

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen  
Abteilung Innere Medizin IV  
Ärztlicher Direktor Professor Dr. H. U. Häring

**Charakterisierung der Effekte verschiedener  
differenzierungsaktiver Substanzen auf Apoptose,  
Proliferation, Iodidstoffwechsel,  
Pendrin- und NIS-Expression in der cancerogenen  
Schilddrüsenzelllinie CGTH-W-1**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Diana Hilbert  
aus  
Hechingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wahl

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. E. Fröhlich

**meiner Mami**

## Abkürzungen

- Abb.: Abbildung
- AP: Alkalische Phosphatase
- ATO: Arsen trioxid
- Bq: Becquerel, ein Zerfall pro Sekunde
- CPM: Counts per minute
- DMSO: Dimethylsulfoxid
- FACS: Fluorescence activated cell sorter
- g: Gramm
- $\mu\text{g}$ : Mikrogramm
- g: Gravitation, Erdbeschleunigung
- h: Stunde
- kBq: KiloBecquerel
- l: Liter
- M: Molare Masse, Molarität
- $\mu\text{M}$ : mikromolar
- mg: Milligramm
- min: Minute
- ml: Milliliter
- mmol: Millimol
- $\mu\text{l}$ : Mikroliter
- NIS: Natrium-Iodid-Symporter
- p: statistische Wahrscheinlichkeit
- PI: Propidiumiodid
- PBS: phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Lösung)
- PDS: Pendrin
- RAR $\alpha$ : Retinoid acid receptor  $\alpha$
- RXR $\alpha$ : Retinoid X receptor  $\alpha$
- s: Sekunde
- SD: Standardabweichung
- SEM: Standardfehler des Mittelwertes
- Tab.: Tabelle

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung und Fragestellung</b> .....	<b>5</b>
<b>2.</b>	<b>Material</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b>	Untersuchungsmaterial.....	12
<b>2.2</b>	Geräte für die Zellkulturen.....	12
<b>2.3</b>	Geräte zur Messung der <sup>125</sup> I- und [6- <sup>3</sup> H]Thymidin-Aufnahme.....	12
<b>2.4</b>	Geräte für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	13
<b>2.5</b>	Geräte für die Apoptosemessung.....	13
<b>2.6</b>	Geräte für die immunzytochemische Bestimmung von Pendrin und NIS.....	13
<b>2.7</b>	Medien und Reagenzien.....	13
<b>2.8</b>	Reagenzien für die FACS-Analyse.....	15
<b>2.9</b>	Reagenzien für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	15
<b>2.10</b>	Antikörper, Marker und Reagenzien für den Western Blot.....	16
<b>2.11</b>	Reagenzien für die immunzytochemische Bestimmung.....	17
<b>3.</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	Zellzählung.....	18
<b>3.2</b>	Herstellung der Kulturen und Kulturbedingungen.....	18
<b>3.3</b>	Testsubstanzen.....	19
<b>3.4</b>	Mycoplasmennachweis.....	20
<b>3.5</b>	Cytochemische Darstellung von NIS und Pendrin.....	20
<b>3.6</b>	Proteinisolierung und –bestimmung.....	22
<b>3.7</b>	Semiquantitative Bestimmung von Proteinen mittels Western Blot.....	23
<b>3.8</b>	FACS-Analyse.....	26
<b>3.9</b>	Statistische Auswertung.....	27

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	28
<b>4.1</b>	$^{125}\text{I}$ -Iodid- und $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in transformierte cancerogene Thyreozyten .....	28
<b>4.1.1</b>	$^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe zum Zeitpunkt der Zellaussaat).....	28
<b>4.1.2</b>	$^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe zum Zeitpunkt der Zellaussaat).....	29
<b>4.1.3</b>	$^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe 23 Stunden nach der Zellaussaat).....	31
<b>4.1.4</b>	$^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe 23 Stunden nach der Zellaussaat).....	32
<b>4.1.5</b>	$^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Thyreozyten nach 7-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen ( $^{125}\text{I}$ -Iodidzugabe zu den Zellen am 7. Tag).....	33
<b>4.1.6</b>	$^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Thyreozyten nach 7-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen ( $^3\text{H}$ -Thymidinzugabe zu den Zellen am 7. Tag).....	35
<b>4.1.7</b>	$^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Thyreozyten nach 14-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen ( $^{125}\text{I}$ -Iodidzugabe zu den Zellen am 14. Tag).....	36
<b>4.1.8</b>	$^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Thyreozyten nach 14-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen ( $^3\text{H}$ -Thymidinzugabe zu den Zellen am 14. Tag).....	38
<b>4.1.9</b>	$^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Valproinsäure.....	39
<b>4.1.10</b>	$^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Valproinsäure.....	40

<b>4.1.11</b>	<sup>125</sup> I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid.....	41
<b>4.1.12</b>	<sup>3</sup> H-Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid.....	43
<b>4.1.13</b>	<sup>125</sup> I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von Akt Inhibitor V (Triciribine) unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid.....	43
<b>4.2</b>	Photographische Abbildungen der follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen.....	46
<b>4.3</b>	Einfluss verschiedener Differenzierungssubstanzen auf die Apoptose.....	49
<b>4.3.1</b>	Einfluss von Troglitazon, APHA Compound 8, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Mevinolin, Arsentrioxid, all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure auf die Apoptose maligner humaner Thyreozyten.....	49
<b>4.3.2</b>	Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid (ATO) auf die Apoptose maligner humaner Thyreozyten.....	56
<b>4.4</b>	Immunhistochemische Detektion von NIS und Pendrin in den cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.....	61
<b>4.4.1</b>	Qualitative Auswertung.....	61
<b>4.4.2</b>	Photographische Präsentation.....	62
<b>4.4.3</b>	Einfluss von Retinoiden, Mevinolin und Valproinsäure auf die NIS- und die Pendrin-Expression in cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.....	62
<b>4.4.3.1</b>	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	65
<b>4.4.4</b>	Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin und Arsentrioxid auf die NIS- und die Pendrin-Expression in cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.....	66

4.4.4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	67
4.4.5	Einfluss von Akt Inhibitor I und Akt Inhibitor V in Kombination mit 2 µM Arsentrioxid auf die NIS- und die Pendrin-Expression in cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 .....	68
4.4.5.1	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	70
4.5	Semiquantitative Bestimmung von NIS und Pendrin mittels Western Blot.....	71
4.6	Kurze Übersicht über das Wirkprofil der untersuchten Substanzen..	73
5.	<b>Diskussion</b> .....	74
5.1	Einfluss unterschiedlicher differenzierungsaktiver Substanzen auf die Apoptose, die Proliferation und den Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.....	75
5.2	Einfluss verschiedener differenzierungsaktiver Substanzen auf die Protein-Expression von NIS- und PDS.....	80
6.	<b>Zusammenfassung</b> .....	83
7.	<b>Anhang</b> .....	85
8.	<b>Literatur</b> .....	133
9.	<b>Danksagung</b> .....	142



## **1. Einleitung und Fragestellung**

Jod ist das Schlüsselement der Schilddrüse und ist für die Schilddrüsenhormonsynthese notwendig. Jodid muss in ausreichender Menge exogen zugeführt werden. Steht der Schilddrüse nicht genug Jod zur Verfügung, so kommt es zur Entwicklung einer Struma mit oder ohne Hypothyreose. In solchen Strumen können sich später warme und heiße Knoten in Form einer funktionellen Autonomie entwickeln, oder es können kalte Areale auftreten, hinter denen sich ein Schilddrüsenkarzinom verbergen kann.

Die empirischen Kenntnisse über den Zusammenhang der alimentären Jodaufnahme und der Bildung einer Struma reichen weit zurück. Jod wurde im Jahre 1811 durch Courtois entdeckt, und seitdem findet seine Anwendung eine wissenschaftliche Basis. Bereits 1820 wurde Jod zur Kropftherapie eingesetzt (Bauch et al., Endokrinologie Informationen, 2003).

Schilddrüsenhormone haben auf die Entwicklung der Organe und deren Energiestoffwechsel einen weitreichenden Einfluss. Es gibt kein Organ im Körper, welches nicht unter dem Einfluss der Schilddrüsenhormone steht.

Für den Transport von Iodid in die Schilddrüse ist ein Natrium-abhängiger Iodidtransporter verantwortlich. Dieser „Natrium-Iodid-Symporter“ (NIS) transportiert unter ATP-Verbrauch zwei  $\text{Na}^+$ -Ionen und ein  $\text{J}^-$ -Ion in die Schilddrüse. Der zur Familie der natriumabhängigen Transportmoleküle zählende NIS (Abb.1) ist ein integrales Membranprotein mit 13 Transmembrandomänen, dessen Aminoterminus extrazellulär und dessen Carboxyterminus intrazellulär liegt (Smanik PA et al., 1997, De la Vieja A et al., 2000).



Ausschaltung von Restschilddrüsengewebe nach der Operation, die Zerstörung nicht operabler Resttumoren oder Lokalmetastasen und die Behandlung von Fernmetastasen durch  $^{131}\text{J}$  ist dadurch erschwert oder unmöglich (Reinwein et al., 1996).

Um unter diesen ungünstigen Voraussetzungen eine Radioiodtherapie zu optimieren, wird heute eine medikamentöse Redifferenzierung der transformierten Thyreozyten versucht.

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 (Simon 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, Fröhlich und Wahl, 1999, Zhang et al., 1995).

Van Herle et al. (1990) untersuchten den Effekt von 13-cis-Retinsäure auf die Differenzierung von follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen der Zelllinie UCLARO 82 W-1 und fanden heraus, dass die Retinsäure das Zellwachstum wesentlich hemmt und gleichzeitig zu einer deutlichen Redifferenzierung einiger Zellfunktionen führt. Die Autoren erzielten damit gegenüber der Kontrolle einen fast 4-fachen Anstieg der  $^{131}\text{J}$ -Aufnahme in follikuläre Tumorzellen. Simon et al. (1996) verabreichten 10 Patienten mit einem fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinom 6 Wochen lang 1,5 mg 13-cis-Retinsäure pro Kilogramm Körpergewicht. Danach zeigte sich bezogen auf die Kontrollgruppe bei 4 von 10 Patienten nach der Gabe von radioaktiv markiertem Jod ein Anstieg der Radioiodinkorporation. Die Tumorzellen werden dadurch einer Radioiodtherapie wesentlich besser zugänglich gemacht.

Die den follikulären Schilddrüsenmalignomen zugrunde liegende Chromosomentranslokation zeigt Parallelen zur Chromosomentranslokation bei der Promyelocytenleukämie.

Ruiz-Arguelles GJ. et al. (2005) behandelten Patienten, die an einer Akuten Promyelozytenleukämie erkrankt waren mit all-trans-Retinsäure. Bei 14 Patienten mit einem mittleren Alter von 30 Jahren mit Promyelozytenleukämie, die mit all-trans-Retinsäure kombiniert mit Chemotherapie und prophylaktischer Prednison-Gabe behandelt wurden, wurde eine komplette Remission in 93 % der Fälle erzielt.

Mevinolin, ein Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase Inhibitor induziert nach Untersuchungen von Di Matola et al. (2001) Apoptose in der Schilddrüsenkarzinomzelllinie TAD-2 und in normalen Schilddrüsenzellen in Kultur. Die Kombination von Mevinolin mit anderen tumorwachstumshemmenden Medikamenten ermöglicht nach Di Matola et al. (2001) die Chemotherapie von Tumoren und könnte auch in der Behandlung von Schilddrüsentumoren Erfolge zeigen.

Die Wirkung von Arsentrioxid (ATO) auf Tumoren kann nach Wilson H. Miller et al. (2002) in der Induktion von Apoptose, der Hemmung von Wachstum und Angiogenese und der Förderung der Differenzierung resultieren. Derartige Effekte wurden von den Autoren in kultivierten Zelllinien (z.B. MCF-7) und Tierversuchen mit Mäusen und auch in klinischen Studien beobachtet. Sie beobachteten auch, dass Arsen auf viele zelluläre und physiologische Stoffwechselfvorgänge einwirkt. Dies erklärt, weshalb Blutkrebs und viele maligne Tumoren, welche von verschiedenen Gewebetypen stammen, für eine Therapie mit Arsentrioxid empfänglich sind.

Forscher in China (Wilson H. Miller et al., 2002) setzten Arsentrioxid alleine und in Kombination mit Chemotherapien als ein Krebstherapeutikum für Patienten mit Akuter Promyelozytenleukämie (APL) ein und erreichten eine beachtenswerte Steigerung an kompletten Remissionen. Bei Patienten mit APL stieg die Rate kompletter Remission von 70 % auf 90 % an und bei Rezidivpatienten sogar von 65 % auf mehr als 90 % (Sun H. D. et al., 1992, Shen Z-X. et al., 1997, Niu C. et al., 1998, Niu C. et al., 1999, Wilson H. Miller, 2002).

Akt/Proteinkinase B ist eine Serin/Threonin-Kinase und ein entscheidendes Enzym in der Signaltransduktion für Vorgänge der Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese. Phosphoryliertes Akt sorgt für ein Überleben von Zellen und verhindert den Zelltod durch Apoptose. Bei vielen Malignomen ist Akt jedoch dysreguliert und verstärkt aktiv

(Rosen N. und Qing-Bai She, 2006). Bei Zelllinien von Schilddrüsenmalignomen konnte ebenfalls eine Akt-Aktivierung nachgewiesen werden (Ringel et al., 2001). Aus diesem Grunde ist es naheliegend bei Schilddrüsenmalignomen Akt-Inhibitoren zu testen. Auch Arsentrioxid führt zu einer Hemmung von Akt (Choi et al., 2002). Aus diesem Grunde ist es interessant zu wissen, ob sich beide Substanzen in ihrer Wirkung verstärken.

