arsentrioxid 2 μ M nach 48h

Auf dem Blot in Abbildung 37 sind unter allen getesteten Stimulanzen einschließlich der Kontrollgruppe Banden zu sehen. Die unstimulierten Zellen zeigen die am schwächsten ausgeprägte Bande bei der Molekulargröße von ca. 90 kDa. Die unterschiedlichen Substanzkonzentrationen haben keinen Einfluss auf die NIS-Expression. Die Ausprägung der Bande für NIS ist unter allen Stimulantien ähnlich.

Im anschließenden Blot mit anti-PDS-1 sieht man einen Unterschied zwischen den stimulierten und den unstimulierten Zellen bei ca. 110 kDa. Die stärkste Bandenbildung für Pendrin erfolgt nach einer Stimulation mit DTT 30 μ M plus Arsentrioxid 2 μ M sowohl nach 24 Stunden als auch nach 48 Stunden.

4.2.5 Beeinflussung der Apoptoserate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene potentielle Differenzierungssubstanzen

Die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 werden mit Velcade®, Rapamycin und DTT plus Arsentrioxid in verschiedenen Konzentrationen stimuliert, um eine darunter ausgelöste Apoptose zu erfassen. Nach 24 und 48 Stunden Stimulation wird der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers gemessen. Als Negativ-Kontrolle dienen unstimulierte Zellen, und als Positiv-Kontrollen dienen mit Staurosporin (2,5 µM) und H₂O₂ (1M) behandelte Zellen.

4.2.5.1 Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Velcade®

Bei der Negativ-Kontrolle liegt die Apoptoserate nach 24 Stunden bei 6%. Staurosporin steigert die Apoptoserate auf 30% und unter H₂O₂ liegt der entsprechende Wert bei 75%.

Mit Velcade® ist nach 24-stündiger Inkubationsdauer ein leichter Anstieg der apoptotischen Zellen unter einer Konzentration von 20 ng/ml zu erkennen. Die Apoptoserate liegt hier bei 10%. Die Apoptoserate der mit Velcade® 1 ng/ml und 10 ng/ml stimulierten Schilddrüsenzellen liegt bei 4% und 5%.

Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle bei 5 %. Unter H₂O₂ liegt sie bei 92 % und unter Staurosporin bei 48 %.

Velcade® bewirkt im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nach 48-stündiger Stimulation eine gesteigerte Apoptose unter den Konzentrationen 20 ng/ml und 10 ng/ml. Der Anteile an apoptotischen Zellen beträgt 24% und 26%. Unter Velcade® (1 ng/ml) liegt die Apoptoserate nur bei 4%.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 zusammengestellt.

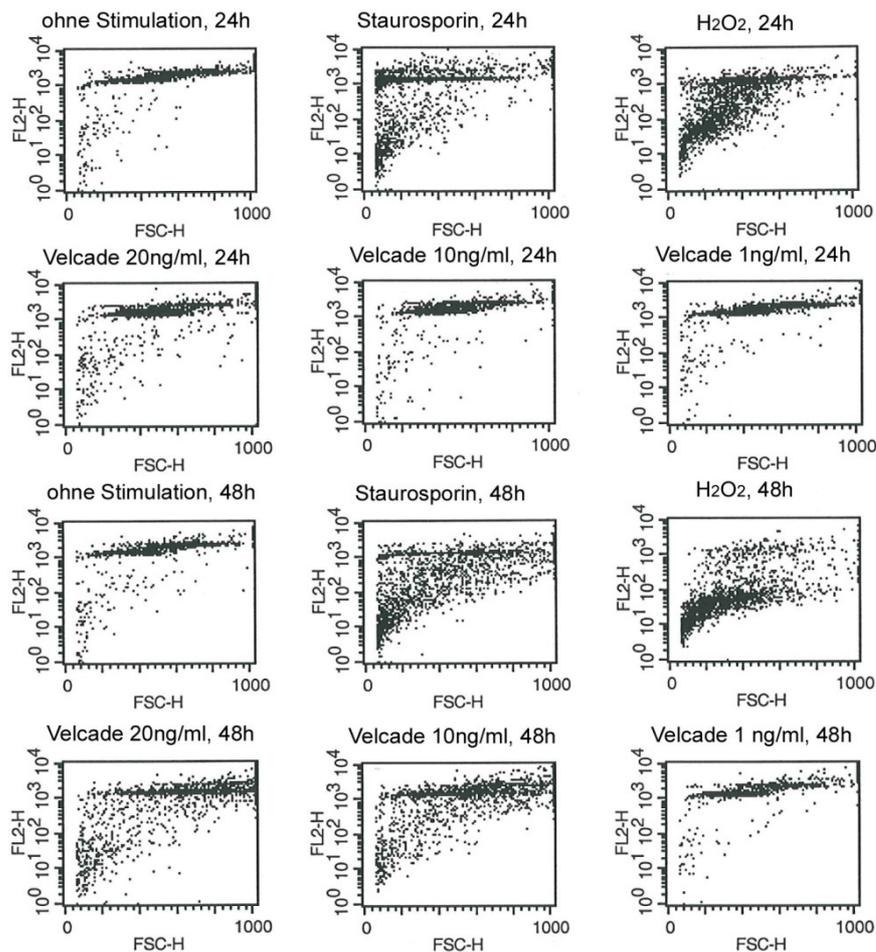


Abb. 39 Einfluss von Velcade® (20, 10 und 1 ng/ml), H₂O₂ und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen. In den Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab.16 im Anhang).

4.2.5.2 Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit Rapamycin

Bei der Negativ-Kontrolle liegt die Apoptoserate nach 24 Stunden bei 3%.

Staurosporin steigert die Apoptoserate auf 36% und unter H₂O₂ liegt die entsprechende Rate bei 95%.

Mit Rapamycin ist nach 24-stündiger Inkubationsdauer ein leichter Anstieg (5 %) der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle nur bei der Konzentration von 200 nM zu erkennen. Die Apoptoseraten unter Einfluss der Rapamycin-Konzentrationen 100 nM, 50 nM und 10 nM liegen bei 3%.

Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle bei 5%. Unter H_2O_2 liegt die Apoptoserate bei 77% und unter Staurosporin bei 67%.

Die Differenzierungssubstanz Rapamycin bewirkt nach 48 Stunden im Vergleich zur Negativ-Kontrolle keine gesteigerte Apoptose. Unabhängig von der Konzentration (200 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM) bewirkt Rapamycin eine Apoptoserate von 5%. Die einzelnen Ergebnisse sind in Abbildung 40 zusammengestellt.

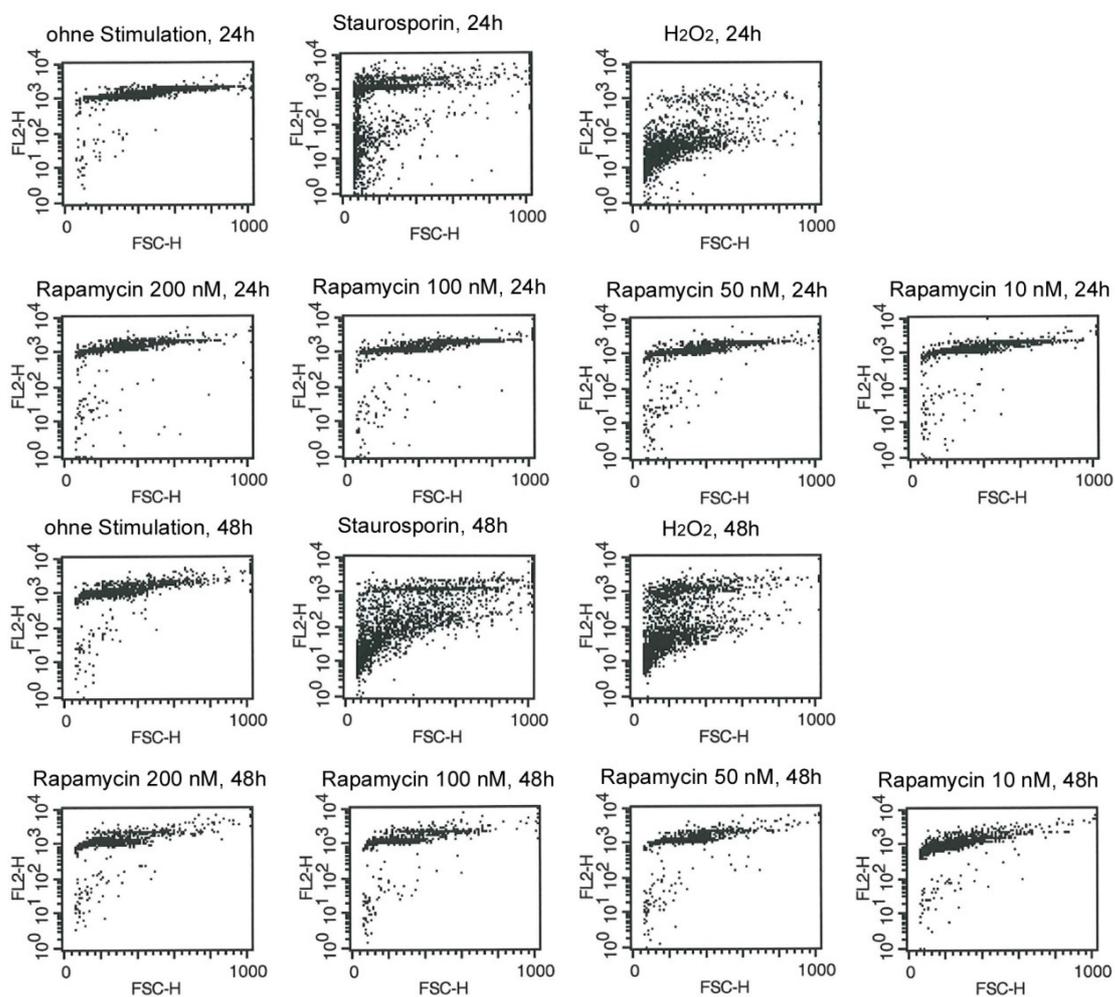


Abb. 40 Einfluss von Rapamycin(200, 100, 50 und 10 nM), H_2O_2 und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen. In den Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab.17 im Anhang).

4.2.5.3 Bestimmung der Apoptoserate nach Stimulation mit DTT und Arsentrioxid sowie nach deren Kombination

Hier liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle nach 24 Stunden bei 4%. Nach der Stimulation mit Staurosporin liegt die Apoptoserate bei 14%. Nach 24-stündiger Inkubationsdauer mit DTT sowohl mit als auch ohne Arsentrioxid ist kein Anstieg der apoptotischen Zellen gegenüber der Negativ-Kontrolle zu verzeichnen. Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle bei 12%. Unter Staurosporin, welches als Positiv-Kontrolle dient, liegt sie bei 76%. Nach Stimulation mit 10 μM DTT liegt die Apoptoserate bei 15%, unter 30 μM DTT bei 13%. Auch die Stimulation mit 2 μM Arsentrioxid zeigt eine leichte Erhöhung der Apoptose auf 15%. Die Apoptoserate nach Stimulation mit Arsentrioxid (2 μM) zusammen mit DTT, beträgt bei einer DTT-Konzentration von 10 μM 17% und bei einer DTT-Konzentration von 30 μM noch 10%.

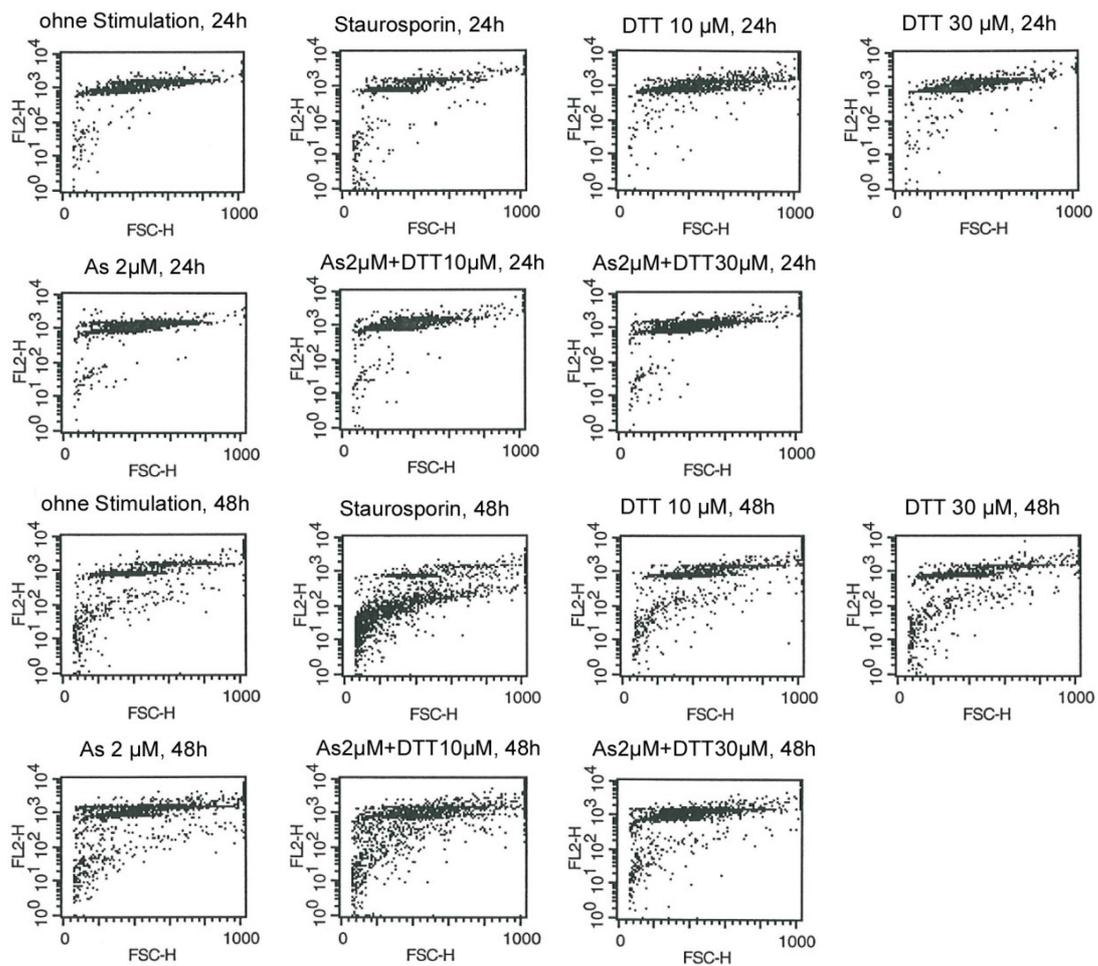


Abb.41 Einfluss von DTT(10, 30 μ M), As 2 μ M, As 2 μ M+DTT (10 μ M, 30 μ M) und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen. In den Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab.18 im Anhang).

4.3 Abschließende Bewertung der untersuchten Substanzen

Die Untersuchungen verschiedener differenzierungssteigernder Substanzen an den Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1 lassen sich folgendermaßen bewerten:

CGTH-W-1:

Substanz	¹²⁵ I- Iodidaufnahme	³ H- Thymidinaufnahme	Apoptose	NIS- Exp.	Pendrin- Exp.
Velcade®	0	0	+	0	+
Rapamycin	--	--	+	+	-
DTT	+	0	+	0	0
DTT plus Arsentrioxid	++	0	+	0	+

Abb.42

ONCO-DG-1:

Substanz	¹²⁵ I- Iodidaufnahme	³ H- Thymidinaufnahme	Apoptose	NIS- Exp.	Pendrin- Exp.
Velcade®	0	--	+	+	++
Rapamycin	+	--	+	0	nicht bestimmt
DTT	0	+ konzentrationsabhängig	+	+	+
DTT plus Arsentrioxid	++	0	+	+	+

Abb.43

Abb.42-43: abschließende Bewertung der verschiedenen differenzierungssteigernden Substanzen

Zeichenerklärung: ++ -> signifikant erhöhte Werte im Vergleich zum Nullwert
+ -> erhöhte Werte im Vergleich zum Nullwert
0 -> keine bemerkenswerte Änderung im Vergleich zum Nullwert
- -> verminderte Werte im Vergleich zum Nullwert
-- -> signifikant verminderte Werte im Vergleich zum Nullwert

Aus dieser Tabelle wird ersichtlich, dass die Substanz Velcade® in der ONCO-DG-1-Zelllinie zwar eine Erhöhung der NIS- und Pendrin-Expression hervorruft, allerdings ging diese nicht mit einem signifikanten Einfluss auf die Iodidaufnahme einher. Eine Apoptose-induzierende Eigenschaft von Velcade® konnte in beiden Zelllinien beobachtet werden. Die optimale Substratkonzentration hierfür beträgt in der CGTH-W-1 Zelllinie nach 24-stündiger Inkubation 20 ng/ml und in der ONCO-DG-1 Zelllinie nach 48-stündiger Inkubation 10 ng/ml.

Rapamycin führte zu einer gesteigerten ¹²⁵I-Iodidaufnahme in der ONCO-DG-1 Zelllinie (optimale Konzentration nach 5-stündiger Inkubation: 10 nM), jedoch ohne erhöhte Expression von NIS oder Pendrin. Die ³H-Thymidinaufnahme unter Rapamycin in beiden Zelllinien signifikant ab (optimale Konzentration: in CGTH-W-1 20 µM, 10 µM, 5 µM und in ONCO-DG-1 20 µM). Daneben zeigte sich auch ein leichter Anstieg der Apoptoserate in beiden Zelllinien (optimale Substratkonzentration in beiden Zelllinien 200 nM).

Bei der Substratkombination aus DTT und Arsentrioxid ließen sich die gewünschten Reaktionen wie erhöhte ¹²⁵I-Iodidaufnahme (optimale Konzentration: 2 µM ATO plus 20, 25 und 30 µM DTT) gesteigerte Apoptoserate (optimale Konzentration: 2 µM ATO plus 30 µM DTT) sowie erhöhte Expression von NIS und Pendrin (optimale Konzentration in CGTH-W-1: 2 µM ATO plus 15 µM DTT; optimale Konzentration in ONCO-DG-1: 2 µM ATO plus 30 µM DTT) erzielen. DTT und Arsentrioxid zeigten jedoch in beiden Zelllinien keinen Einfluss auf die ³H-Thymidinaufnahme.

5. Diskussion

Etwa 5-20 % der Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom haben Fernmetastasen. Auch im Falle einer Metastasierung kann die Radioiodtherapie die Überlebensrate positiv beeinflussen und sogar kurativ sein. Die Behandlung mit radioaktiv markiertem Iod ist die bedeutendste Zusatztherapie zur operativen Tumorektomie und stellt den wichtigsten prognostischen Faktor für Rezidivfreiheit und Verbesserung der Überlebensrate (Samaan et al. 1992) dar. Da Radioiod selektiv in der Schilddrüse angereichert wird, findet man normalerweise eine ausreichend hohe Herddosis bei gleichzeitig niedriger Aktivität im übrigen Körper.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Radioiodtherapie bei Schilddrüsenmalignomen ist die Radioiodaufnahme in die Zellen. Durch ihre Entartung verlieren die Schilddrüsenmalignomzellen jedoch häufig diese Fähigkeit (Klutmann et al. 2001).

Im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe ist bei maligne entartetem Gewebe die Expression des Natrium-Iodid-Symporter (NIS) deutlich reduziert, was als Grund für die verminderte Radioiodaufnahme in Schilddrüsenkarzinomzellen angesehen wird (Arturi et al. 1998; Saito et al. 1998).

NIS ist für die Aufnahme des radioaktiven ^{131}I aus dem Blutplasma in die Schilddrüse verantwortlich. Der Symporter transportiert unter Energieverbrauch zwei Natriumionen und ein Iodidion gegen ein Konzentrationsgefälle an der basolateralen Thyreozytenmembran in die Zelle (Spitzweg et al. 2007). Somit bildet NIS die Grundlage für die diagnostische Schilddrüsenszintigraphie, aber auch für die therapeutische Anwendung von Radioiod bei Schilddrüsenmalignomen und Adenomen. Eine gut funktionierende Wirkung des NIS führt zu einer verstärkten Radioiodaufnahme. Die Redifferenzierung, also die Wiederaufnahme der Leistung des NIS bei Schilddrüsenkarzinomzellen gewährleistet somit eine Optimierung der Radioiodtherapie. Die Expression membranständiger Transporterproteine wie NIS oder Pendrin wurde in unserer Arbeit mittels Immunhistochemie nachgewiesen.