Die Thiazolidindione, eine Substanzgruppe, zu der Troglitazon gehört, werden zur Behandlung des Typ 2-Diabetes eingesetzt. Mit dieser Medikamentengruppe wird der Pathomechanismus der Erkrankung, die Insulinresistenz, direkt angegangen, anstatt dem Diabetiker vermehrt Insulin zu verabreichen (Janka, 2001). Die Verbesserung der Insulinempfindlichkeit durch die Thiazolidindione scheint durch Bindung der Substanz an den Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) und seine Aktivierung vermittelt zu werden (Verspohl et al., 2002). Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma (PPAR $\gamma$ ) wurde auch in Verbindung gebracht mit der Differenzierung und der Wachstumshemmung von Krebszellen (Yu J. et al., 2006). Yu J. et al. untersuchten die Effekte der PPAR $\gamma$ -Aktivierung durch Troglitazon auf das Zellwachstum, die Proliferation und die Apoptose des Leberzellkarzinoms (HCC) in vitro und in vivo. Die Behandlung eines humanen Leberzellkarzinoms (Huh7) mit Troglitazon, welches auf eine Maus übertragen wurde, führte zu einem deutlich reduzierten Tumorwachstum und zu einem Tumorrückgang (Yu J. et al., 2006).

5-Aza-2'-deoxycytidin gehört zur Substanzgruppe der DNA-Methyltransferase-Hemmer. Zu den sechs bekanntesten DNA-Methyltransferase-Hemmer gehören 5-Azacytidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Zebularin, Procain, (-)-Epigallocatechin-3-Gallat und RG108. 5-Azacytidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Zebularin und (-)-Epigallocatechin-3-Gallat wiesen nach Untersuchungen von Stresemann C. et al. (2006) eine erhebliche Zytotoxizität in humanen Krebszelllinien vor. Bei 5-Aza-2'-deoxycytidin und (-)-Epigallocatechin-3-Gallat wurde außerdem noch eine genotoxische Wirkung nachgewiesen (Stresemann C. et al., 2006).

DNA-Methyltransferase-Hemmer stellen eine neue erfolgversprechende Medikamentengruppe für die Krebstherapie dar (Stresemann C. et al., 2006). Als erster DNA-Methyltransferase-Hemmer dieser Gruppe wurde 5-Azacytidin 2004 als ein antitumoraler Wirkstoff in den USA als sogenanntes Orphan Drug zugelassen, die

anderen befinden sich derzeit in verschiedenen Phasen ihrer vorklinischen und klinischen Entwicklung (Stresemann C. et al., 2006).

Valproinsäure wird seit den 60er Jahren als Antiepilektikum therapeutisch eingesetzt (Cinatl J. Jr. et al., 1996). Cinatl hatte mit seiner Arbeitsgruppe bereits Mitte der 90er Jahre die antitumorale Wirkung therapeutischer Valproinsäure-Konzentrationen gegenüber Neuroblastomzellen weltweit erstmalig erkannt und propagiert (Cinatl J. Jr. et al., 1996 und 1997). Valproinsäure zeigte bei 20 % der Patienten mit Gliomen, bei denen es zur Entwicklung eines Rezidivs kam, eine antitumorale Wirkung. Bei ca. 10 % der behandelten Patienten führte die Valproinsäure-Behandlung zu einer Komplett-Remission (Blaheta RA. et al., 2004). Aktuelle experimentelle Befunde aus Cinatls Arbeitsgruppe zeigen, dass Valproinsäure die Angiogenese, d. h. die Bildung neuer Blutgefäße hemmt (Michaelis M. et al., 2004). Da die Tumorangio-genese für die Entwicklung eines Tumors essentiell ist, wird sie als antitumorale Behandlungsstrategie genutzt.

Die pharmakologische Beeinflussung der Chromatinremodellierung durch Histon-Deacetylase-Hemmer (HDAC) hat sich zu einer wirksamen und spezifischen Strategie in der Krebsbehandlung entwickelt (Kouraklis G. et al., 2002). Zu der Substanzgruppe der Histon-Deacetylase-Hemmer gehört u. a. Apicidin und APHA Compound 8. Veränderungen in der Histon-Acetylierung können zu Änderungen in der Chromatinstruktur und zur transkriptionellen Fehlregulierung von Genen führen, die entweder für die Steuerung der Zellzykluszunahme oder die Zelldifferenzierung und/oder Apoptose verantwortlich sind (Kouraklis G. et al., 2002). Histon-Deacetylierung wird im Allgemeinen mit Zell- und Tumorwachstum in Verbindung gebracht. HDAC-Hemmer haben gezeigt, dass sie therapeutisch nützlich sind, um die Angiogenese und den Zellzyklus zu blockieren und die Apoptose und die Differenzierung zu fördern (Marks P. et al., 2001). Aus klinischen Studien geht hervor, dass eine Histon-Hyperacetylierung von Krebszellgenen leicht zu erzielen ist und dass es möglich ist, Krebs mit Histon-Deacetylase-Hemmern zu behandeln. Derartige Substanzen sind daher nach Kouraklis et al. (2002) eine der vielversprechendsten Substanzklassen in der Krebstherapie.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von ausgewählten Vertretern der oben aufgeführten Stoffklassen auf das Proliferationsverhalten und den Stoffwechsel transformierter Thyreozyten zu untersuchen. Folgende Substanzen wurden ausgewählt: Troglitazon, Apicidin, APHA Compound 8, Mevinolin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, all-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure, all-trans-Retinol, Valproinsäure, Arsenitoxid mit und ohne Akt Inhibitor I und Akt Inhibitor V. Parameter für den spezifischen Stoffwechsel kultivierter transformierter humaner Thyreozyten war die  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Aufnahme und als Parameter für die Voraussetzung zur Proliferation wurde die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme gemessen. Als transformierte Thyreozyten wurden hierfür humane Schilddrüsenkarzinomzellen eingesetzt, welche von Brustmetastasen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms einer 70 Jahre alten Chinesin stammten. Von dieser Patientin gibt es eine immortalisierte Zelllinie mit der Abkürzung CGTH-W-1 (Lin et al., 1995). Parallel wurde mit Hilfe der FACS-Analyse die Apoptoserate anhand des Anteils hypodiploider Kerne unter den oben aufgeführten Substanzen bestimmt.

Außerdem wurde bei den karzinogenen Thyreozyten noch der Einfluss der getesteten Stimulanzien auf die Proteinexpression des Natrium-Iodid-Symporters und die Proteinexpression von Pendrin immunzytochemisch und mit Hilfe Western Blots bestimmt.

## **2. Material**

### **2.1 Untersuchungsmaterial**

- Follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen der Zelllinie CGTH-W-1 (DSZM, ACC 360)

### **2.2 Geräte für die Zellkulturen**

- Sterile Werkbank, Heraeus
- Zentrifuge Hettich Rotixa/RP, (Hettich, Tuttlingen)
- Zentrifugenröhrchen (50 ml), (Falcon Blue Max, Becton Dickinson, USA)
- Mikroskop Olympus, IX 51
- Brutschränke: HERAcell, Kendro Laboratory Products  
HERAcell 240, Kendro Laboratory Products
- Inotech Cell-Harvester, ICH 280, Inotech AG, Schweiz
- Filtermatten: Für  $^{125}\text{I}$ : Betaplate Scint  
Wallac Scintillation Products, Turku Oy, Finland  
Für  $^3\text{H}$ : Printed Filtermat A for Use with 1450 MicroBeta™  
No: 1450–21, Wallac, Turku Oy, Finland
- Sample Bag (für Filtermatten), No: 1450-432, Wallac
- Kulturgefäße: Cell Culture Cluster: 96 wells (Costar 3596),  
48 wells (Costar 3548)
- Gewebekulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>-Fläche, (Greiner, Nürtingen)
- Gewebekulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>-Fläche, (Costar 3376)
- Gewebekulturflaschen, 162 cm<sup>2</sup>-Fläche, (Costar 3151)
- Gewebekulturflaschen, 25 cm<sup>2</sup>-Fläche, (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg)
- Bunsenbrenner Vulcan (Heraeus)
- Zellzählgerät: Schärfe System Casy
- Stabpipetten steril; 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml; (Falcon)

### **2.3 Geräte zur Messung der $^{125}\text{I}$ -und $[6\text{-}^3\text{H}]\text{Thymidin}$ -Aufnahme**

- Gamma-Strahlen-Messung ( $^{125}\text{I}$ -Aufnahme): WIZARD™ 3“ 1480, Automatic Gamma Counter, Wallac



- Beta-Strahlen-Messung ([6-<sup>3</sup>H]Thymidinaufnahme): 1450 MICROBETA, TRILUX, Wallac

#### **2.4 Geräte für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

- Zentrifuge Hettich Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen
- Biofuge primo R, Heraeus
- High speed Centrifuge, Avanti™ Centrifuge J-20XP, Rotor JS-5.3, Beckman
- Spectrophotometer, Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences
- Thermomixer Comfort 1,5 ml, Eppendorf
- Waage (Sartorius EA3DCE-LOCE)
- Waage (Sartorius CP225D-OCE)
- Küvetten (10 x 4 x 45) No./Ref 67.742 (Sarstedt)
- PVDF (polyvinylidene fluoride) Membran, Immobilon P, Pore size: 0,45 µm, Best.-Nr. IPVH 00010, Millipore)
- Bloteinheit (Tank, Kassetten, Schwämme, Filterpapier), P8DS, Owl Separation Systems, Inc, Portsmouth, NH USA
- Electrophoresis-Power-Supply, E835, Consort

#### **2.5 Geräte für die Apoptosemessung**

- Zentrifuge Hettich Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen
- FACS-Gerät: Modell "Calibur", Becton Dickinson, USA
- Facsröhrchen, Becton Dickinson, USA

#### **2.6 Geräte für die immunzytochemische Bestimmung von Pendrin und NIS**

- Zentrifugenröhrchen (50 ml), (Falcon Blue Max, Becton Dickinson ,USA)
- Gewebekulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>-Fläche, (Greiner, Nürtingen)
- Gewebekulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>-Fläche, (Costar 3376)
- Zellzählgerät: Schärfe System Casy

#### **2.7 Medien und Reagenzien**

- Medium RPMI 1640 + L-Glutamine, Lot.No. 3095913, (GIBCO)
- Trypsin-EDTA (10 x), Lot.No. 1245060, (GIBCO)
- FETAL BOVINE SERUM, Lot.No. 114K3395, (SIGMA)

- PBS, No. 0019, (CAMBREX)
- MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit, CatNo.: LT07-418, Cambrex Biosciences, Rockland ME USA
- Szintillationsflüssigkeit, Packard, Groningen
- Radioaktive Chemikalien: [6-<sup>3</sup>H]Thymidine (851 GBq/mmol), TRK61, Amersham Biosciences  
<sup>125</sup>J (3,8 GBq/ml), IMS30, Amersham Pharmacia Biosciences
- Casyton, isotone Salzlösung, CatNo.043-90037D
- DMSO (Dimethylsulfoxid), D8410, (SIGMA)
- Ethanol, 1.00983.1000, (Merck)
- Methanol, 1.06009.2511, (Merck)
- Retinol, R7632, (SIGMA)
- All-trans-Retinsäure, R2625, (SIGMA)
- 13-cis-Retinsäure, R3255, (SIGMA)
- Apicidin, A8851, (SIGMA)
- APHA Compound 8, A2478, (SIGMA)
- Mevinolin, M2147, (SIGMA)
- 5-Aza-2'-deoxycytidin, 11390, (Fluka)
- Akt Inhibitor, Lot.B63839, (Calbiochem)
- Akt Inhibitor V, Triciribine, Lot.B66869, (Calbiochem)
- Valproinsäure, P4543, (SIGMA)
- Troglitazon (Calbiochem)
- Arsen(III)-trioxid (arsenige Säure), Universitätsapotheke Tübingen.  
Rezept: 0,0198 g ATO + 0,03 g Natriumbicarbonat + 100 ml Aqua dest. Die Auflösung gelingt nur unter leichtem Erwärmen mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators. Der pH-Wert liegt bei ca. 8,4. Anschließend folgt die Sterilfiltration über 0,2 µm Minisart Filter (Sartorius) in vorsterilisierte Durchstechampullen. Die ATO-Lösung ist 1 mM.  
Für die Herstellung dieser Lösung danke ich Herrn Dr. Heide, Universitätsapotheke Tübingen

## 2.8 Reagenzien für die FACS-Analyse

- Propidiumiodid, Sigma
- Propidiumiodidlösung ( 10 mg Propidiumiodid in 1 ml H<sub>2</sub>O lösen + 200 ml H<sub>2</sub>O + 200 µl Triton X + 200 µl Na-Citrat)
- Staurosporine, 1055682, Roche

## 2.9 Reagenzien für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Acrylamid-Bis 40 %, 10681, SERVA
- SDS 10 %, 43601, Roth
- TEMED, T9281, SIGMA
- Ammoniumpersulfat 10 %, Sigma
- Tris, 4885, Roth
- Salzsäure 32 %, 1.00319.100, Merck
- Propanol, 1.09634.2511, Merck
- Glycerin, 1.04091, Merck
- 2-Mercaptoethanol, Sigma
- Bromphenolblau, 8122.0005, Merck
- Glycin, 3908.2, Roth
- Glycerin, 1.04091.1000, Merck
- Ponceaurot S, 33429, Serva
- Trismabase, T1503, (SIGMA)
- 5 % Magermilchpulver, T145.2, Roth
- Tris-buffered saline (TBS), (20 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 8,0)
- BioRad Bradford Reagenz (BioRad Protein Assay 450 ml Nr. 5000006)
- Blotpuffer 1,2 l (3,636 g 25 mM Trismabase + 17,28 g 192 mM Glycin + 240 ml 20 % Methanol + 960 ml Wasser)
- Essigsäure 100 %, 8.18755.1000, Merck
- Sammelgelpuffer 4-fach, (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8) (100 ml)
- Trenngelpuffer 4-fach, (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8), (100 ml)
- Probenpuffer 2-fach (10 ml) (2,5 ml Sammelgelpuffer 4-fach + 4 ml SDS 10 % + 2,3 ml Glycerin + 0,5 ml 2-Mercaptoethanol + 1 mg Bromphenolblau + 0,7 ml Wasser)

- Laufpuffer 10-fach (1000 ml) (30 g Tris + 144 g Glycin + 10 g SDS 10 % + 1000 ml Wasser)
- Trenngel (3,13 ml 40 % Acrylamid-Bis + 2,5 ml Trenngelpuffer 4-fach + 4,27 ml Aqua dest. + 100 µl 10 % SDS + 15 µl TEMED + 30 µl 10 % APS)
- Sammelgel 5 % (1,25 ml 40 % Acrylamid-Bis + 2,5 ml Sammelgelpuffer 4-fach + 6,15 ml Aqua dest. + 100 µl SDS 10 % + 15 µl TEMED + 30 µl 10 % APS)
- Immobilon P-Transfer Membran, Millipore IPVH 000010

## 2.10 Antikörper, Marker und Reagenzien für den Western Blot

- High Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, (Amersham Biosciences 17061501)
- Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, (Amersham Biosciences 17044601)
- NIS 1-Antikörper, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. B. Czarnocka, Dep. Biochemie und Molekularbiologie, Universität Warschau. Der NIS 1-Antikörper ist gerichtet gegen die Aminosäure-Sequenz 262-280. Eingesetzte Verdünnung: 1:1000
- Pendrin-Antikörper, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. B. Czarnocka, Dep. Biochemie und Molekularbiologie, Universität Warschau. Eingesetzte Verdünnung: 1:1000
- 2. Antikörper: Goat; anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz biotechnology sc-2004. Eingesetzte Verdünnung: 1:5000
- Luminol, Cat.: 12,307-2, Aldrich
- p-Jodphenol, Cat.: 1,020-1, Aldrich
- Wasserstoffperoxid 30 %, AppliChem A 2473,0500
- ECL-Lösung bestehend aus Lösung A und Lösung B. Lösung A (0,5 M Luminol + 0,5 M p-Jodphenol + 0,1 M Tris/HCl pH 9,35), Lösung B (30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Verhältnis 1:4000 in 0,1 M Tris/HCl pH 9,35)
- Tween, No.: 37470, Serva
- TBS/Tween
- Kamera: Fujifilm/Raytest, Intelligent Dark Box, LAS 3000  
Aufnahmeprogramm: Image Reader LAS 3000  
Auswertesoftware: AIDA Image Analyzer; V.3.44

## 2.11 Reagenzien für die immunzytochemische Bestimmung

- Objektträger: Super Frost Plus Objektträger, Artikel:03-0060, (R. Langenbrink)
- D(+)-Saccharose, A 4734, 1000, (Applichem Biochemica Chemica Synthesis Services)
- Gummi Arabicum, 4282, (Merck)
- Holt'sches Gemisch (30 g D(+)-Saccharose +1 g Gummi Arabicum + 1000 ml Wasser)
- NaCl, 1.06404, (Merck)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.06580, (Merck)
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4873, (Merck)
- Paraformaldehyd, 4005, (Merck)
- PBS, No. 0019, (CAMBREX)
- Cytomation Pen, S2002, (DAKO)
- Antikörper (Pendrin, NIS); siehe 2.11
- Goat anti rabbit IgG biotinyliert-SP-conjugiert, Kat.Nr.:111-065—003, (Dianova)
- Streptavidin-AP-Konjugat, Kat.Nr.: 0396, (DAKO)
- Substratlösung für AP: 4 mg Naphtol-As-MX-Phosphat (N5000, SIGMA) + 100 µl DMFA (1.03053.00, Merck) + 4,9 ml 0,1 M Trispuffer + 1,5 mg 1 M Levamisole (Kat.Nr.:L9756-5, SIGMA) + 5 mg Fast red TR salt (F2768, SIGMA)
- Kaisers Glyceringelatine, 1.09242.0100, (Merck)
- Deckgläschen, Kat.Nr.: 190002440, 24 x 40 mm IDL

### **3. Methoden**

#### **3.1 Zellzählung**

Das CASY<sup>®</sup>1 Cell Counter and Analyser System (Fa. Schärfe System, Reutlingen, D) verbindet die Partikelmessstechnik nach dem Widerstandsmessprinzip mit der Pulsflächenanalyse. Zur Messung werden die Zellen, welche in einem schwachen Elektrolyten (CASY<sup>®</sup>ton) verdünnt sind, durch eine spannungsbelegte Messkapillare gesaugt. Durch das Durchtreten intakter Zellen durch eine Präzisionsmesspore wird der Widerstand der Kapillare erhöht. Durch die Widerstandserhöhung kann man Rückschlüsse auf das Zellvolumen ziehen. Das CASY<sup>®</sup>1 Cell Counter and Analyser System führt eine Pulsflächenanalyse durch (Integral des Messsignals) und ermittelt u. a. anhand der volumenlinearen Originalverteilung eine durchmesserlineare Größenverteilung.

#### **3.2 Herstellung der Kulturen und Kulturbedingungen**

Verwendet wurde die Zelllinie CGTH-W-1 (follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen). Diese Zelllinie wurde im Zellkulturmedium RPMI 1640 + L-Glutamine (GIBCO) kultiviert. Das Medium wurde ergänzt mit 10 % Fetalem Kälberserum (SIGMA).

Die Zelllinie wurde in Ampullen in flüssigem Stickstoff gelagert. Nach der Entnahme der Ampulle aus dem flüssigen Stickstoff wurde sie in ein auf 40 – 50 °C erhitztes Wasserbad gelegt. Somit wurden die Zellen aufgetaut. Anschließend wurde die Ampulle 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 nun bei 7 °C, 120 x g, 7 min zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert.

Es wurden  $8 \times 10^6$  Zellen in 50 ml Medium in Zellkulturflaschen mit 162 cm<sup>2</sup> Bodenfläche (Costar) ausgesät. Die Kulturen wurden unter Lichtabschluss in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C mit 95 % Luft und 5 % CO<sub>2</sub> begast. Alle 4 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt.

Die ausgesäten Zellen adhären am Zellkulturflaschenboden und vermehren sich bei 37 °C. Sobald der Gefäßboden von einer Monolayer-Schicht vollständig bedeckt war, wurden die anhaftenden Zellen abgelöst. Dies geschah durch Dekantieren des Mediums und anschließendem Spülen mit 10 ml vorgewärmter PBS-Lösung. Die PBS-Lösung wurde ebenfalls dekantiert. Der noch festhaftende Zellrasen mit vitalen Zellen wurde mit 2 ml 10 prozentiger Trypsinlösung überschichtet und 5 min bei 37 °C inkubiert. Dabei lösten sich die Zellen vom Flaschenboden. Anschließend wurde zu FKS-haltiges Medium gegeben, welches zur Inaktivierung des Trypsins führte. Die Zellen, die sich nun in Suspension befanden, wurden mit Hilfe einer Pipette in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C, 120 x g, 7 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde nun dekantiert und die Zellen in Kulturmedium resuspendiert. Diese Vorgänge erfolgten unter sterilen Bedingungen.

### 3.3 Testsubstanzen

Folgende Substanzen wurden getestet:

- all-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure und all-trans-Retinol: Retinol und die Retinsäurederivate wurden in abgedunkeltem Raum gehandhabt und in Methanol gelöst. Sie sind Liganden der Retinsäure-Rezeptoren RAR und RXR und wirken als Transkriptionsfaktoren.
- 5-Aza-2'-deoxycytidin: Bewirkt eine DNA-Demethylierung oder Hemidemethylierung. Lösungsmittel: DMSO.
- Troglitazon: Gehört zur Substanzgruppe der Thiazolidindione. Lösungsmittel: DMSO
- APHA Compound 8: Histon-Deacetylase-Hemmer. Lösungsmittel: DMSO.
- Apicidin: Histon-Deacetylase-Hemmer. Lösungsmittel: DMSO.
- Mevinolin: HMG-CoA-Reduktase-Hemmer. Lösungsmittel: Ethanol.
- Arsentrioxid: Inhibiert Zellwachstum; induziert Apoptose in Krebszellen; transformiert Rezeptoren auf der Zielzelle, um vom Immunsystem erkannt werden zu können. Lösungsmittel: Destilliertes Wasser.

- Valproinsäure: Primär Antiepileptikum. Lösungsmittel: Destilliertes Wasser.
- Akt Inhibitor I: Hemmt die Proteinkinase B. Lösungsmittel: DMSO.
- Akt Inhibitor V (Triciribine): Hemmt die Proteinkinase B. Lösungsmittel: DMSO.
- Staurosporin: Aus *Streptomyces staurosporeus* isolierter Proteinkinasehemmer. Lösungsmittel: DMSO und Ethanol

### 3.4 Mycoplasmennachweis

Mycoplasmen können Zellkulturen kontaminieren. Sie können eine erniedrigte Zellproliferationsrate und veränderte Zellantworten hervorrufen.

Mycoplasmen sind die kleinsten und einfachsten Prokaryonten; aufgrund ihrer begrenzten biosynthetischen Fähigkeiten sind sie wirtsabhängig.

Mycoplasmen haben einen Durchmesser von 0,8 µm. Sie werden daher vom Filterpapier des Zellharvesters (Porengröße: 1,5 µm) nicht zurückgehalten. Bei der Messung des Thymidin-Uptakes werden sie nicht miterfasst. Die o. g. Effekte können aber trotzdem die Ergebnisse der Versuche verfälschen.

Um eine mögliche Mycoplasmen-Kontamination auszuschließen, wurde der Mycoplasma Detection Assay "MycoAlert<sup>®</sup> Mycoplasma Detection Kit" der Firma CAMBREX eingesetzt. Bei diesem Test wird die Aktivität bestimmter mycoplasmatischer Enzyme ausgenutzt. Im Zuge dieses Assays lysieren die lebenden Mycoplasmen, ihre Enzyme werden frei und reagieren mit dem MycoAlert<sup>®</sup> Substrat, welches die Umwandlung von ADP in ATP bewirkt.

Die ATP-Konzentration wird vor und nach Zugabe des MycoAlert<sup>®</sup> Substrats gemessen. Misst man bei der zweiten Messung eine höhere Konzentration an ATP als bei der ersten Messung, so korreliert diese ATP-Konzentration mit der Mycoplasmen-Konzentration in der Probe.

### 3.5 Cytochemische Darstellung von NIS und Pendrin

Die Zellkulturen wurden hierfür nach dem Schema aus Kapitel 3.2 hergestellt. Die Thyreozyten wurden jedoch mit jeweils 20 Mio Zellen pro 75 cm<sup>2</sup>-Flasche ausgesät.



Stimuliert wurden die Zellen mit den üblichen Differenzierungssubstanzen (siehe 3.3). Die Inkubationszeiten betragen 24 bzw. 48 Stunden. Nach der Inkubation wurden die Überstände mit einer Kolbenhubpipette aus den Flaschen weitgehend abgesaugt und in Falconröhrchen gegeben. Die Zellen wurden dann mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Flaschen abgelöst. Danach wurde zur Inaktivierung des Trypsins mit FKS versetztes Medium in die Flaschen gegeben. Der Flascheninhalt kam ebenfalls ins Falconröhrchen. Nun wurde die Flasche noch mit PBS gespült, welcher auch ins Falconröhrchen gegeben wurde. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt (4 °C, 2000 x g, 7 min). Der Überstand wurde daraufhin dekantiert und die Zellen in PBS resuspendiert, so dass pro Milliliter PBS  $9 \times 10^6$  Zellen enthalten waren. Es wurden 50 µl (entspricht  $0,45 \times 10^6$  Zellen) dieser Zellsuspension auf einen Objektträger pipettiert und mit einem geschliffenen Deckglas auf dem Objektträger verteilt. Der Objektträger wurde für eine Stunde bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet.

Danach wurde zur Fixierung ca. 1 ml 4-prozentige Paraformaldehyd/PBS-Lösung auf den Objektträger pipettiert. Diese Fixierlösung wurde nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur abgekippt, und danach wurde der Objektträger in Aqua dest. 3 x gespült. Überschüssiges Aqua dest. auf dem Objektträger wurde durch schüttelnde Bewegungen entfernt.