Bisher wurden Redifferenzierungen am besten durch Retinoide erreicht. So zeigt beispielsweise 13-cis-Retinsäure sowohl eine Ausdifferenzierung der Tumorzellen bei der Promyelocyten-Leukämie (Ruiz-Arguelles et al. 2005), als auch eine Stimulation der Jodidaufnahme in Schilddrüsenkarzinomzellen durch eine Erhöhung der NIS-Expression (Van Herle et al. 1990). Das Augenmerk wurde jedoch nicht nur auf den Jodidstoffwechsel der Thyreozyten gerichtet, sondern auch auf ihr Zellwachstum sowie ihre Apoptose.

Der programmierte Zelltod, die Apoptose, ist eine eigenständige, physiologische und genetisch kontrollierte Elimination der Zelle und stellt eine wichtige regulatorische Funktion für den Erhalt des Organismus dar.

Es ist belegt, dass bei Karzinomkrankungen die Apoptose aufgrund der Überexpression eines tumorerzeugenden Gens dysreguliert, meist verringert ist (McDonnell et al. 1990). Somit ist die Apoptose zu einem attraktiven neuen Krebsforschungsgebiet geworden. Es stellte sich nun die Frage, ob die in dieser Arbeit zu untersuchenden Substanzen Velcade®, Rapamycin und DTT, letztere auch in Kombination mit Arsentrioxid bei Schilddrüsenkarzinomzellen ebenfalls einen apoptoseinduzierenden Effekt aufweisen. Die Apoptose wurde bei unseren Untersuchungen mit Hilfe der FACS-Analyse anhand des Anteils hypodiploider Kerne bestimmt.

Erstrebenswert für die Effizienz von Redifferenzierungssubstanzen wäre die Kopplung der Steigerung der Apoptoserate mit dem Rückgang des Zellwachstums der Malignomzellen. Eine gängige Methode zum Nachweis der Zellproliferation ist die Erfassung der ³H-Thymidin-Inkorporation. Bei diesem Verfahren nutzt man den Einbau radioaktiv markierten Thymidins in proliferierende Zellen aus (Noff et al. 1989). Somit kann die Thymidinaufnahme als Wachstumsparameter gesehen werden (Szebeni et al. 1991). Eine gewisse Einschränkung ergibt sich allerdings dadurch, dass Thymidin nicht nur in die DNA eingebaut wird, sondern auch im Zytosol verweilen kann.

Da eine Mykoplasmenkontamination die Ergebnisse verfälschen kann wurde zusätzlich immer ein Mykoplasmen-Test durchgeführt und bei positivem Ergebnis die Kultur verworfen.

5.1 Wirkung von Velcade® auf Apoptose, Proliferation und Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1

Wie bereits erwähnt wird Velcade®/ Bortezomib als erfolgreiche Rezidivtherapie beim Multiplen Myelom eingesetzt. Die Wirkungsweise des Proteasom-Inhibitors beruht auf der Hemmung der Angiogenese, Apoptose der Krebszellen und Hemmung der Interaktion mit Bindegewebszellen des Knochenmarks. Dabei reagieren Krebszellen empfindlicher auf die Inhibition der Proteasomen als gesunde Zellen. Der Einfluss von Velcade® auf Schilddrüsenkarzinomzellen wurde bis dato noch nicht untersucht. Dieser Proteasom-Inhibitor zeigte in keiner der von uns untersuchten beiden Zelllinien einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Iodidaufnahme. Der immunhistochemische Nachweis des Natrium-Iodid-Symporters ließ nur eine mäßige Expression in beiden Zelllinien erkennen. Somit sind beide Ergebnisse kongruent.

Pendrin ist ein Chlorid-Iodid-Transporter an der apikalen Thyreozytenmembran und gewährleistet den Iodid-Transfer ins Follikellumen. Auch die Pendrin-expression ist in Schilddrüsenkarzinomzellen meist erniedrigt (Scott et al. 1999). Unter Stimulation mit Velcade® (20ng/dl, 10ng/dl) war die immunhistochemische Darstellung von Pendrin erhöht, wobei die ONCO-DG-1 Zelllinie stärker reagiert hat als CGTH-W-1. Eine gesteigerte Iodidinkorporation ging damit aber nicht einher. Dieser fehlende Anstieg der Iodid-Aufnahme könnte eventuell durch einen gesteigerten Iodid-Austransport, infolge der verstärkten Pendrin-Expression bedingt sein. In unseren Untersuchungen konnte auch eine antiproliferative Wirkung von Velcade® bestätigt werden. Die transformierten Thyreozyten, die ab dem Zeitpunkt der Zellaussaat mit diesem Proteasom-Inhibitor behandelt wurden, zeigten vor allem in der ONCO-DG-1 eine signifikant verminderte Thymidinaufnahmerate. Die optimale Substratkonzentration betrug dabei 20 ng/ml.

Gleichzeitig wurde das sonst unbegrenzte (tumoröse) Wachstum der entarteten Zellen, welches auf ein defektes Apoptoseprogramm zurückzuführen ist, durch Velcade® unterbunden, indem die Apoptoserate anstieg. Die höchste Apoptoserate konnte unter einer Konzentration von 20 ng/ml in der CGTH-W-1

Linie und 10 ng/ml in der ONCO-DG-1 Zelllinie verzeichnet werden. Zwar konnten unsere Untersuchungen keine verstärkte Iodidaufnahme bestätigen, dennoch ist von einer relativen Steigerung der Iodidaufnahme auszugehen, da bei gesenkter Proliferation und gesteigerter Apoptose die Zahl aktiver und vitaler Zellen vermindert ist. Dieser differenzierungssteigernde Effekt, der sich durch eine nicht veränderte Iodidaufnahme bei verringerter Zellzahl und erhöhter Apoptoserate zeigt, lässt die Erfolgsaussichten einer Radioiodtherapie durch Velcade® durchaus erhöhen.

5.2 Wirkung von Rapamycin auf Apoptose, Proliferation und Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1

Das Makrolidantibiotikum Rapamycin wird bevorzugt als Immunsuppressivum nach Nierentransplantation in Kombination mit Ciclosporin und Corticosteroiden eingesetzt (Samaniego et al. 2006). In der Kardiologie wird seine antiproliferative Wirkung ausgenutzt, um Gefäß-Restenosen zu verhindern, indem mit Rapamycin beschichtete Stents eingesetzt werden (Mehilli et al. 2006). Aufgrund seiner antiproliferativen Effekte auf Zellen rückte Rapamycin auch ins Blickfeld der Antitumorthherapie. Die immunsuppressive und zellabtötende Wirkung von Rapamycin beruht auf einer Blockade der Ribosomenproduktion und somit der Proteinbiosynthese (Mayer et al. 2006).

Da schnell wachsende Gewebe wie z.B. Tumoren einen besonders hohen Bedarf an Ribosomen haben, werden sie durch Rapamycin auch besonders getroffen. Desweiteren wirkt Rapamycin antiproliferativ indem es die Wirkung des Zellzyklus-Inhibitors TGF- β verstärkt. Es ist bekannt, dass Karzinomzellen meist nicht mehr sensibel für TGF- β sind (Law et al. 2002). Rapamycin erhöht die Sensibilität für TGF- β und unterbindet somit die Proliferation von Krebszellen (Law, Chytil, Dumont et al. 2002b).

In unseren Untersuchungen an den Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG-1 konnte die antiproliferative Wirkung von Rapamycin bestätigt werden. Es ließ sich ein konzentrationsabhängiger signifikanter Rückgang der

³H-Thymidininkorporation feststellen, wobei die optimale Substratkonzentration in beiden Zelllinien 20 µM betrug.

Daneben zeigte sich auch ein leichter Anstieg der Apoptoserate in beiden Zelllinien unter der Konzentration von 200 nM. Rapamycin hat darüber hinaus nicht nur die Fähigkeit die Thymidinaufnahme zu hemmen, sondern unter den gleichen Bedingungen auch die NIS-Expression zu induzieren und damit die Iodidaufnahme zu verstärken.

Bei unseren kanzerogenen Schilddrüsenzellen der Linie ONCO-DG-1 induzierte Rapamycin eine signifikante Wiederaufnahme von Iodid, wenn die Zellen mit Rapamycin in folgenden Konzentrationen stimuliert werden: 5 nM, 10 nM, 50 nM und 100 nM. In der CGTH-W-1 Zelllinie zeigte sich dagegen nach Inkubation mit Rapamycin ein statistisch signifikanter Rückgang der Iodidinkorporation. Somit zeigt Rapamycin in beiden Zelllinien etwas unterschiedliche Wirkungen, wobei sich in Praxis offensichtlich nicht vorhersagen lässt, welche Schilddrüsenkarzinomzelle auf Rapamycin optimal reagiert. Dennoch könnten sich mit einer Rapamycin-Vorbehandlung angesichts der Stimulation der Iodidaufnahme bei gleichzeitiger Hemmung des Zellwachstums die Chancen für eine effektivere Radioiodtherapie bei einer Reihe von Schilddrüsenmalignomen beträchtlich erhöhen.

5.3 Wirkung von DTT und Arsentrioxid, sowie deren Kombination auf Apoptose, Proliferation und Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinien CGTH-W-1 und ONCO-DG 1

Arsentrioxid wird bereits zur Induktion einer Remission und Konsolidierung bei erwachsenen Patienten mit rezidivierender oder refraktärer akuter Promyelozyten-Leukämie (APL) eingesetzt (Choi et al. 2002). Es hemmt das Wachstum der Leukämiezellen, die Angiogenese und induziert deren Apoptose (Miller et al. 2002). Außerdem fördert Arsentrioxid die Redifferenzierung der Krebszellen. Der genaue Wirkmechanismus ist zwar noch nicht vollständig geklärt, neuere Studien zeigen allerdings, dass es nach einer Arsentrioxid-Behandlung zu einer Aktivierung der Caspasen-Kaskade sowie zum

Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt (Rojewski et al. 2002). Die Mitochondrien sind dabei als primärer Wirkungsort des Arsentrioxids anzusehen. Es wurde ferner gezeigt, dass es im Rahmen der Arsentrioxid-Behandlung hämatopoetischer Zelllinien zu einer Apoptose-unabhängigen Proliferationsinhibition kommen kann (Rojewski et al. 2002). Auch der Synergismus zwischen Arsentrioxid und DTT wurde bereits an den NB-4 Zellen der akuten myeloischen Leukämie-Zelllinie untersucht (Gurr et al. 1999). Hier führte die Kombination laut Studien bei den Zelllinien mit promyeloischen Leukämiezellen zur Remission. Möglicher Wirkmechanismus ist die Modulation der Phosphorylierung benachbarter Thiole an DTT im Zellinneren. Es konnte gezeigt werden, dass DTT die Toxizität von Arsentrioxid in Leukämiezellen verstärkt und somit die Apoptoserate der Krebszellen erhöht (Gurr et al. 1999). Auch unsere Untersuchungen konnten die Steigerung der Apoptosenrate unter Arsentrioxid sowohl alleine als auch in Kombination mit DTT teilweise bestätigen. Es konnte nach der Inkubation der Thyreozyten mit 2 μM Arsentrioxid in der ONCO-DG-1 Zelllinie eine leichte Erhöhung und in der CGTH-W-1 Linie eine signifikante Erhöhung der Apoptosenrate beobachtet werden. Die simultane Zugabe von DTT plus Arsentrioxid während der Aussaat führte in beiden Zelllinien nicht zu einer Apoptosensteigerung, unabhängig von der DTT-Konzentration. Bei den CGTH-W-Zellen zeigte sich unter 2 μM Arsentrioxid plus 10 μM oder 30 μM DTT im Vergleich zur Kontrolle zwar eine deutlich erhöhte Apoptoserate, diese überstieg aber die entsprechende Rate unter alleiniger Stimulation mit Arsentrioxid nicht. Auch die alleinige Inkubation mit 30 μM DTT führte zu einer deutlichen Steigerung des Zelltods in der CGTH-W-1 Zelllinie. Die Kombination aus Arsentrioxid und DTT führte bei den ONCO-DG-1 Thyreozyten nur bei der DTT-Konzentration von 10 μM zu einer Steigerung, während bei der Konzentration von 30 μM DTT bereits ein Rückgang der Apoptose zu verzeichnen ist. Somit kann gesagt werden, dass eine Kombination aus Arsentrioxid und DTT zwar in bestimmten Konzentrationen durchaus apoptosesteigernd wirkt, der gewünschte verstärkende Effekt von DTT auf die Arsentrioxid-induzierte Apoptose bei unseren Untersuchungen jedoch nicht bestätigt werden konnte.

Andererseits kann die Substratkombination dennoch eine vielversprechende Möglichkeit für die Erhöhung der Effizienz einer Radioiodtherapie sein. Es zeigte sich nämlich eine signifikante Steigerung der Iodidaufnahme in unseren Malignomzellen. Diese Beobachtung trifft für beide Zelllinien zu. Die beobachtete gesteigerte Iodidinkorporation korreliert allerdings nicht mit der NIS oder Pendrinexpression in der Immunohistologie. Weder der immunzytologische Nachweis noch der Westernblot konnten in den beiden Zelllinien eine erhöhte NIS oder Pendrinexpression aufweisen. Möglicherweise arbeiten die vorhandenen NIS- oder Pendrin-Moleküle aber unter der eingeleiteten Vorbehandlung effektiver. Eine statistisch relevante Erniedrigung der Thymidinaufnahme, welche mit einem Proliferationsrückgang gleichzusetzen wäre, konnte mit 10 μM und 15 μM DTT beobachtet werden, jedoch nicht unter Arsentrioxid alleine oder in Kombination mit DTT.

6. Zusammenfassung

Die Radioiodtherapie mit ^{131}I -Iod beeinflusst die Rezidiv- und Überlebensrate von Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom signifikant günstig. Sie gilt als Therapie der Wahl, da das radioaktiv markierte Jod selektiv in der Schilddrüse angereichert wird. Aus diesem Grund ist die Iodidaufnahme in Schilddrüsenmalignomzellen ein wichtiger Angriffspunkt der Behandlung. Nun ist es allerdings so, dass gerade die Iodidinkorporation in entarteten Schilddrüsenzellen verringert oder gar nicht mehr möglich ist. In dieser Arbeit werden Substanzen auf ihre Fähigkeit überprüft die entarteten Thyreozyten zu re-differenzieren und somit ihre Iodidaufnahme zu verstärken. Die Untersuchungen erfolgten an kultivierten humanen malignen Thyreozyten der Zelllinien CTGH-W-1 sowie ONCO-DG-1. Als Hauptdifferenzierungsparameter diente die ^{125}I -Iodidaufnahme, ergänzend dazu wurde die NIS- und Pendrin-expression gemessen, da die beiden Membrantransportproteine entscheidend an der Iodidaufnahme in die Schilddrüsenzellen beteiligt sind. Desweiteren wurde überprüft inwiefern die Substanzen einerseits stimulierend auf die Apoptose wirken, andererseits die Zellproliferation beeinträchtigen. Die Proliferation der Thyreozyten wurde anhand ihrer ^3H -Thymidinaufnahme erfasst. Als potentielle Redifferenzierungssubstanzen wurden untersucht: Velcade®, Rapamycin und Arsentrioxid in Kombination mit DTT. Velcade® zeigte in keiner unserer Zelllinien einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Iodidaufnahme. Dieser Umstand bestätigte sich auch in der nur mäßigen Expression von NIS in den immunhistochemischen Darstellungen. Es konnte allerdings eine deutliche Erhöhung der Pendrin-Expression vor allem in der ONCO-DG-1 Zelllinie nach einer Stimulation mit Velcade® (20 ng/dl, 10ng/dl) beobachtet werden. Die fehlende Steigerung der Iodidinkorporation könnte durch einen gesteigerten Iodid-Austransport, infolge der verstärkten Pendrin-Expression bedingt sein. In den Untersuchungen an der Zelllinie ONCO-DG-1 konnte eine antiproliferative Wirkung von Velcade® bestätigt werden. Nach Stimulation mit 10 ng/ml Velcade® konnte eine signifikant verminderte Thymidinaufnahmerate verzeichnet werden. Gleichzeitig wurde

eine apoptosesteigernde Wirkung erkannt. Die Zellen der Linie CGTH-W-1 reagierten schwächer auf den Einfluss von Velcade®. Der differenzierungssteigernde Effekt von Velcade® liegt in der relativen Erhöhung der Aufnahmerate von Iodid bei gesenkter Proliferation und gesteigerter Apoptoserate und erhöht somit die Chancen einer erfolgreichen Radioiodtherapie.

Rapamycin führte zu einer gesteigerten ¹²⁵I-Iodidaufnahme in der ONCO-DG-1 Zelllinie. Die Konzentrationen 5 nM, 10 nM, 50 nM und 100 nM stellten sich als besonders effektiv heraus. Der Iod-Uptake ging allerdings nicht mit einer gesteigerten Expression des NIS- oder Pendrin-Transporterproteins einher. Allerdings beeinflusste Rapamycin die ¹²⁵I-Iodidaufnahme der CGTH-W-1 Zellen negativ. Die ³H-Thymidinaufnahme nahm in beiden Zelllinien signifikant ab. Daneben zeigte sich auch ein leichter Anstieg der Apoptoserate in beiden Zelllinien.

Die Kombination aus Arsentrioxid (2 µM) und DTT (5 µM, 10 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 30 µM) führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Steigerung der Iodidaufnahme in die Malignomzellen. Die gesteigerte Iodidinkorporation korreliert allerdings nicht mit der NIS oder Pendrinexpression in der Immunohistologie. Eine statistisch relevante Erniedrigung der Thymidinaufnahme, welche mit einem Proliferationsrückgang gleichzusetzen ist, konnte nur nach der 48-stündigen Inkubation mit 10 µM und 15 µM DTT beobachtet werden. Die bereits bekannte apoptosesteigernde Wirkung von Arsentrioxid konnte auch in unseren Untersuchungen meist bestätigt werden. Nach Stimulation mit 2 µM Arsentrioxid kam es in beiden Zelllinien zu einer Erhöhung der Apoptose. Die Beimengung von DTT zu Arsentrioxid während der Aussaat bewirkt zwar eine Apoptosensteigerung im Vergleich zur Kontrolle, die Rate ist allerdings geringer als nach einer alleinigen Stimulation mit Arsentrioxid. In der ONCO-DG-1 Linie war bei einer Substratkonzentration von 30 µM DTT und 2 µM Arsentrioxid bereits ein Rückgang der Apoptose zu erkennen.

Fazit: Aufgrund der ausgeprägten antiproliferativen und apoptosesteigernden Wirkung von Velcade® eignet sich diese Substanz durchaus für eine

Redifferenzierungstherapie von Schilddrüsenkarzinomzellen. Sowohl Rapamycin als auch Arsentrioxid in Verbindung mit DTT bewirken in bestimmten Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der Iodidinkorporation. Die apoptoseinduzierende und proliferationshemmende Wirkung beider Substanzen verstärken zusätzlich den differenzierungssteigernden Effekt.

7. Anhang

Tab.1 zu Abb.1. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant bei p<0,05 (*).

Zeit (h) \ Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	111,93	115,48	148,60
SD	32,28	27,87	19,62
SEM	13,18	11,38	8,01
Velcade® 20 ng/ml Mittelwert	83,15	134,03	171,32
SD	22,82	12,95	31,17
SEM	9,32	5,29	12,73
signifikant			
Velcade® 10 ng/ml Mittelwert	124,75	151,50	191,68
SD	26,46	12,25	37,53
SEM	10,80	5,00	15,32
signifikant			
Velcade® 1 ng/ml Mittelwert	103,28	154,93	194,07
SD	20,74	8,17	40,86
SEM	8,47	3,33	16,68
signifikant			

Tab.2 zu Abb.2. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant bei $p < 0,05$ (*).

Zeit (h) \ Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	282,8	340,2	180,9
SD	24,3	29,5	31,7
SEM	9,9	12,0	13,0
Rapamycin 20 μM Mittelwert	241,2	283,2	136,1
SD	16,7	21,3	24,7
SEM	6,8	8,7	10,1
signifikant			*
Rapamycin 10 μM Mittelwert	265,6	283,5	146,8
SD	28,0	31,6	29,3
SEM	11,4	12,9	12,0
signifikant			
Rapamycin 5 μM Mittelwert	275,6	288,2	154,3
SD	21,9	28,1	19,5
SEM	8,9	11,5	8,0
signifikant			*
Rapamycin 1 μM Mittelwert	281,4	308,1	158,9
SD	49,5	26,4	10,3
SEM	20,2	10,8	4,2
signifikant			*

Rapamycin 500 nM Mittelwert	259,7	296,2	153,3
SD	25,3	12,9	32,7
SEM	10,3	5,3	13,4
signifikant			*
Rapamycin 200 nM Mittelwert	246,2	301,0	143,7
SD	20,6	11,1	15,2
SEM	8,4	4,5	6,2
signifikant			

Tab.3 zu Abb.3a und 3b. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant bei $p < 0,05$ (*).