Anschließend wurde frisch angesetztes Holt'sches Gemisch auf den Objektträger pipettiert und der Objektträger 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Holt'sche Gemisch wurde nun abgekippt, der Objektträger mit Aqua dest. gespült und 2 Stunden bei Raumtemperatur zum Trocknen aufgestellt.

Der Objektträger konnte nun bei -20 °C gelagert werden. Sollte im Anschluss an die Fixation sofort der immunologische Nachweis erfolgen, so wurden die Objektträger 10 Minuten lang in eisgekühltes Aceton eingebracht, um das Wasser zu entziehen. Danach erfolgte wieder einige Minuten lang eine Lufttrocknung. Daraufhin wurden die Objektträger in PBS gespült und anschließend der Präinkubationspuffer (160 µl/Objektträger, 30 min) aufgetragen.

Der Nachweis von NIS-3 und PDS-1 auf der Zelloberfläche erfolgte durch die Immunocytochemische Technik nach folgendem Prinzip:

- Bindung des 1. Antikörpers (anti-NIS-3, anti-PDS-1) an das Antigen.

- Bindung eines biotinylierten Zweitantikörpers (Detektionsantikörper) an den Erstantikörper.
- Zugabe von enzymmarkiertem Streptavidin, das mit Biotin einen festen Komplex bildet.
- Zugabe von Chromogen-Substratlösung. Das fixierte Enzym wird sichtbar.

Zuerst wurde der zuvor verdünnte Antikörper NIS-3 bzw. PDS-1 auf die Objektträger aufgebracht (eingesetzte Verdünnungen: anti-NIS-3: 1:200, anti-PDS-1: 1:150; 160 µl/Objektträger), wobei zuvor der Präinkubationspuffer abgegossen wurde. Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Spülen mit PBS wurden die Objektträger eine Stunde lang mit dem biotinylierten Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Serum 1:100 verdünnt) inkubiert. Es erfolgte ein erneutes Spülen mit PBS und anschließend das Auftragen von Streptavidin-AP-Konjugat (Verdünnung: 1:150 in PBS). Die Inkubationsdauer betrug 40 Minuten bei Raumtemperatur. Als streptavidinfixiertes Enzym wurde alkalische Phosphatase (AP) eingesetzt. Durch das Aufbringen der Chromogen-Substrat-Lösung über 60 Minuten wurde der Komplex rot angefärbt. Die Präparate wurden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Anschließend wurde der Objektträger waagrecht auf den Tisch gelegt. Nach 24 Stunden konnte man die Zellen mikroskopieren.

Für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche danke ich Frau Maier, Anatomisches Institut der Universität Tübingen.

### **3.6 Proteinisolierung und -bestimmung**

Die Zellen wurden wie unter 3.2 beschrieben abtrypsiniert, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt, abzentrifugiert (bei 4 °C, 120 x g, 7 min) und der Überstand danach dekantiert. Dann wurden die Zellen in PBS resuspendiert, nochmals abzentrifugiert und der Überstand wiederum dekantiert. Das Zellpellet wurde in PBS suspendiert und anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert (bei 4 °C, 16000 x g, 4 min) und der Überstand dekantiert. Das Reaktionsgefäß wurde nun über Kopf 2 - 3 Minuten zum Auslaufen auf ein Saugtuch gestellt und anschließend bei -20 °C oder -80 °C tiefgefroren.

Nach dem Auftauen folgte ein Zentrifugationschritt (bei 4 °C, 16000 x g, 4 min). Der Überstand (Lysat) vorsichtig abpipettiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat konnte entweder bei -20 °C gelagert werden, oder es wurde darin sofort eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Für die Proteinbestimmung wurde eine Standardreihe mit BSA (bovines Serumalbumin) mit den Konzentrationen 0, 1, 2, 4, 8 und 12 µg/µl angefertigt.

In die Photometerküvetten wurden jeweils 10 µl vorbereiteter Standard oder Probe pipettiert. Anschließend kamen noch jeweils 790 µl Aqua dest. und 200 µl BioRad Bradford Reagenz dazu. Nachdem gemischt wurde, konnten die Proben innerhalb von 15 - 60 Minuten am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden.

### **3.7 Semiquantitative Bestimmung von Proteinen mittels Western Blot**

Zur Identifikation und Quantifizierung spezifischer Proteine in Proteingemischen wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eingesetzt. Im SDS-Polyacrylamidgel werden Ladungsunterschiede der Proteine aufgehoben und die Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe getrennt. Durch Vorschalten des weitmaschigen 5-prozentigen Sammelgels vor dem engmaschigeren Trenngel wurde ein Molekularsiebeffekt erreicht. Für NIS und Pendrin war das Gel 10-prozentig. Die größeren Proteine werden mehr zurückgehalten als die kleinen. Durch den angelegten elektrischen Strom wandern die Proteine im elektrischen Feld, wobei die größeren Proteine nach dem Prinzip eines Siebs ihr Ziel schon früher erreicht haben als die kleineren, die einen weiteren Weg zurückzulegen haben. Um die Proteine nachweisbar zu machen, wurden sie auf eine PVDF-Membran (polyvinylidene fluoride) transferiert und immobilisiert. Diesen Vorgang nennt man Blotting. Auf der Membran erfolgte nun mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers der Nachweis des unter den Gesamtzellproteinen gesuchten Proteins. Der gebundene erste Antikörper wurde nun über eine Farbreaktion mittels eines zweiten, an ein Enzym gekoppelten Antikörpers besser sichtbar gemacht.

Pro Geltasche eines Sammelgels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden 30 µg Protein aufgetragen. Eine Geltasche hat ein Fassungsvermögen von maximal 20 µl. Damit können nur 10 µl Probe und 10 µl Probenpuffer aufgetragen

werden. Das Gemisch aus der gesamten isolierten Proteinlösung und dem Probenpuffer wurde zuvor 5 Minuten bei 95 °C in einem Eppendorfgemisch gekocht. Aus diesem Gemisch wurden dann 20 µl entnommen und in die Geltasche pipettiert. Als Proteinstandard lief ein High Molecular Weight Marker (HMW, Electrophoresis Calibration Kit) mit. HMW wird für Gele benutzt, die einen Polyacrylamidgehalt von bis zu 12 % haben. Die Elektrophorese lief im Sammelgel bei 120 V und im Trenngel bei 80 V. Die gesamte Dauer der Elektrophorese betrug ca. 3 Stunden. Der verwendete Proteinstandard enthält die Proteine Myosin (220000 Dalton),  $\alpha_2$ -Macroglobulin (170000 Dalton),  $\beta$ -Galactosidase (116000 Dalton), Transferrin (76000 Dalton) und Glutamat-Dehydrogenase (53000 Dalton). Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnten die Gele aus der Kammer genommen und vorsichtig von den Glasplatten gelöst werden. Anschließend wurde das Sammelgel mit einem Skalpell vom Trenngel getrennt. Zur späteren Orientierung wurde an der Blot-Membran eine Ecke abgeschnitten, dann wurde sie für 15 sec. in 100 % Methanol und danach für 2 Minuten in Wasser gelegt. Als nächster Schritt folgte das Bestücken der Blotkassette: Auf den roten Kassettendeckel wurde ein in Blotpuffer getränkter Schwamm gelegt, dann kam ein getränktes Filterpapier, dann die Membran, darauf das Gel, dann wiederum ein in Blotpuffer getränktes Filterpapier und ein Schwamm. Damit waren die Vorbereitungen für den Blotvorgang getroffen. Die Kassette konnte in den mit Blotpuffer gefüllten Blottank eingesetzt werden und an das Power-Supply angeschlossen werden. Geblottet wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 80 mA. Die Stromstärke erhält man durch folgende Rechnung: Bei einer Gelgröße von 100 cm<sup>2</sup> multipliziert man 100 cm<sup>2</sup> mit 0,8 und erhält die Stromstärke pro Stunde (mA/h) für ein Gel. Bei vier Gelen wird das Ergebnis mit dem Faktor 4 multipliziert.

Vor der Immunreaktion und der Färbung der Blot-Membran mit Ponceau S (0,5 %) musste man die Membran bei Raumtemperatur für ca. 2 Stunden trocknen lassen, um der Bildung eines starken Hintergrundes vorzubeugen. Danach wurde die Membran durch 100 % Methanol gezogen, in Wasser gespült und anschließend mit Ponceau S (0,5 %) für ca. 1 Minute angefärbt. Dann wurde mit Wasser bis zum gewünschten Kontrast entfärbt.

Aufgrund der Hydrophobie der Blot-Membran wurde 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

Kohlenstoffatome andererseits hydrophob ist. Anschließend wurde für ca. 3 Stunden in 5 % Lactalbumin eine Präinkubation durchgeführt. Danach wurde die Membran für 3 x 5 Minuten in TBS/Tween gewaschen; Tween verhindert unspezifische Bindungen auf der Blot-Membran.

Die Proteinbanden wurden anschließend durch die Zugabe von folgenden Antikörpern nachgewiesen: NIS-Antikörper und PDS-Antikörper.

Prinzip des Proteinnachweises:

- Bindung des Antikörpers an das Antigen
- Bindung eines HRP-konjugierten Antikörpers (Detektionsantikörper) an den Erstantikörpers
- Inkubation in ECL-Lösung (siehe 2.11)

(Volumen der Lösungen: 0,125 ml/cm<sup>2</sup> Gefäßboden)

Die Membran wurde über Nacht bei 8 °C auf einem Schüttler mit dem Erstantikörper (eingesetzte Verdünnungen: 1:1000 in TBS) inkubiert. Danach folgte ein Waschgang für 3 x 15 Minuten in TBS/Tween. Dann wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem HRP-konjugierten Zweitantikörper (eingesetzte Verdünnung: 1:2000 in TBS) inkubiert und anschließend folgte wieder ein Waschgang.

Dann erfolgte die Inkubation in ECL-Lösung im Dunkeln. Nach einer ca. 3 - 5 minütigen Inkubationsdauer wurde das an spezifische Proteine gebundene Enzym sichtbar und damit die gesuchten Proteine identifiziert.

Der gesuchte Natrium-Iodid-Symporter hat ein Molekulargewicht von 80000 - 90000 Dalton; man findet seine Proteinbande ungefähr auf der Höhe von Transferrin. Das gesuchte Pendrin (Molekulargewicht von ca. 85000 Dalton) liegt ebenfalls auf der Höhe von Transferrin.

### 3.8 FACS-Analyse

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

Die follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen der Zelllinie CGTH-W-1 wurden für die FACS-Analyse wie oben beschrieben gezüchtet und mit folgenden Stimulanzen in Schalen mit 96 Löchern (well) 24 oder 48 Stunden inkubiert:

- Ohne Stimulation (Kontrolle)
- Methanol (Lösungsmittelkontrolle)
- Ethanol (Lösungsmittelkontrolle)
- DMSO (Lösungsmittelkontrolle)
- Troglitazon 5 µM
- APHA 1 µM
- Apicidin 200 nM
- 5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM
- Mevinolin 100 µM
- Arsentrioxid 2 µM
- all-trans-Retinsäure 1 µM
- 13-cis-Retinsäure 1 µM
- Staurosporin 2,5 µM
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1 M

Nach der Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden wurden die Zellen in ihren 96-well Schalen mit einer Multipipette ca. 10 mal auf- und abgezogen und in eine V-MTP überführt. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, RT, 300 x g). Der Überstand wurde danach dekantiert und die Zellen mit einem hypotonen Lysepuffer versetzt. Der Lysepuffer bestand aus 50 µg/ml Propidiumiodid (PI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher in der DNA des Zellkerns interkaliert) gelöst in Aqua dest. zusammen mit 0,1-prozentigem Natrium-Zitrat und 0,1-prozentigem TritonX-100. Im Anschluss an die Zellyse wurden die Zellkerne mit Hilfe der Durchfluß-Zytometrie (FACS-Analyse) im FACS-Gerät analysiert. Die Trägerflüssigkeit im FACS-Gerät, in welche die Probe in Form einer Suspension eingebracht wird, befindet sich in ständigem Fluss. Die Zellen oder die isolierten Zellkerne bewegen

sich in einer definierten Position am Laserlicht vorbei; sind die Zellkerne PI-positiv, so werden sie durch das Argon-Laserlicht (488 nm) angeregt. Das vom PI emittierte Fluoreszenzlicht kann durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Auf apoptotische Zellen lässt sich über Zellkerne mit DNA-Fragmentierung (hypodiploider DNA) rückschließen; sie lassen sich gut von Zellkernen mit normalem (diploidem) DNA-Gehalt unterscheiden.

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

### **3.9 Statistische Auswertung**

Die Auswertung der Messergebnisse der  $^{125}\text{J}$ - und der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme in Thyreozyten erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Signifikante Ergebnisse beziehen sich auf ein Gesamtsignifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$ . Dabei gelten Ergebnisse als signifikant, bei denen  $p < 5\%$  ist.

Von einzelnen Versuchsreihen wurden teilweise mehrere Ansätze durchgeführt. Bei der statistischen Auswertung wurden diese Ansätze einzeln, aber auch zusammen betrachtet. Wenn im Text von signifikanten Daten die Rede ist, so sind immer alle Ansätze einer Versuchsreihe berücksichtigt.