Zeit (h) Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	189,9	517,9	1014,5
SD	97,2	68,7	495,6
SEM	39,7	28,0	202,3
DTT 5 μM Mittelwert	308,2	794,4	1272,2
SD	144,9	218,2	537,1
SEM	59,2	89,1	219,3
signifikant			
DTT 10 μM Mittelwert	305,4	795,7	910,6
SD	125,3	115,3	312,0
SEM	51,2	47,1	127,4
signifikant			

DTT 15 μ M Mittelwert	278,9	691,5	1282,4
SD	119,6	190,6	419,7
SEM	48,8	77,8	171,4
signifikant			
DTT 20 μ M Mittelwert	344,5	725,1	1323,3
SD	122,7	290,8	319,2
SEM	50,1	118,7	130,3
signifikant			
DTT 25 μ M Mittelwert	371,5	563,2	1178,4
SD	149,3	176,9	369,8
SEM	61,0	72,2	151,0
signifikant			
DTT 30 μ M Mittelwert	373,6	599,8	1595,4
SD	149,4	208,9	440,3
SEM	61,0	85,3	179,7
signifikant			
As 2 μ M Mittelwert	300,9	563,8	1039,1
SD	395,9	404,5	384,0
SEM	161,6	165,1	156,8
signifikant			
As 2 μ M+DTT 5 μ M Mittelwert	504,7	1072,3	1276,6
SD	361,8	498,4	617,2
SEM	147,7	203,5	252,0
signifikant		*	

As 2 μ M+DTT 10 μ M Mittelwert	444,2	816,6	1153,9
SD	252,1	206,4	416,3
SEM	102,9	84,3	170,0
signifikant			
As 2 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	442,8	1248,7	1547,7
SD	271,8	433,4	317,4
SEM	111,0	176,9	129,6
signifikant			
As 2 μ M+DTT 20 μ M Mittelwert	550,5	1109,6	1292,1
SD	360,1	420,7	363,4
SEM	147,0	171,7	148,4
signifikant		*	
As 2 μ M+DTT 25 μ M Mittelwert	586,2	991,6	1194,6
SD	444,0	358,5	247,0
SEM	181,3	146,3	100,8
signifikant		*	
As 2 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	578,4	1190,1	1721,9
SD	323,4	586,0	342,0
SEM	132,0	239,2	139,6
signifikant		*	
As 1 μ M Mittelwert	65,0	1041,0	868,3
SD	49,8	242,0	277,1
SEM	20,3	98,8	113,1
signifikant	*	*	

As 1 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	34,7	1265,2	856,5
SD	7,4	387,3	254,3
SEM	3,0	158,1	103,8
signifikant	*	*	
As 1 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	31,7	708,8	733,8
SD	10,1	62,2	232,0
SEM	4,1	25,4	94,7
signifikant	*	*	
As 0,5 μ M Mittelwert	37,8	857,5	673,7
SD	10,7	375,5	301,4
SEM	4,4	153,3	123,1
signifikant	*		
As 0,5 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	86,4	840,1	659,4
SD	108,2	208,1	341,2
SEM	44,2	85,0	139,3
signifikant	*	*	
As 0,5 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	74,2	790,7	717,1
SD	48,8	203,6	539,2
SEM	19,9	83,1	220,1
signifikant	*		

Tab.4 zu Abb.4. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant bei p<0,05 (*).

Zeit (h) Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	34293,5	81440,0	33016,6
SD	12919,5	26439,5	19953,8
SEM	4567,8	9347,8	7054,7
Velcade® 20 ng/ml Mittelwert	33568,9	48209,3	24667,9
SD	3788,8	10146,8	2037,7
SEM	1339,5	3587,4	720,4
signifikant			
Velcade® 10 ng/ml Mittelwert	36992,6	53978,5	20545,3
SD	4440,1	4349,9	5947,2
SEM	1569,8	1537,9	2102,7
signifikant			
Velcade® 1 ng/ml Mittelwert	34761,6	99205,9	23019,1
SD	6978,0	2080,6	18591,9
SEM	2467,1	735,6	6573,2
signifikant			

Tab.5 zu Abb.5. ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant bei $p < 0,05$ (*).

Zeit (h) \ Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	7026,0	19181,9	17816,4
SD	921,2	2130,5	2179,7
SEM	325,7	753,2	770,6
Rapamycin 20 μM Mittelwert	1052,3	4556,8	2049,0
SD	97,2	683,8	312,0
SEM	34,4	241,7	117,9
signifikant	*	*	*
Rapamycin 10 μM Mittelwert	1248,8	5223,4	3014,8
SD	125,4	405,5	538,7
SEM	44,4	143,4	190,5
signifikant	*	*	*
Rapamycin 5 μM Mittelwert	1510,6	7185,9	4885,4
SD	184,3	1279,6	726,2
SEM	65,1	452,4	256,7
signifikant	*	*	*
Rapamycin 1 μM Mittelwert	2402,5	10384,8	8777,4
SD	479,8	1376,0	1180,6
SEM	169,6	486,5	417,4
signifikant	*	*	

Rapamycin 500 nM Mittelwert	4474,0	12705,9	13085,5
SD	327,7	1560,0	1918,3
SEM	115,9	551,6	678,2
signifikant			
Rapamycin 200 nM Mittelwert	6101,8	12840,1	16053,3
SD	855,6	1387,2	1456,1
SEM	302,5	490,4	514,8
signifikant			

Tab.6 zu Abb.6a und 6b. ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant bei $p < 0,05$ (*).

Zeit (h)	5	24	48
Stimulation			
Ohne Stimulation Mittelwert	5593,9	71726,9	1387,9
SD	1634,3	6116,9	351,1
SEM	667,2	2497,2	143,4
DTT 5 μM Mittelwert	2972,0	57521,1	3741,4
SD	895,0	9391,9	5010,3
SEM	365,4	3834,2	2045,5
signifikant			
DTT 10 μM Mittelwert	9219,0	66406,0	7952,3
SD	2176,3	4517,7	10279,0
SEM	888,5	1844,3	4196,4

signifikant			
DTT 15 μ M Mittelwert	4252,3	68212,4	5831,9
SD	1451,2	9528,6	8128,9
SEM	592,5	3890,0	3318,6
signifikant			
DTT 20 μ M Mittelwert	4930,4	64816,3	6665,3
SD	2277,1	10135,0	10631,0
SEM	929,6	4137,6	4340,1
signifikant			
DTT 25 μ M Mittelwert	6779,4	63648,0	3688,3
SD	1967,0	10371,3	5353,7
SEM	803,0	4234,1	2185,6
signifikant			
DTT 30 μ M Mittelwert	5318,6	73921,6	12971,9
SD	2339,3	4679,6	15885,9
SEM	955,0	1910,4	6485,4
signifikant			
As 2 μ M Mittelwert	7030,1	71666,1	15127,0
SD	2364,1	6345,3	13648,6
SEM	965,1	2590,4	5572,0
signifikant			
As 2 μ M+DTT 5 μ M Mittelwert	5767,9	62361,8	11447,9
SD	1829,9	8818,4	16524,1
SEM	747,0	3600,1	6745,9
signifikant			

As 2 μ M+DTT 10 μ M Mittelwert	5372,3	66425,9	5521,0
SD	2153,5	9041,8	8687,7
SEM	879,2	3691,3	3546,7
signifikant			
As 2 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	5035,4	64402,4	10820,8
SD	1311,3	8667,8	13141,2
SEM	535,3	3538,6	5364,9
signifikant			
As 2 μ M+DTT 20 μ M Mittelwert	3161,8	60960,6	8041,8
SD	1115,9	8687,2	9229,3
SEM	455,6	3546,5	3767,8
signifikant			
As 2 μ M+DTT 25 μ M Mittelwert	2881,5	64493,0	1035,4
SD	637,7	8702,0	357,5
SEM	260,3	3552,6	146,0
signifikant			
As 2 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	2200,6	71950,9	1127,4
SD	888,1	8632,4	122,1
SEM	362,6	3524,2	49,8
signifikant			
As 1 μ M Mittelwert	4155,9	71384,1	2120,4
SD	899,9	9503,3	2035,8
SEM	367,4	3879,7	831,1
signifikant			

As 1 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	2867,4	72537,9	1417,6
SD	921,7	6856,9	719,2
SEM	376,3	2799,3	293,6
signifikant			
As 1 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	2928,9	73957,6	2836,1
SD	943,4	7835,2	4326,2
SEM	385,1	3198,7	1766,2
signifikant			
As 0,5 μ M Mittelwert	3725,4	68365,6	3190,0
SD	1223,6	12835,4	3988,6
SEM	499,5	5240,0	1628,3
signifikant			
As 0,5 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	3639,3	72616,1	4456,4
SD	1452,9	10066,5	4898,5
SEM	593,2	4109,6	1999,8
signifikant			
As 0,5 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	3294,5	87499,1	5755,0
SD	1131,8	26631,1	6723,7
SEM	462,0	10872,1	2744,9
signifikant			

Tab.7 zu Abb.19. Apoptoserate [%] der cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 nach der Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen. Angegeben sind Mittelwerte, SD und SEM (n = 3).

Zeit (h) Stimulation	24	48
ohne Stimulation	3,52	15,83
	5,13	18,27
	3,70	11,00
Mittelwert	4,12	15,03
SD	0,88	3,70
SEM	0,51	2,14
Velcade® 20 ng/ml	22,12	13,50
	12,38	7,10
	5,37	6,03
Mittelwert	13,29	8,88
SD	8,41	4,04
SEM	4,86	2,33
Velcade® 10 ng/ml	6,30	18,04
	5,10	8,35
	4,82	6,82
Mittelwert	5,41	11,07
SD	0,79	6,08
SEM	0,45	3,51
Velcade® 1ng/ml	8,02	2,50
	6,90	1,70
	9,33	2,68
Mittelwert	8,08	2,29
SD	1,22	0,52
SEM	0,70	0,30

Staurosporin 2,5 μ M	17,08	34,07
	13,75	31,88
	17,50	48,53
Mittelwert	16,1	38,16
SD	2,05	9,05
SEM	1,19	5,22
H ₂ O ₂	72,05	67,17
	62,75	65,83
	52,95	72,53
Mittelwert	62,58	68,51
SD	9,55	3,55
SEM	5,51	2,05

Tab.8 zu Abb.20. Apoptoserate [%] der cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 nach der Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen. Angegeben sind Mittelwerte, SD und SEM (n = 3).