Für die Unterstützung in statistischen Fragen danke ich Frau Dr. Herberts, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 <sup>125</sup>I-Iodid- und <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in transformierte cancerogene Thyreozyten**

#### **4.1.1 <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe zum Zeitpunkt der Zellaussaat)**

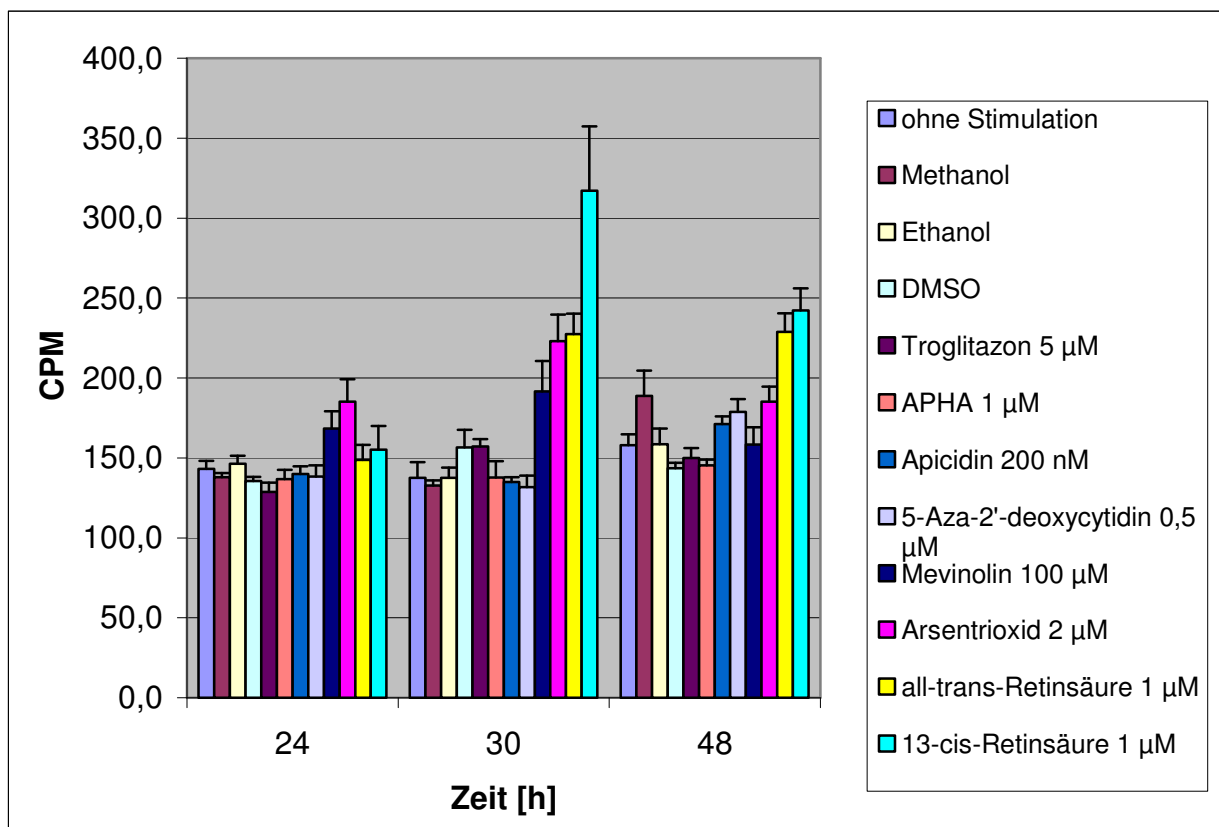
Kultivierte menschliche Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen wie Troglitazon, APHA Compound 8, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, all-trans-Retinsäure, Mevinolin, Arsentrioxid und deren Lösungsmittel stimuliert. Die Zugabe der Stimulanzen erfolgte beim Aussäen der Zellen. Die Schilddrüsenzellen, die mit keiner der Differenzierungssubstanzen behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als weitere Kontrollgruppen dienten die Schilddrüsenzellen, die mit den Lösungsmitteln Ethanol, Methanol und DMSO versetzt wurden. Die Lösungsmittel wurden in denselben Konzentrationen eingesetzt, wie sie für das Auflösen der Differenzierungssubstanzen verwendet wurden.

Die <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 24, 30 und 48 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten, welche unter dem Einfluss der Differenzierungssubstanzen standen, wurden mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen. Diese Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzen und der Zeit sind in Abbildung 1 dargestellt. Wenn bei der statistischen Auswertung  $p < 0,05$  ist, so ist das Ergebnis als signifikant anzusehen.

In Abb. 1 ist nach 24-stündiger Inkubationsdauer unter Mevinolin (100 µM) und Arsentrioxid (2 µM) ein tendenziell leichter Anstieg der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen. Die Radioiodinkorporation unter den restlichen Differenzierungssubstanzen entspricht nach 24-stündiger Inkubationsdauer etwa der der unbehandelten Zellen. Nach 30-stündiger Inkubationsdauer zeigt sich bei Stimulation mit 13-cis-Retinsäure (1 µM) ein signifikanter Effekt im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe. Unter Arsentrioxid (2 µM) und all-trans-Retinsäure (1 µM) ist ein leichter Anstieg der <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe zu sehen. Die Iodidaufnahmeraten bei Stimulation mit Troglitazon (5 µM), APHA (1 µM), Apicidin (200 nM) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5 µM) entsprechen etwa der Iodidaufnahmerate der unstimulierten Thyreozyten.



Bei der Stimulation mit all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) und Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ) zeigt sich nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Effekt. Unter 13-cis-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) und Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) kann ein leichter Anstieg der Iodidaufnahme festgestellt werden. Sowohl nach 24-stündiger und 30-stündiger, als auch nach 48-stündiger Inkubationsdauer ist bei Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ), APHA (1  $\mu\text{M}$ ), Apicidin (200 nM) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ) eine nur geringfügige Erhöhung, keine oder sogar eine geringere Iodidaufnahmerate zu erkennen.



**Abb. 1:** Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Mevinolin, Arsentrioxid, all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde nach 24, 30 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 1.7 im Anhang).

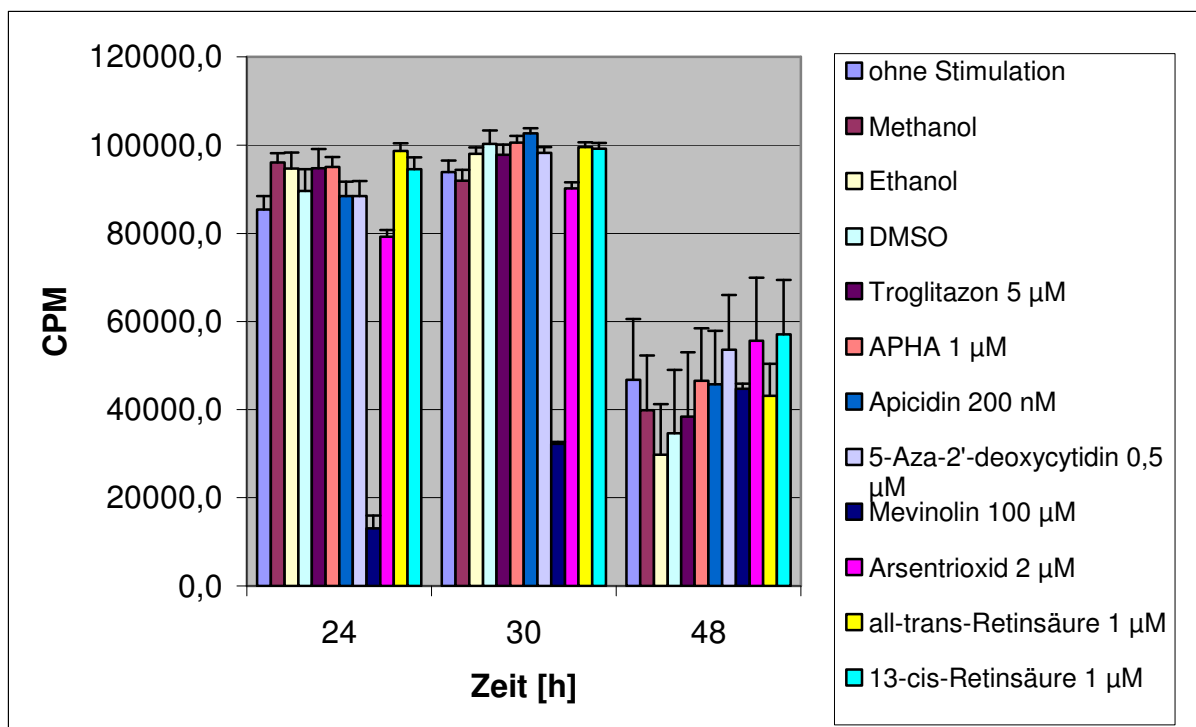
#### 4.1.2 $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe zum Zeitpunkt der Zellaussaat)

Hierbei handelt es sich um denselben Ansatz wie unter 4.1.1, nur mit dem Unterschied, dass in diesem Fall die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme bestimmt wurde. In Abb.

2 ist nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden unter Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ) ein signifikant negativer Effekt in der Thymidinaufnahme zu erkennen. Unter der Inkubation der Thyreozyten mit Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ), APHA (1  $\mu\text{M}$ ), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ), Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ), all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) und 13-cis-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) unterscheidet sich die  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaurrate nicht signifikant von den unbehandelten Thyreozytenkulturen.

Auch nach 30 Stunden sieht man unter Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ) einen signifikanten Effekt zur Kontrolle. Bei den restlichen Differenzierungssubstanzen ist nach 30 Stunden Inkubationsdauer wiederum kein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe zu erkennen.

Nach 48 Stunden ist die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in allen Ansätzen gegenüber der Kontrollgruppe nur minimal (statistisch nicht signifikant) verändert.



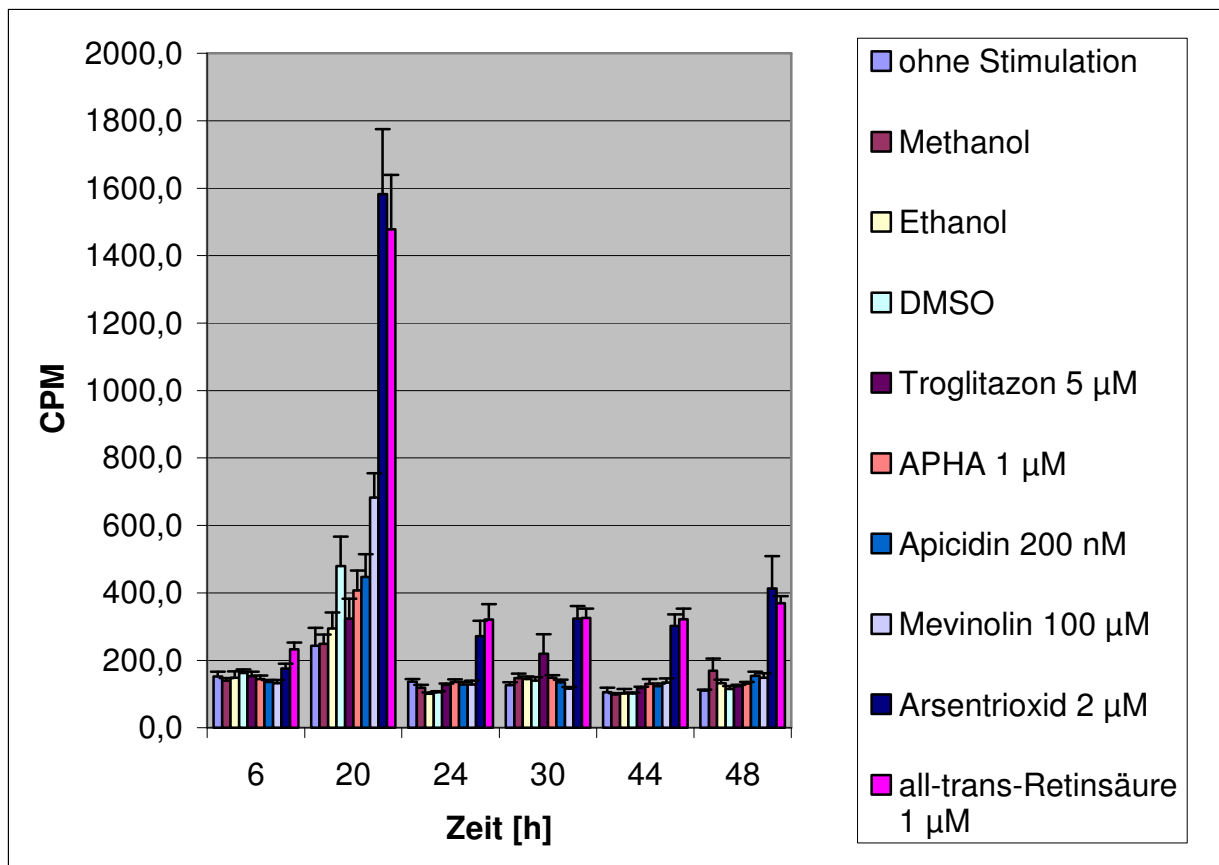
**Abb. 2:** Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Mevinolin, Arsentrioxid, all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme wurde nach 24, 30 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=8$ ). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq  $^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 5.8 im Anhang).

#### **4.1.3 <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe 23 Stunden nach der Zellaussaat)**

Kultivierte transformierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1) wurden mit den Differenzierungssubstanzen Troglitazon, APHA Compound 8, Apicidin, Mevinolin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure und deren Lösungsmitteln stimuliert. Die jeweiligen Lösungsmittel wurden in denselben Konzentrationen eingesetzt, wie sie für das Auflösen der Differenzierungssubstanzen verwendet wurden.

Die <sup>125</sup>I-Iodidinkorporation wurde 6, 20, 24, 30, 44 und 48 Stunden nach Radioiodzugabe (Zugabe 23 Stunden nach Zellaussaat) gemessen. Die Ergebnisse der <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurden mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen.

Wie Abb. 3 zeigt kann nach 6 Stunden Inkubationsdauer ein signifikanter Effekt im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe bei Stimulation mit all-trans-Retinsäure (1 µM) festgestellt werden. Die Radioiodinkorporation unter Troglitazon, APHA, Apicidin, Mevinolin und Arsentrioxid entspricht nach 6 Stunden etwa der der unbehandelten Thyreozytenkulturen. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden zeigen sich unter Mevinolin (100 µM), Arsentrioxid (2 µM) und all-trans-Retinsäure (1 µM) signifikante Effekte. Die Radioiodinkorporation ist nach der Stimulation mit all-trans-Retinsäure mehr als sechs Mal so groß wie bei der unstimulierten Thyreozytenkultur; bei Arsentrioxid liegt der Faktor sogar bei über sieben. Troglitazon und Apicidin zeigen im Vergleich zur Kontrolle keine Steigerung der Iodidaufnahme. APHA zeigt im Vergleich zur unstimulierten Thyreozytenkultur eine signifikante Steigerung der Radioiodinkorporation, im Vergleich zu seinem Lösungsmittel DMSO jedoch nicht. Man muss also davon ausgehen, dass der Effekt nicht durch APHA hervorgerufen wird. Auch nach 24, 30, 44 und 48 Stunden Inkubationszeit zeigen sich unter Arsentrioxid (2 µM) und all-trans-Retinsäure (1 µM) noch deutlich signifikant höhere Iodideinbauraten als in der Kontrollgruppe. Die Werte der Radioiodinkorporation liegen unter allen übrigen Stimulanzen nach 24, 30, 44 und 48 Stunden im Bereich der Kontrolle.



**Abb. 3:** Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, Mevinolin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzien- und die Jodzugabe erfolgte 23 Stunden nach der Zellaussaat. Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde 6, 20, 24, 30, 44 und 48 Stunden nach Stimulanzien- bzw. Jodzugabe gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=6$ ). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 2.1 im Anhang).

#### 4.1.4 $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen (Zugabe 23 Stunden nach der Zellaussaat)

Hier wurde wie im vorherigen Ansatz verfahren. Anstatt der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme bestimmt. Die Versuchsbedingungen waren dieselben, wie unter 4.1.3.

Aus Abb. 4 wird ersichtlich, dass die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme nach 6, 20, 24, 30 aber auch noch nach 44 Stunden im Vergleich zur Kontrolle nur minimalen Schwankungen unterliegt. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden kommt es allerdings unter Stimulation mit Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) und all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) zu einer gesteigerten  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme ist unter Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) ca. 1,5mal so hoch wie bei der Kontrollgruppe. Bei all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) ist die Aufnahme ca. 1,7mal höher. Bei Troglitazon, APHA, Apicidin und Mevinolin kann kein signifikanter Effekt festgestellt werden.

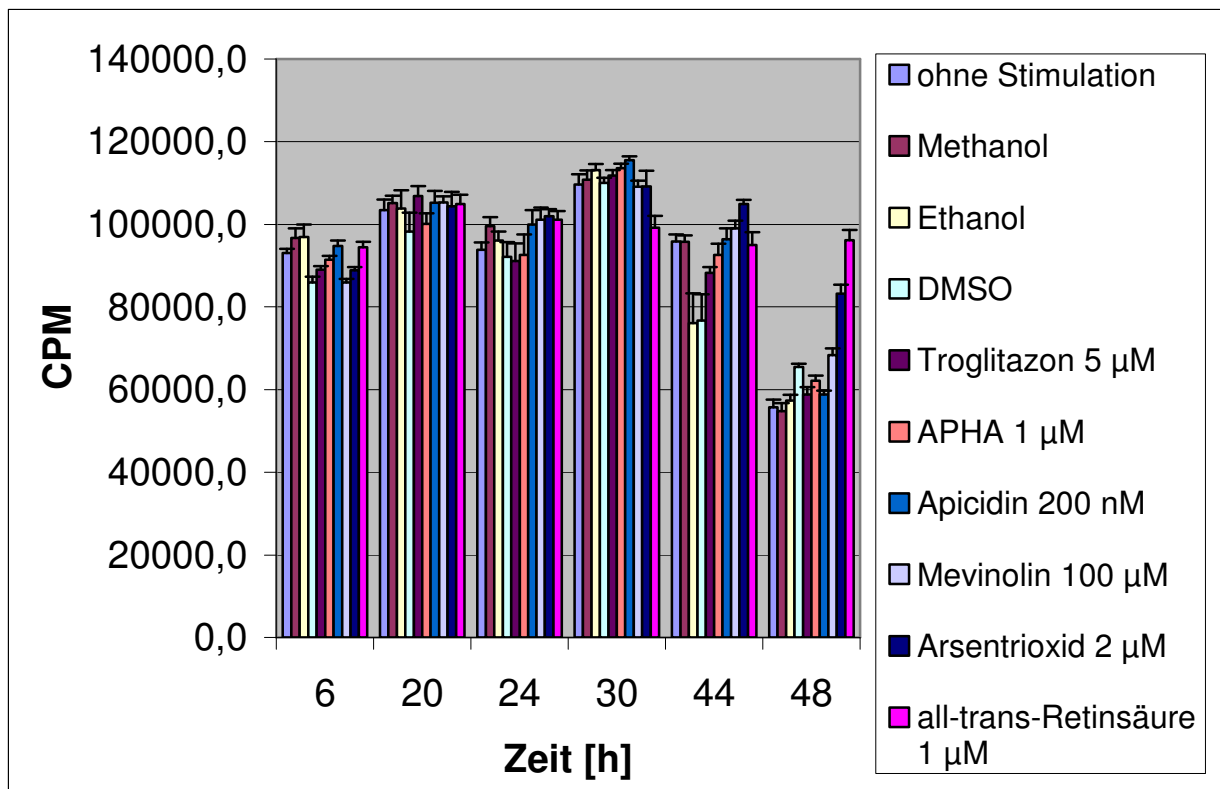


Abb. 4: Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, Mevinolin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzien- und Jodzugabe erfolgte 23 Stunden nach der Zellaussaat. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme wurde 6, 20, 24, 30, 44 und 48 Stunden nach Stimulanzien- bzw. Jodzugabe gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=8$ ). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq  $^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 6.1 im Anhang).

#### 4.1.5 $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Thyreozyten nach 7-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen ( $^{125}\text{I}$ -Iodidzugabe zu den Zellen am 7. Tag)

Kultivierte menschliche Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit den Differenzierungssubstanzen Troglitazon, APHA Compound 8, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Mevinolin, Arsentrioxid, all-trans-Retinsäure oder mit den jeweiligen Lösungsmitteln stimuliert. Die Zugabe der Stimulanzien zur Zellkultur erfolgte 7 Tage vor der  $^{125}\text{I}$ -Iodidzugabe zu den Zellkulturen. Die Zellen, die mit Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, konnten nach der 7-tägigen Inkubationsdauer nicht ausgewertet werden, da diese Differenzierungssubstanz zur Apoptose nahezu aller Thyreozyten führte. Die Schilddrüsenzellen, die mit keiner der Differenzierungssubstanzen behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als weitere Kontrollgruppen dienten die Schilddrüsenzellen, die mit den Lösungsmitteln Methanol und DMSO versetzt wurden. Die Lösungsmittel wurden in denselben Konzentrationen eingesetzt, wie sie zusammen mit den Differenzierungssubstanzen verwendet wurden.

Nach der  $^{125}\text{I}$ -Iodidzugabe zu den vorinkubierten Thyreozyten wurde 6, 24 und 48 Stunden abgewartet und danach die jeweilige Radioiodinkorporation bestimmt. Die Ergebnisse der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in die Thyreozyten, welche unter dem Einfluss der Differenzierungssubstanzen standen, wurden mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen.

Wie in Abb. 5 ersichtlich, nehmen die Thyreozyten unter 7-tägiger Vorbehandlung mit APHA Compound 8 (1  $\mu\text{M}$ ) innerhalb von 6 Stunden so viel Radioiod auf, dass sich diese Inkorporation signifikant von den Kontrollen unterscheidet. Bei den restlichen Differenzierungssubstanzen kann im Vergleich zur Kontrolle kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. 24 Stunden nach Radioiodzugabe sieht man bei Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ) gegenüber den unstimulierten Zellen eine signifikant verminderte Iodidaufnahmerate, welche sich allerdings vom Ansatz mit dem reinen Lösungsmittel DMSO nicht unterscheidet. Die Substanzen zeigen also keinen Eigeneffekt. Unter den Stimulanzen APHA, Apicidin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure ist die Radioiodinkorporation in die Thyreozyten nicht signifikant verschieden zur Kontrolle und den Lösungsmitteln. Nach 48 Stunden bewirken Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) und Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ) in diesem Versuchsansatz im Vergleich zu den unstimulierten Zellkulturen eine erhöhte Radioiodaufnahme. Bei Arsentrioxid ist sie 1,5mal und bei Troglitazon 1,6mal höher als bei den unstimulierten Kontrollen.

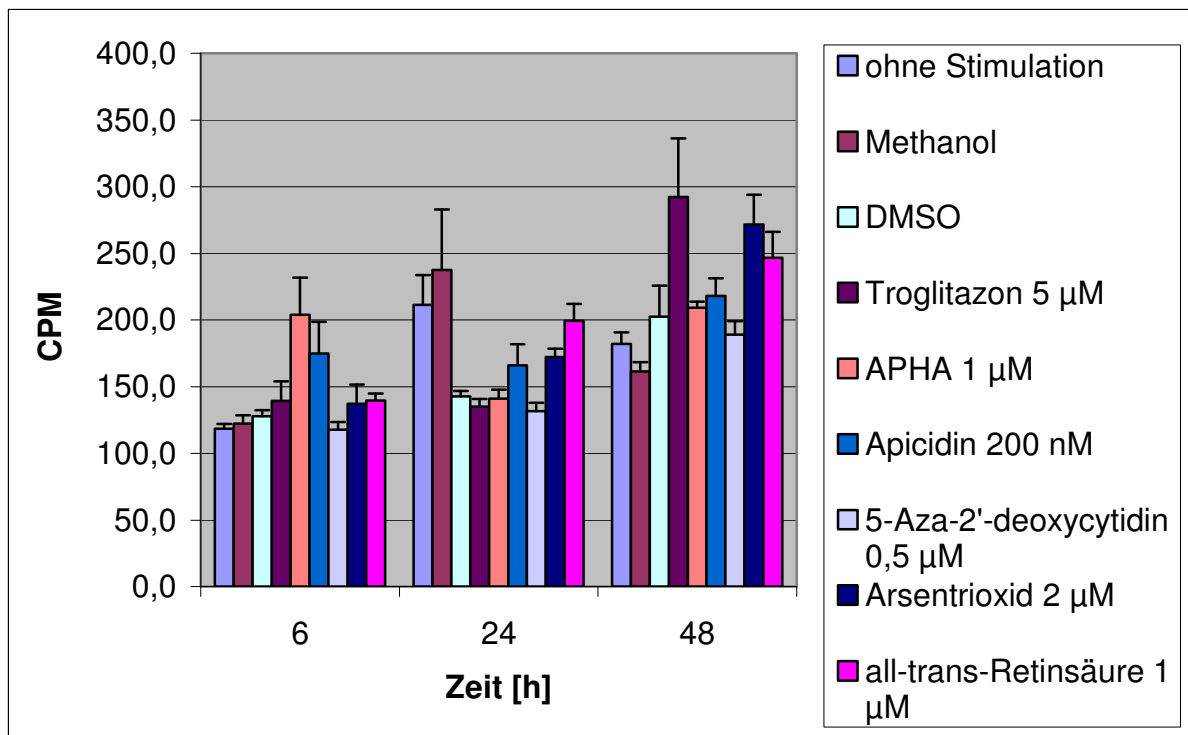
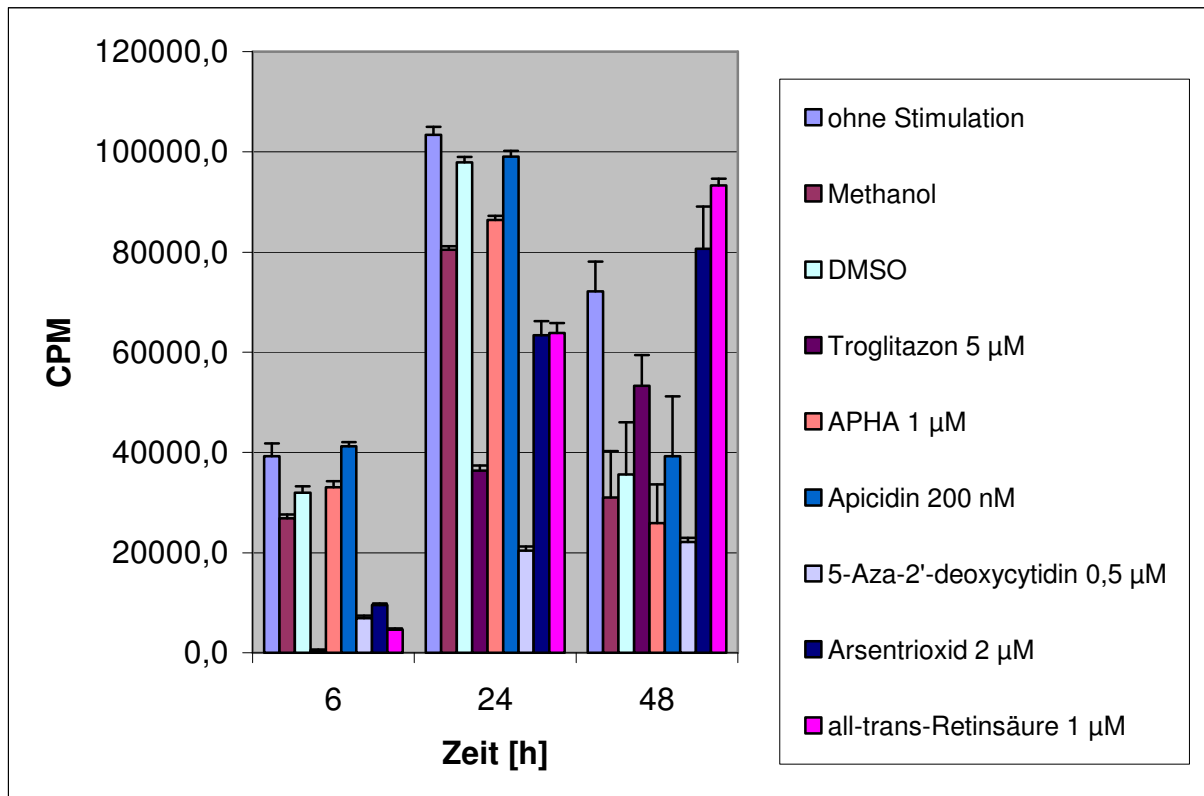