Zeit (h) Stimulation	24	48
ohne Stimulation	8,17	4,32
	8,15	1,77
	6,15	2,15
Mittelwert	7,49	2,75
SD	1,16	1,38
SEM	0,67	0,79
Rapamycin 200 nM	6,60	6,07
	4,20	4,35
	20,58	6,23
Mittelwert	10,46	5,55
SD	8,85	1,04

SEM	5,11	0,60
Rapamycin 100 nM	4,38	3,75
	3,85	1,92
	4,82	1,72
Mittelwert	4,35	2,46
SD	0,49	1,12
SEM	0,28	0,65
Rapamycin 50 nM	4,22	3,38
	3,92	1,52
	4,00	2,55
Mittelwert	4,05	2,48
SD	0,16	0,93
SEM	0,09	0,54
Rapamycin 10 nM	3,48	2,98
	5,30	2,10
	4,45	2,00
Mittelwert	4,41	2,36
SD	0,91	0,54
SEM	0,53	0,31
Staurosporin 2,5 μ M	14,90	29,68
	11,30	21,63
	13,43	24,15
Mittelwert	13,21	25,15
SD	1,81	4,12
SEM	1,05	2,38
H ₂ O ₂	14,32	44,15
	25,05	46,95
	16,18	53,13
Mittelwert	18,52	48,08
SD	5,73	4,59

SEM	3,31	2,65
-----	------	------

Tab.9 zu Abb.21. Apoptoserate [%] der cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 nach der Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen.

Angegeben sind Mittelwerte, SD und SEM (n = 3).

Zeit (h) Stimulation	24	48
ohne Stimulation	9,78	18,10
	6,38	16,73
	6,30	16,68
Mittelwert	7,49	17,17
SD	1,99	0,81
SEM	1,15	0,47
DTT 10 μ M	3,97	10,97
	6,30	15,18
	7,48	17,92
Mittelwert	5,92	14,69
SD	1,79	3,50
SEM	1,03	2,02
DTT 30 μ M	5,85	20,92
	5,50	31,10
	6,02	29,10
Mittelwert	5,79	27,04
SD	0,27	5,39
SEM	0,15	3,11
As 2 μ M	13,10	43,62
	9,82	37,50
	9,05	41,42
Mittelwert	10,66	40,85
SD	2,15	3,10
SEM	1,24	1,79

As 2 μ M+DTT 10 μ M	7,80	45,92
	10,23	39,33
	7,20	42,50
Mittelwert	8,41	42,58
SD	1,60	3,30
SEM	0,93	1,90
As 2 μ M+DTT 30 μ M	5,68	40,68
	7,42	38,38
	6,92	40,88
Mittelwert	6,67	39,98
SD	0,90	1,39
SEM	0,52	0,80
Staurosporin 2,5 μ M	28,76	47,13
	29,15	48,78
	28,02	48,68
Mittelwert	28,64	48,20
SD	0,57	0,93
SEM	0,33	0,53

Tab.10 zu Abb.22. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant bei $p < 0,05$ (*).

Zeit (h)	5	24	48
Stimulation			
Ohne Stimulation Mittelwert	78,90	101,43	129,45
SD	22,86	13,11	25,23
SEM	9,33	5,35	10,30

Velcade® 20 ng/ml Mittelwert	94,47	107,72	111,00
SD	7,72	28,30	23,30
SEM	3,15	11,55	9,51
signifikant			
Velcade® 10 ng/ml Mittelwert	103,18	125,10	100,32
SD	15,65	24,32	9,39
SEM	6,39	9,93	3,83
signifikant			
Velcade® 1 ng/ml Mittelwert	101,10	119,30	117,18
SD	51,40	18,06	6,90
SEM	20,98	7,37	2,82
signifikant			

Tab.11 zu Abb.23. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant bei $p < 0,05$ (*).

Zeit (h)	5	24	48
Stimulation			
Ohne Stimulation Mittelwert	204,7	168,6	225,0
SD	8,4	33,5	27,6
SEM	3,4	13,7	11,3
Rapamycin 200 nM Mittelwert	213,6	163,1	312,5
SD	21,3	11,4	154,2
SEM	8,7	4,7	62,9
Signifikant			

Rapamycin 100 nM Mittelwert	234,8	147,3	215,4
SD	22,1	10,4	28,7
SEM	9,0	4,2	11,7
Signifikant	*		
Rapamycin 50 nM Mittelwert	233,1	158,3	246,3
SD	22,4	33,2	78,6
SEM	9,1	13,6	32,1
signifikant	*		
Rapamycin 25 nM Mittelwert	229,3	177,5	272,9
SD	14,7	25,0	54,9
SEM	6,0	10,2	22,4
signifikant			
Rapamycin 10 nM Mittelwert	242,0	171,5	267,7
SD	35,4	26,7	86,3
SEM	14,4	10,9	35,2
signifikant	*		
Rapamycin 5 nM Mittelwert	236,1	151,7	243,8
SD	20,1	18,4	26,2
SEM	8,2	7,5	10,7
signifikant	*		

Tab.12 zu Abb.24a und 24b. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant bei p<0,05 (*).

Zeit (h)	5	24	48
Stimulation			
Ohne Stimulation Mittelwert	327,4	70,0	125,4
SD	117,4	9,7	52,4
SEM	47,9	4,0	21,4
DTT 5 µM Mittelwert	540,9	112,4	252,2
SD	320,6	29,8	134,4
SEM	130,9	12,2	54,9
signifikant			
DTT 10 µM Mittelwert	585,3	130,0	187,8
SD	217,3	39,3	64,7
SEM	88,7	16,1	26,4
signifikant			
DTT 15 µM Mittelwert	628,4	144,5	296,8
SD	107,9	27,3	96,2
SEM	44,1	11,2	39,3
signifikant			
DTT 20 µM Mittelwert	704,3	140,3	275,5
SD	208,5	25,8	63,1
SEM	85,1	10,5	25,8
signifikant			

DTT 25 μ M Mittelwert	758,4	143,4	282,5
SD	236,9	18,5	69,1
SEM	96,7	7,6	28,2
signifikant			
DTT 30 μ M Mittelwert	722,6	176,0	301,8
SD	164,4	48,1	69,6
SEM	67,1	19,6	28,4
signifikant			
As 2 μ M Mittelwert	470,2	599,1	201,2
SD	207,7	289,9	68,2
SEM	84,8	118,3	27,9
signifikant			
As 2 μ M+DTT 5 μ M Mittelwert	569,7	828,7	307,5
SD	215,9	569,1	154,9
SEM	88,1	232,4	63,2
signifikant		*	
As 2 μ M+DTT 10 μ M Mittelwert	679,7	886,1	316,6
SD	299,2	376,7	116,3
SEM	122,1	153,8	47,5
signifikant		*	
As 2 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	691,4	1125,3	383,9
SD	274,8	324,8	74,3
SEM	112,2	132,6	30,3
signifikant		*	

As 2 μ M+DTT 20 μ M Mittelwert	1020,5	927,6	413,4
SD	398,2	463,2	84,0
SEM	162,6	189,1	34,3
signifikant		*	
As 2 μ M+DTT 25 μ M Mittelwert	894,7	1312,1	433,8
SD	194,7	424,7	94,8
SEM	79,5	173,4	38,7
signifikant		*	
As 2 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	1066,1	1196,5	460,5
SD	165,4	263,9	77,4
SEM	67,5	107,7	31,6
signifikant		*	
As 1 μ M Mittelwert	491,2	354,2	232,6
SD	185,2	94,1	92,4
SEM	75,6	38,4	37,7
signifikant			
As 1 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	692,4	429,5	438,1
SD	206,1	151,4	202,2
SEM	84,1	61,8	82,5
signifikant			
As 1 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	688,0	570,4	442,1
SD	303,8	161,3	194,6
SEM	124,0	65,9	79,4
signifikant			

As 0,5 μ M Mittelwert	856,9	554,8	495,0
SD	205,6	254,6	117,7
SEM	83,9	103,9	48,1
signifikant			
As 0,5 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	939,2	571,8	465,6
SD	192,8	136,7	159,5
SEM	78,7	55,8	65,1
signifikant			
As 0,5 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	799,1	531,3	432,1
SD	256,2	256,0	135,9
SEM	104,6	104,5	55,5
signifikant			

Tab.13 zu Abb.25. 3 H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant bei $p < 0,05$ (*).

Zeit (h) Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	2656,63	25083,13	26985,86
SD	585,78	5013,55	8032,84
SEM	207,10	1772,56	2840,04
Velcade® 20 ng/ml Mittelwert	1835,13	10859,88	8591,63
SD	633,43	1202,59	1928,04
SEM	223,95	425,18	681,67
signifikant		*	

Velcade® 10 ng/ml Mittelwert	2447,25	16916,29	10840,50
SD	849,78	1844,30	3942,02
SEM	300,44	652,06	1393,71
signifikant			
Velcade® 1 ng/ml Mittelwert	2082,13	25833,63	14804,63
SD	866,83	3946,88	12088,89
SEM	306,47	1395,43	4274,07
signifikant			

Tab.14 zu Abb.26. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant bei p<0,05 (*).

Zeit (h) Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	8927,8	31581,0	33525,5
SD	1984,3	4807,9	4238,7
SEM	701,6	1699,8	1498,6
DMSO Mittelwert	7287,5	31024,5	31913,6
SD	2158,7	1800,6	1977,2
SEM	763,2	636,6	699,0
Rapamycin 20 µM Mittelwert	2066,8	10416,1	12102,1
SD	657,3	804,4	597,7
SEM	232,4	284,4	225,9
signifikant	*	*	*

Rapamycin 10 μ M Mittelwert	3669,3	21917,3	24310,3
SD	954,1	1170,3	3148,3
SEM	337,3	413,7	1113,1
signifikant	*		
Rapamycin 5 μ M Mittelwert	5144,4	25907,6	29977,9
SD	991,0	1154,1	1117,7
SEM	350,4	408,0	395,2
signifikant			
Rapamycin 1 μ M Mittelwert	3163,3	20983,0	28475,1
SD	1177,6	2273,8	1669,4
SEM	416,3	803,9	590,2
signifikant			
Rapamycin 500 nM Mittelwert	7653,0	28772,1	32521,6
SD	1055,4	1932,8	2194,8
SEM	373,1	683,4	776,0
signifikant			
Rapamycin 200 nM Mittelwert	8719,3	32355,6	33975,8
SD	1801,0	942,6	2074,9
SEM	636,7	333,2	733,6
signifikant			

Tab.15 zu Abb.27a und 27b. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant bei p<0,05 (*).