Abb. 5: Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe erfolgte 7 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe. Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde nach 6, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=6$ ). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 3.1 im Anhang).

#### 4.1.6 $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Thyreozyten nach 7-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen ( $^3\text{H}$ -Thymidinzugabe zu den Zellen am 7. Tag)

Hier wurde wie unter 4.1.5 verfahren. An Stelle der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Thyreozytenkulturen nach 7-tägiger Stimulation mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen bestimmt. Aus Abb. 6 wird deutlich, dass unter Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ), Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) und all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten 6 Stunden nach Applikation signifikant vermindert werden kann. Bei APHA (1  $\mu\text{M}$ ) und Apicidin (200 nM) ist der Unterschied zur Kontrolle nur gering. 24 Stunden nach Applikation des Radiothymidins zeigt sich unter Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ), Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ) ebenfalls eine signifikant verminderte  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahmerate. Zellen, die mit Arsentrioxid behandelt werden, nehmen nur noch 0,6 mal so viel  $^3\text{H}$ -Thymidin auf wie die unbehandelten, die mit Troglitazon behandelten Zellen nur noch 0,35 mal so viel und die mit 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelten Thyreozyten nur noch 0,19 so viel auf. APHA, Apicidin und all-trans-

Retinsäure bewirken bei den Thyreozyten 24 Stunden nach Zugabe von Radiothymidin zum Medium keine veränderte  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahmerate. Wie Abb. 6 zeigt nimmt 48 Stunden nach Radiothymidinzugabe zum Medium die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten unter APHA (1  $\mu\text{M}$ ), Apicidin (200 nM) und 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ) ab, was allerdings auf deren Lösungsmittel DMSO zurückzuführen ist, zumal bei DMSO auch ein signifikanter Effekt gegenüber den unbehandelten Zellen zu erkennen ist.



**Abb. 6:** Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe erfolgte 7 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme wurde nach 6, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=8$ ). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq  $^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7.1 im Anhang).

#### 4.1.7 $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Thyreozyten nach 14-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen ( $^{125}\text{I}$ -Iodidzugabe zu den Zellen am 14. Tag)

Kultivierte menschliche Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit den Differenzierungssubstanzen Troglitazon, APHA Compound 8, Apicidin, Arsentrioxid, all-trans-Retinsäure und deren Lösungsmittel stimuliert. Die Zugabe der Stimulanzien erfolgte 14 Tage vor der  $^{125}\text{I}$ -Iodidzugabe zu den Zellkulturen. Die Thyreozyten, die



mit 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu$ M) und Arsenitoxid (2  $\mu$ M) behandelt wurden konnten nicht ausgewertet werden, da Arsenitoxid und 5-Aza-2'-deoxycytidin während der 14-tägigen Inkubationsdauer zur Apoptose nahezu aller Zellen führte. Die Schilddrüsenzellen, die mit keiner der Differenzierungssubstanzen behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als weitere Kontrollgruppen dienten die Schilddrüsenzellen, die mit den Lösungsmitteln Methanol und DMSO versetzt wurden. Die Lösungsmittel wurden in denselben Konzentrationen eingesetzt, wie sie für das Auflösen der Differenzierungssubstanzen verwendet wurden.

Nach der  $^{125}$ I-Iodidzugabe zu den vorinkubierten Thyreozyten wurde 6, 24 und 48 Stunden abgewartet und danach die Radioiodinkorporation bestimmt. Die Ergebnisse der  $^{125}$ I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten, welche unter dem Einfluss der Differenzierungssubstanzen standen, wurden mit den jeweiligen Kontrollgruppen verglichen.

Aus Abb. 7 geht hervor, dass es 6 Stunden nach Radioiodapplikation zu keinen Veränderungen in der  $^{125}$ I-Iodidaufnahme in die Schilddrüsenzellen kommt. Die Aufnahmeraten sind unter den Differenzierungssubstanzen im Vergleich zu den unstimulierten Thyreozyten nur wenig niedriger.

Nach 24 Stunden sind die Radioiodaufnahmeraten insgesamt leicht angestiegen. Im Vergleich zur unstimulierten Zellkultur aber, gibt es wiederum keine signifikanten Unterschiede.

48 Stunden nach Radioiod-Applikation ist unter Apicidin (200 nM) eine signifikante Veränderung hinsichtlich der  $^{125}$ I-Iodidaufnahme im Vergleich zu den unstimulierten Zellkulturen zu sehen. Im Vergleich zu den mit dem Lösungsmittel DMSO behandelten Zellen kann allerdings kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die übrigen eingesetzten Differenzierungssubstanzen bewirken bei den Thyreozyten auch zu diesem Zeitpunkt keine signifikant höhere  $^{125}$ I-Iodidaufnahme.

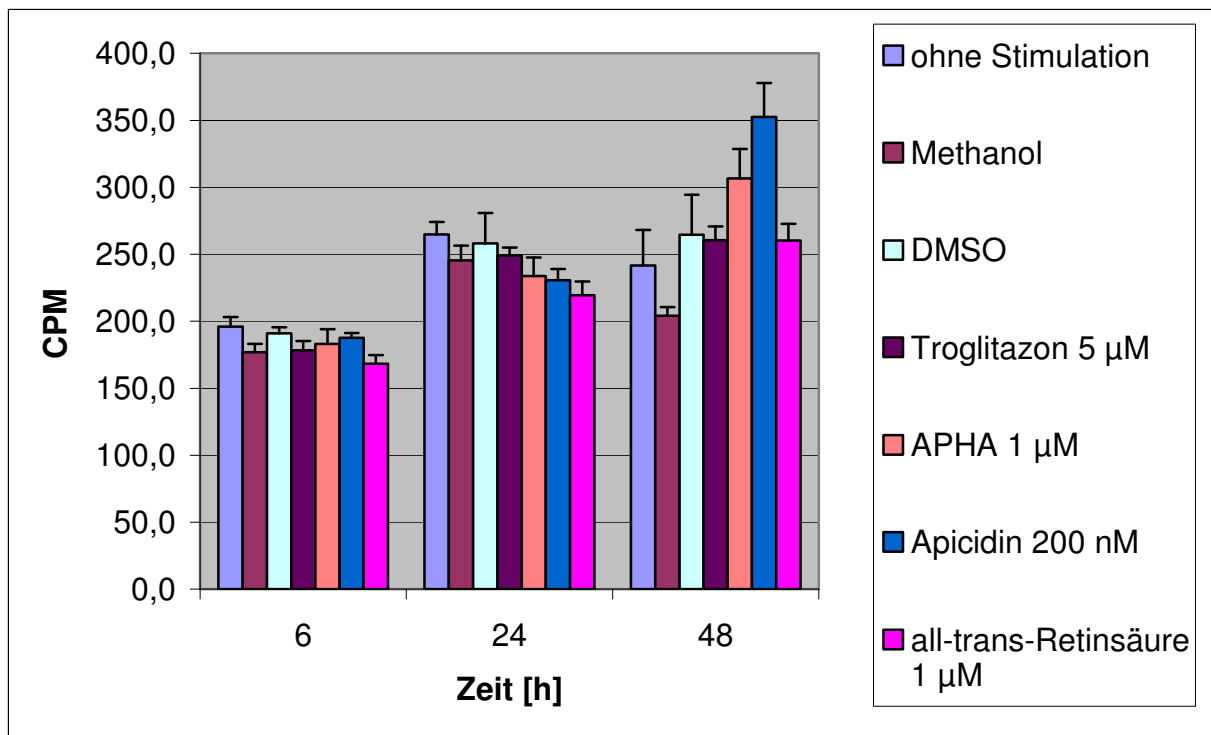


Abb. 7: Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe erfolgte 14 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe. Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde nach 6, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=6$ ). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . ( Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 3.2 im Anhang).

#### 4.1.8 $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten nach 14-tägiger Behandlung mit unterschiedlichen differenzierungsaktiven Substanzen

##### ( $^3\text{H}$ -Thymidinzugabe zu den Zellen am 14. Tag)

Hier wurde wie unter 4.1.7 verfahren. An Stelle der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme gemessen. Auf Abb. 8 ist zu sehen, dass die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Zellen 6 Stunden nach Radiothymidinapplikation unter all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) signifikant abnimmt; die Thymidinaufnahme beträgt das 0,3-fache der Kontrolle. Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ), APHA (1  $\mu\text{M}$ ) und Apicidin (200 nM) beeinflussen die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme nur gering. Nach 24 Stunden zeigt sich unter all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) wieder eine signifikante Erniedrigung der Thymidinaufnahme, die das 0,6-fache der Kontrolle beträgt, welche aber mitunter auch durch das Lösungsmittel Methanol hervorgerufen wird. Keines von den übrigen Stimulanzien hatte einen signifikanten Einfluss auf die Thymidininkorporation in kultivierte Thyreozyten. Nach 48 Stunden war unter all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) wiederum ein signifikanter, dieses Mal positiver, Effekt zu sehen. Die Thymidininkorporation beträgt nun im Vergleich zur Kontrolle das 1,6-fache. APHA

(1  $\mu\text{M}$ ) erzielt ebenfalls einen signifikanten Effekt. Unter APHA vermindert sich die Thymidinaufnahme genauso wie durch DMSO auf das 0,4-fache der Kontrollgruppe. Durch Apicidin und Troglitazon kommt es zu diesem Zeitpunkt nur zu einer leicht verminderten Aufnahme von  $^3\text{H}$ -Thymidin.

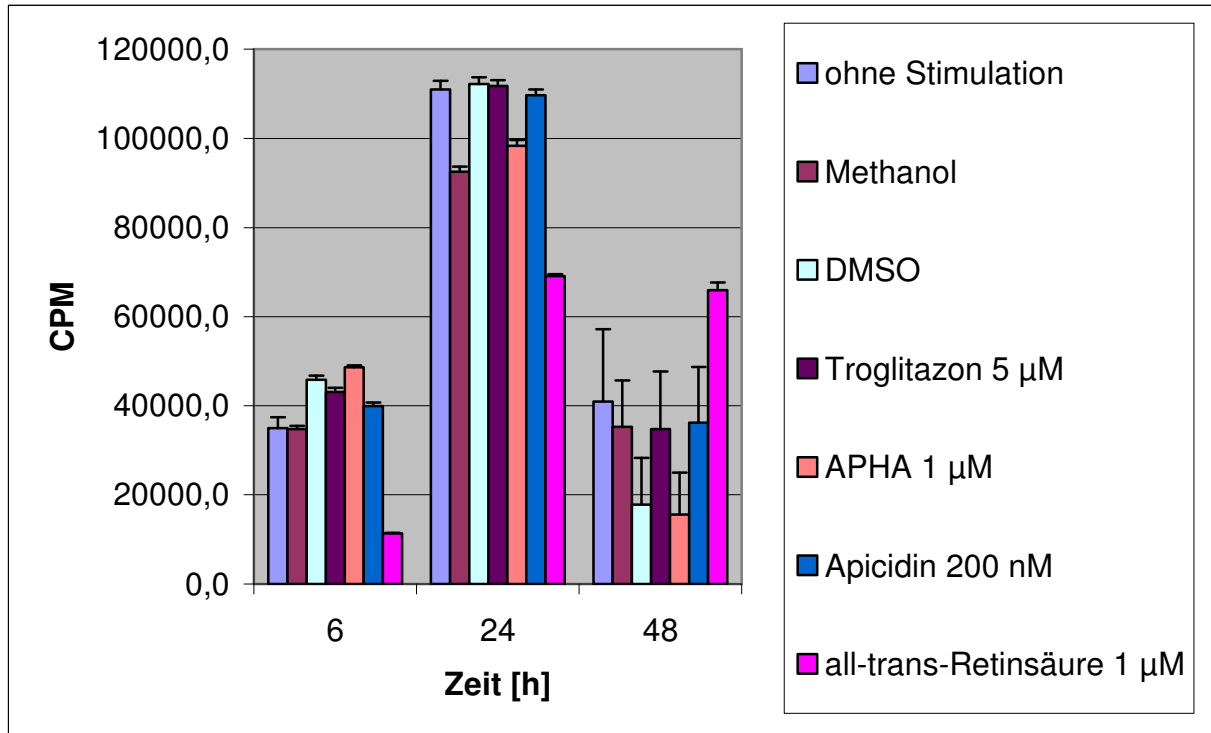


Abb. 8: Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, Arsentrioxid und all-trans-Retinsäure auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe erfolgte 14 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme wurde nach 6, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=8$ ). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6  $\text{kBq } ^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7.2 im Anhang).