Zeit (h) / Stimulation	5	24	48
Ohne Stimulation Mittelwert	10736,3	37450,6	7092,6
SD	5441,6	7561,4	8764,3
SEM	1923,9	2673,4	3098,6
DTT 5 µM Mittelwert	14231,0	58825,5	2434,8
SD	4854,1	15013,2	317,6
SEM	1716,2	5308,0	112,3
signifikant			
DTT 10 µM Mittelwert	14350,0	51360,0	3679,0
SD	4946,3	14520,4	2087,7
SEM	1748,8	5133,7	738,1
signifikant			*
DTT 15 µM Mittelwert	10914,3	50367,3	2601,0
SD	2833,9	20411,6	428,0
SEM	1001,9	7216,6	151,3
signifikant			*
DTT 20 µM Mittelwert	16883,9	55863,8	3026,0
SD	3232,3	15371,0	2001,6
SEM	1142,8	5434,5	707,7
signifikant	*		

DTT 25 μ M Mittelwert	12631,8	52701,8	3224,0
SD	4095,8	13719,1	1541,4
SEM	1448,1	4850,4	545,0
signifikant			
DTT 30 μ M Mittelwert	13538,8	61761,5	3459,5
SD	4362,9	9200,7	1821,4
SEM	1542,5	3252,9	644,0
signifikant			
As 2 μ M Mittelwert	10062,9	68697,5	4468,8
SD	2737,6	11922,8	1117,6
SEM	967,9	4215,4	395,1
signifikant			
As 2 μ M+DTT 5 μ M Mittelwert	11833,0	87600,4	3100,5
SD	4528,7	11078,2	863,3
SEM	1601,1	3916,7	305,2
signifikant			
As 2 μ M+DTT 10 μ M Mittelwert	11662,4	71118,8	4593,1
SD	3738,3	11607,7	942,5
SEM	1321,7	4103,9	333,2
signifikant			
As 2 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	8324,3	70409,8	4724,5
SD	4299,5	12417,8	2095,7
SEM	1520,1	4390,4	740,9
signifikant			

As 2 μ M+DTT 20 μ M Mittelwert	13366,1	70287,6	5393,9
SD	3946,4	6582,2	1568,9
SEM	1395,3	2327,2	554,7
signifikant			
As 2 μ M+DTT 25 μ M Mittelwert	6525,9	65317,9	15542,3
SD	2641,1	16330,9	14364,3
SEM	933,8	5773,9	5078,5
signifikant			
As 2 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	4532,6	77521,9	4540,6
SD	2044,1	12847,0	737,2
SEM	722,7	4542,1	260,6
signifikant			
As 1 μ M Mittelwert	5871,8	63464,9	4959,8
SD	2549,9	13038,6	1095,2
SEM	901,5	4609,9	387,2
signifikant			
As 1 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	5668,4	70000,9	4515,9
SD	2503,4	11712,2	2267,6
SEM	885,1	4140,9	801,7
signifikant			
As 1 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	8401,5	82551,8	3928,3
SD	3963,1	12308,7	932,5
SEM	1401,2	4351,8	329,7
signifikant			

As 0,5 μ M Mittelwert	5036,9	73673,8	3366,6
SD	2987,1	15000,3	354,2
SEM	1056,1	5303,4	125,2
signifikant			
As 0,5 μ M+DTT 15 μ M Mittelwert	9913,9	75410,0	4071,5
SD	5490,3	12627,7	1353,0
SEM	1941,1	4464,6	478,3
signifikant			
As 0,5 μ M+DTT 30 μ M Mittelwert	7326,9	74664,9	4784,8
SD	5072,2	10076,2	2995,1
SEM	1793,3	3562,5	1058,9
signifikant			

Tab.16 zu Abb.39. Apoptoserate [%] der cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 nach der Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen. Angegeben sind Mittelwerte, SD und SEM (n = 3).

Zeit (h) Stimulation	24	48
ohne Stimulation	6,75	4,27
	5,83	6,17
	4,43	3,90
Mittelwert	5,67	4,78
SD	1,17	1,22
SEM	0,67	0,70

Velcade® 20 ng/ml	10,55	23,32
	9,85	24,42
	9,57	24,78
Mittelwert	9,99	24,17
SD	0,50	0,76
SEM	0,29	0,44
Velcade® 10 ng/ml	5,50	22,60
	4,77	26,90
	5,25	28,98
Mittelwert	5,17	26,16
SD	0,37	3,25
SEM	0,21	1,88
Velcade® 1ng/ml	4,22	3,37
	4,13	3,68
	3,85	5,43
Mittelwert	4,07	4,16
SD	0,19	1,11
SEM	0,11	0,64
Staurosporin 2,5 µM	27,95	49,50
	33,75	45,55
	29,72	49,30
Mittelwert	30,47	48,12
SD	2,97	2,23
SEM	1,72	1,28
H ₂ O ₂	80,78	91,48
	73,38	91,78
	70,05	93,37
Mittelwert	74,74	92,21
SD	5,49	1,02
SEM	3,17	0,59

Tab.17 zu Abb.40. Apoptoserate [%] der cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 nach der Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen. Angegeben sind Mittelwerte, SD und SEM (n = 3).

Zeit (h) Stimulation	24	48
ohne Stimulation	3,55	5,62
	2,78	6,48
	2,28	3,62
Mittelwert	2,87	5,24
SD	0,64	1,47
SEM	0,37	0,85
Rapamycin 200 nM	6,48	6,58
	4,28	4,02
	5,20	4,92
Mittelwert	5,32	5,17
SD	1,10	1,30
SEM	0,64	0,75
Rapamycin 100 nM	2,75	4,78
	3,30	3,82
	3,08	4,03
Mittelwert	3,04	4,21
SD	0,28	0,50
SEM	0,16	0,29
Rapamycin 50 nM	3,22	5,47
	4,30	4,07
	2,82	5,35
Mittelwert	3,45	4,96
SD	0,77	0,78
SEM	0,44	0,45

Rapamycin 10 nM	3,18	4,02
	3,15	6,17
	3,13	4,72
Mittelwert	3,15	4,97
SD	0,03	1,10
SEM	0,01	0,63
Staurosporin 2,5 μ M	33,42	65,47
	40,63	68,13
	34,35	66,00
Mittelwert	36,13	66,53
SD	3,92	1,41
SEM	2,26	0,81
H ₂ O ₂	95,93	79,07
	93,22	76,63
	95,17	76,22
Mittelwert	94,77	77,31
SD	1,40	1,54
SEM	0,81	0,89

Tab.18 zu Abb.41. Apoptoserate [%] der cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG-1 nach der Stimulation mit verschiedenen Stimulanzen. Angegeben sind Mittelwerte, SD und SEM (n = 3).

Zeit (h) Stimulation	24	48
ohne Stimulation	3,47	12,10
	3,57	11,93
	3,98	11,47
Mittelwert	3,67	11,83
SD	0,27	0,33
SEM	0,16	0,19

DTT 10 μ M	3,60	16,10
	4,50	12,85
	3,30	17,47
Mittelwert	3,80	15,47
SD	0,62	2,37
SEM	0,36	1,37
DTT 30 μ M	3,63	14,03
	3,73	14,35
	3,93	11,92
Mittelwert	3,76	13,43
SD	0,15	1,32
SEM	0,09	0,76
As 2 μ M	4,73	15,83
	3,95	14,65
	4,42	15,65
Mittelwert	4,37	15,38
SD	0,39	0,64
SEM	0,23	0,37
As 2 μ M+DTT 10 μ M	5,43	15,37
	3,77	22,45
	4,18	14,70
Mittelwert	4,46	17,51
SD	0,86	4,29
SEM	0,50	2,48
As 2 μ M+DTT 30 μ M	3,55	6,43
	4,00	10,45
	3,77	10,70
Mittelwert	3,77	9,19
SD	0,23	2,40
SEM	0,13	1,38

Staurosporin 2,5 μ M	14,07	75,98
	14,85	71,72
	13,72	79,73
Mittelwert	14,21	75,81
SD	0,58	4,01
SEM	0,33	2,31

8. Literaturverzeichnis

Arturi F, Russo D, Schlumberger M et al. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83:2493-96.

Au WY, Chim CS, Lie AK, Liang R, Kwong YL. Combined arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia recurring from previous relapses successfully treated using arsenic trioxide. *Br J Haematol* 2002;117:130-132.

Bauch K, Anke M, Gurtler H et al. Interdisciplinary aspects of iodine prophylaxis in German Democratic Republic. *Endocrinol Exp* 1989;23:77-84.

Berghout A, Wiersinga WM, Smits NJ, Touber JL. Interrelationships between age, thyroid volume, thyroid nodularity, and thyroid function in patients with sporadic nontoxic goiter. *Am J Med* 1990;89:602-8.

Bidart JM, Mian C, Lazar V et al. Expression of pendrin and the Pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:2028-33.

Brauckhoff M, Kamprad M, Steuber J. Medical palliative therapy of meningiosis carcinomatosa of breast carcinoma with dissociated response in lumbar methotrexate instillation. *Med Klin (Munich)* 2001;96:545-49.

Chan IT, Kutok JL, Williams IR et al. Oncogenic K-ras cooperates with PML-RAR alpha to induce an acute promyelocytic leukemia-like disease. *Blood* 2006;108:1708-15.

Chen G, Shen Z, Zhu AP. [Pharmacokinetics and efficacy of low-dose all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1997;36:295-99.

Choi YJ, Park JW, Suh SI et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis in U937 cells involve generation of reactive oxygen species and inhibition of Akt. *Int J Oncol* 2002;21:603-10.

De L, V, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev* 2000;80:1083-105.

Dou QP, Goldfarb RH. Bortezomib (millennium pharmaceuticals). *IDrugs* 2002;5:828-34.

Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003;169:251-58.

Glogowska A, Pyka J, Kehlen A et al. The cytoplasmic domain of proEGF negatively regulates motility and elastinolytic activity in thyroid carcinoma cells. *Neoplasia* 2008;10:1120-1130.

Grimm D, Hofstadter F, Bauer J et al. Establishment and characterization of a human papillary thyroid carcinoma cell line with oxyphilic differentiation (ONCO-DG 1). *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992;62:97-104.

Gurr JR, Bau DT, Liu F, Lynn S, Jan KY. Dithiothreitol enhances arsenic trioxide-induced apoptosis in NB4 cells. *Mol Pharmacol* 1999a;56:102-9.

Gurr JR, Bau DT, Liu F, Lynn S, Jan KY. Dithiothreitol enhances arsenic trioxide-induced apoptosis in NB4 cells. *Mol Pharmacol* 1999b;56:102-9.

Hampel R, Ronsch K. [Despite use of iodized salt in individual food preparation there remains a 1st degree iodine deficiency in Germany]. *Z Gesamte Inn Med* 1993;48:401-3.

Hofbauer LC, Rafferzeder M, Janssen OE, Gartner R. Insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles is regulated by thyrotropin and iodine. *Eur J Endocrinol* 1995;132:605-10.

Iwata M, Mukai M, Nakai Y, Iseki R. Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes. *J Immunol* 1992;149:3302-8.

Karavitaki N, Vlassopoulou V, Tzanela M, Tzavara I, Thalassinou N. Recurrent and/or metastatic thyroid cancer: therapeutic options. *Expert Opin Pharmacother* 2002;3:939-47.

Klutmann S, Jenicke L, Geiss-Tonshoff M, Bohuslavizki KH, Mester J, Clausen M. [Prevalence of iodine- and thyroglobulin-negative findings in differentiated thyroid cancer. A retrospective analysis of patients treated from 1951 to 1998 in university hospital]. *Nuklearmedizin* 2001;40:143-47.

Kumar A, Bal CS. Differentiated thyroid cancer.
Indian J Pediatr 2003;70:707-13.

Law BK, Chytil A, Dumont N et al. Rapamycin potentiates transforming growth factor beta-induced growth arrest in nontransformed, oncogene-transformed, and human cancer cells. *Mol Cell Biol* 2002a;22:8184-98.

Law BK, Chytil A, Dumont N et al. Rapamycin potentiates transforming growth factor beta-induced growth arrest in nontransformed, oncogene-transformed, and human cancer cells. *Mol Cell Biol* 2002b;22:8184-98.

Lawrence JE, Lamm SH, Pino S, Richman K, Braverman LE. The effect of short-term low-dose perchlorate on various aspects of thyroid function. *Thyroid* 2000;10:659-63.

Lemos PA, Serruys PW, van Domburg RT et al. Unrestricted utilization of sirolimus-eluting stents compared with conventional bare stent implantation in the "real world": the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) registry. *Circulation* 2004;109:190-195.

Lin JD, Ho YS, Chang HY, Weng HF. The role of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in follicular thyroid cancer cell line CGTH W-1. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1995;31:817-21.

Mackenzie EJ, Mortimer RH. 6: Thyroid nodules and thyroid cancer.
Med J Aust 2004;180:242-47.

Maeda H, Hori S, Nishitoh H et al. Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As₂O₃) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer. *Cancer Res* 2001;61:5432-40.

Maiorino RM, Aposhian HV. Determination and metabolism of dithiol chelating agents. IV. Urinary excretion of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and mercaptosuccinic acid in rabbits given meso-2,3-dimercaptosuccinic acid. *Biochem Pharmacol* 1989;38:1147-54.

Mann K. [Thyroid autonomy, cyst or thyroid cancer].
MMW Fortschr Med 2008;150:25, 27-25, 29.

Mayer C, Grummt I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 2006a;25:6384-91.

Mayer C, Grummt I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 2006b;25:6384-91.

McDonnell TJ, Nunez G, Platt FM et al. Deregulated Bcl-2-immunoglobulin transgene expands a resting but responsive immunoglobulin M and D-expressing B-cell population. *Mol Cell Biol* 1990;10:1901-7.

Mehilli J, Kastrati A, Wessely R et al. Randomized trial of a nonpolymer-based rapamycin-eluting stent versus a polymer-based paclitaxel-eluting stent for the reduction of late lumen loss. *Circulation* 2006;113:273-79.

Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002a;62:3893-903.

Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002b;62:3893-903.

Nagy EV, Morris JC, Burch HB, Bhatia S, Salata K, Burman KD. Thyrotropin receptor T cell epitopes in autoimmune thyroid disease. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:117-24.

Noff D, Pitaru S, Savion N. Basic fibroblast growth factor enhances the capacity of bone marrow cells to form bone-like nodules in vitro. *FEBS Lett* 1989;250:619-21.

Paubelle E, Coppo P, Garderet L et al. Complete remission with bortezomib on plasmacytomas in an end-stage patient with refractory multiple myeloma who failed all other therapies including hematopoietic stem cell transplantation: possible enhancement of graft-vs-tumor effect. *Leukemia* 2005;19:1702-4.

Reiners C, Wegscheider K, Schicha H et al. Prevalence of thyroid disorders in the working population of Germany: ultrasonography screening in 96,278 unselected employees. *Thyroid* 2004;14:926-32.

Richardson PG, Hideshima T, Mitsiades C, Anderson K. Proteasome inhibition in hematologic malignancies. *Ann Med* 2004;36:304-14.

Richardson PG, Mitsiades C, Hideshima T, Anderson KC. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 2006;57:33-47.

Rodriguez AM, Perron B, Lacroix L et al. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:3500-3503.

Rojewski MT, Baldus C, Knauf W, Thiel E, Schrezenmeier H. Dual effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation. *Br J Haematol* 2002;116:555-63.

Ruiz-Arguelles GJ, Morales-Toquero A, Gomez-Rangel JD, Lopez-Martinez B, Ruiz-Delgado GJ, Reyes-Nunez V. Treatment of acute promyelocytic leukemia: a single institution experience. *Rev Invest Clin* 2005;57:415-19.

Ruygrok PN, Muller DW, Serruys PW. Rapamycin in cardiovascular medicine. *Intern Med J* 2003;33:103-9.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A et al. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* 1998;101:1296-300.

Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC et al. The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1992;75:714-20.

Samaniego M, Becker BN, Djamali A. Drug insight: maintenance immunosuppression in kidney transplant recipients. *Nat Clin Pract Nephrol* 2006;2:688-99.

Schenkein D. Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies. *Clin Lymphoma* 2002;3:49-55.

Schmutzler C. Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids--a review. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2001;109:41-44.

Schmutzler C, Kohrle J. Implications of the molecular characterization of the sodium-iodide symporter (NIS). *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1998;106 Suppl 3:S1-10.

Schultze K, Bock B, Eckert A et al. Troglitazone sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via down-regulation of FLIP and Survivin. *Apoptosis* 2006;11:1503-12.

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* 1999;21:440-443.

Simon D, Korber C, Krausch M et al. Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:775-82.

Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology* 1997;138:3555-58.

Soignet SL. Clinical experience of arsenic trioxide in relapsed acute promyelocytic leukemia. *Oncologist* 2001;6 Suppl 2:11-16.

Spitzweg C, Baker CH, Bergert ER, O'Connor MK, Morris JC. Image-guided radioiodide therapy of medullary thyroid cancer after carcinoembryonic antigen promoter-targeted sodium iodide symporter gene expression. *Hum Gene Ther* 2007;18:916-24.

Spitzweg C, Morris JC. Sodium iodide symporter (NIS) and thyroid. *Hormones (Athens)* 2002;1:22-34.

Szebeni J, Patel SS, Hung K, Wahl LM, Weinstein JN. Effects of thymidine and uridine on the phosphorylation of 3'-azido-3'-deoxythymidine (zidovudine) in human mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:198-200.

Thamm M, Ellert U, Thierfelder W, Liesenkotter KP, Volzke H. [Iodine intake in Germany. Results of iodine monitoring in the German Health Interview and Examination Survey for Children and Adolescents (KiGGS)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2007;50:744-49.

Van Herle AJ, Agatep ML, Padua DN, III et al. Effects of 13 cis-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA R0 82 W-1) in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;71:755-63.

Vuky J, Yu R, Schwartz L, Motzer RJ. Phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2002;20:327-30.

Wang ZY. Mechanism of action of all-trans retinoic acid and arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Gan To Kagaku Ryoho* 2002;29 Suppl 1:214-18.

Weitzel JM, Iwen KA, Seitz HJ. Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp Physiol* 2003;88:121-28.

Wolff J. What is the role of pendrin? *Thyroid* 2005;15:346-48.

Zhang LX, Mills KJ, Dawson MI, Collins SJ, Jetten AM. Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J Biol Chem* 1995a;270:6022-29.

Zhang LX, Mills KJ, Dawson MI, Collins SJ, Jetten AM. Evidence for the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids. *J Biol Chem* 1995b;270:6022-29.

9. Danksagung

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

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Wahl 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 Prof. Dr. E. Fröhlich für ihre Ratschläge und Hilfe bei der Auswertung der Immunzytochemie herzlich bedanken.

Frau Inge Fink möchte ich für die nette Betreuung, sorgfältige Einarbeitung und Hilfsbereitschaft im Isotopenlabor danken.

Mein Dank gilt auch Frau Maier, Anatomisches Institut Universität Tübingen, für die Hilfe bei der immunhistochemischen Bestimmung.

Für die Auswertung der FACS-Analyse danke ich den Medizinisch Technischen Assistentinnen Frau Stephan und Frau Schuster der AG von Prof. Brossart, Abt.II, Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen.

Auch Herr Prof. Dr. Klaus Dietz vom Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen gebührt mein Dank für die gute statistische Beratung.

Zuletzt möchte ich mich noch recht herzlich bei meiner Familie, besonders bei meinem Ehemann Edmund und meiner Schwester Armella für die Hilfe bei Computerfragen, bedanken.

Lebenslauf

Name: Renate Schmidt, geb. Bleicher

Geburtsdatum: 29.04.1972

Geburtsort: Duschanbe/Tadschikistan

Staatsangehörigkeit: Deutsch

Familienstand: verheiratet seit 1993

Schulische Ausbildung:

1979-1987	Mittelschule in Duschanbe/Tadschikistan
1987-1991	Mädchenrealschule St. Ursula in Augsburg
1991-1993	Staatliche Fachoberschule in Augsburg

Ausbildungsrichtung: Technik

Studium:

1994-1996	Fachhochschule Esslingen für Technik
	Studiengang: Technische Informatik
1997	Exmatrikulation
1998	Abiturprüfung für Schulfremde
	Schickhardt Gymnasium in Stuttgart

2001-2008	Zahnmedizinstudium
	Eberhard Karls Universität Tübingen
24.11.2008	Staatsexamen, Zahnärztliche Prüfung

08.12.2008 Approbation als Zahnärztin

Ab März 2009 als Assistenz Zahnärztin tätig