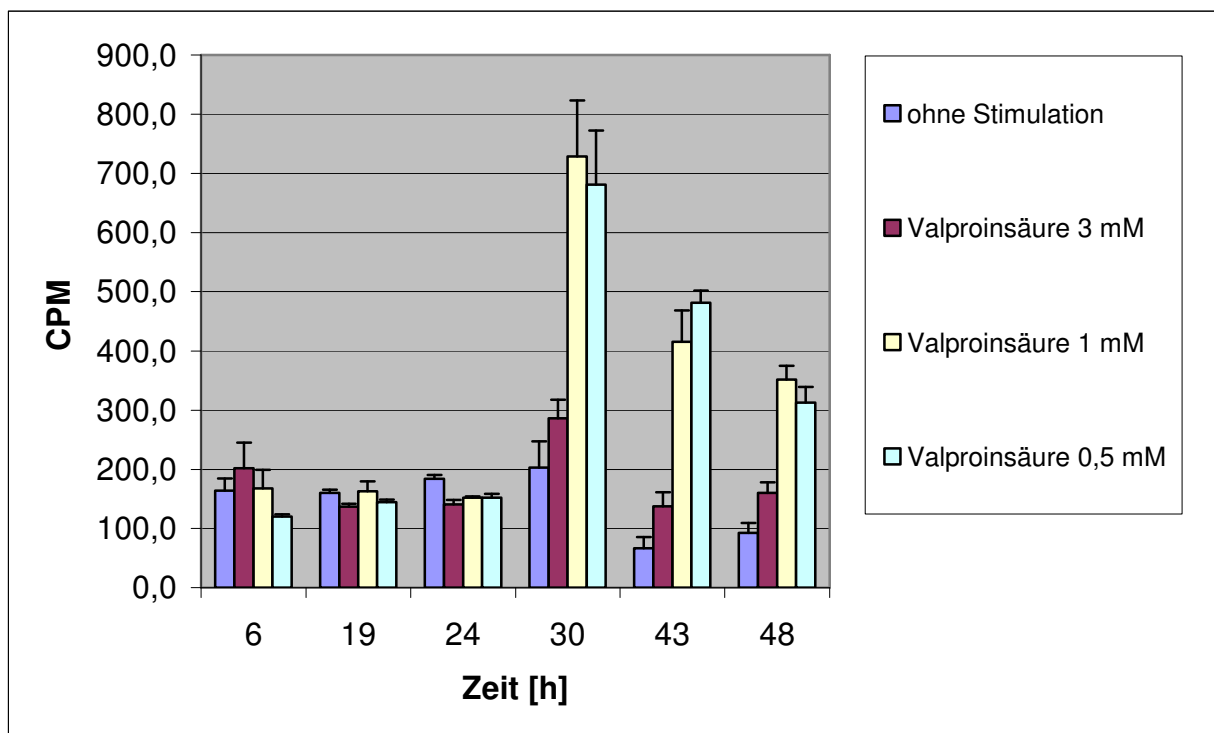
#### 4.1.9 $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Valproinsäure

Kultivierte menschliche Schilddrüsenzellen der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit Valproinsäure in den Konzentrationen 3 mM, 1 mM und 0,5 mM stimuliert. Die Stimulanzien- und Radioiodzugabe erfolgte beim Aussäen der Zellen. Die Schilddrüsenzellen, die nicht mit Valproinsäure behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als Lösungsmittel diente Medium.

Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 6, 19, 24, 30, 43 und 48 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in die Thyreozyten, unter Valproinsäure in verschiedenen Konzentrationen wurden mit den unbehandelten Zellen verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt.

In Abb. 9 wird deutlich, dass unter 3 mM Valproinsäure zu allen Messzeiten kein bemerkenswerter Anstieg der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme zu erkennen ist. Dagegen kommt's unter 1 mM und 0,5 mM Valproinsäure nach 30, 43, und 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg. Die höchsten Einbauraten treten nach 30 Stunden auf (ca. das 3,5-fache gegenüber der Kontrolle).

Nach 6, 19 und 24 Stunden führen 1 mM und 0,5 mM Valproinsäure zu keiner signifikanten Veränderung der Radioiodaufnahme gegenüber der Kontrollgruppe.



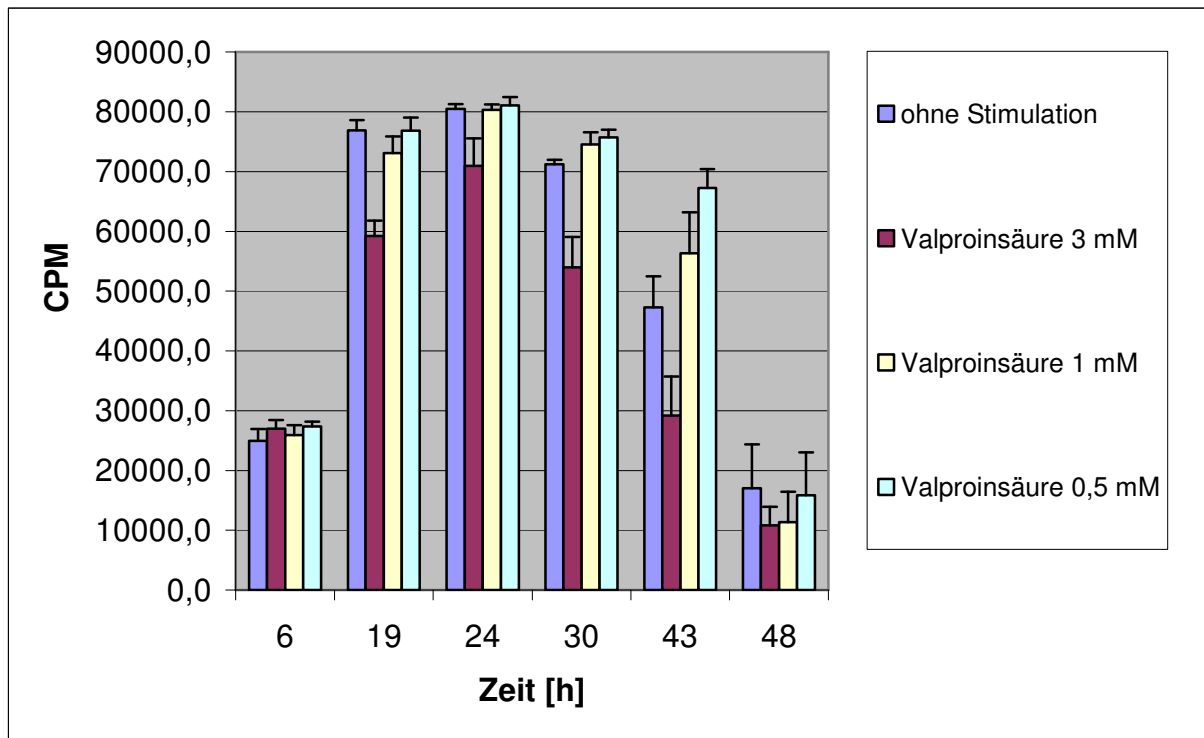
*Abb. 9: Einfluss von Valproinsäure auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzien- und die Radioiodzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde nach 6, 19, 24, 30, 43 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 1.9 im Anhang).*

#### 4.1.10 $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Valproinsäure

Es handelt sich hier um denselben Ansatz wie unter 4.1.9. An Stelle von  $^{125}\text{I}$ -Iodid wurde jetzt  $^3\text{H}$ -Thymidin gemessen.

In Abb. 10 zeigt sich bei keiner der eingesetzten Valproinsäurekonzentrationen weder nach 6, 19, 24, noch nach 30 Stunden Inkubation eine signifikante  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahmerate im Vergleich zur Kontrolle. Erst nach einer Inkubationsdauer

von 43 Stunden kommt es zu signifikant veränderten  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahmeraten. Unter 3 mM Valproinsäure beträgt die Thymidinaufnahme nur noch 0,6mal so viel wie bei den unbehandelten malignen Thyreozyten während unter 0,5 mM Valproinsäure die Aufnahme auf das 1,4-fache ansteigt. Nach 48-stündiger Inkubationsdauer ist unter 0,5 mM Valproinsäure kein bemerkenswerter Effekt mehr zu sehen. Unter 3 mM und 1 mM Valproinsäure geht die Thymidinaufnahme aber auf das 0,6-fache gegenüber der Kontrolle zurück.

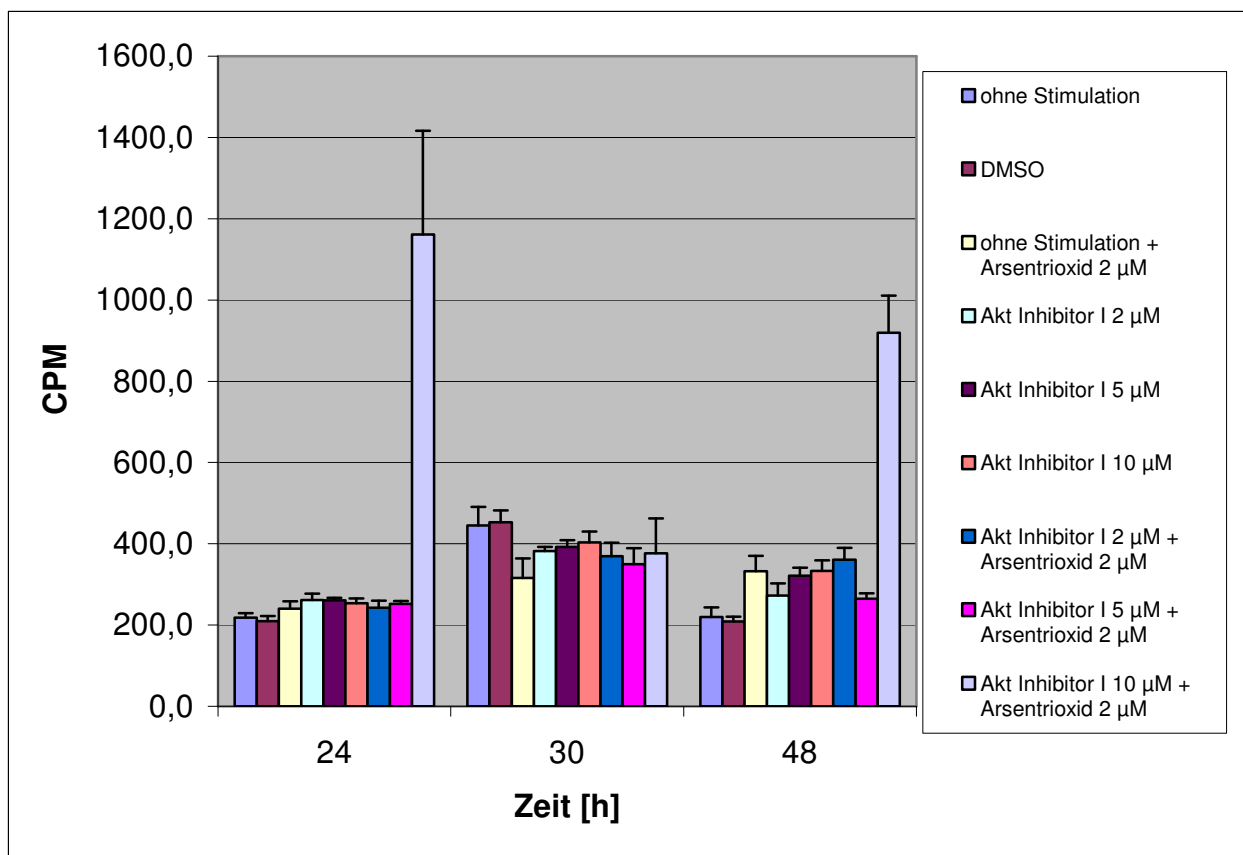


**Abb. 10:** Einfluss von Valproinsäure auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Stimulanzienzugabe erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme wurde nach 6, 19, 24, 30, 43 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=8$ ). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq  $^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 5.7 im Anhang).

#### 4.1.11 $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme unter dem Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid.

Transformierte humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor I und jeweils auch in Kombination mit 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid stimuliert. Die Zugabe des Akt Inhibitors I erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die Zugabe von Arsen und  $^{125}\text{I}$ -Iodid erfolgte erst 2 Stunden nachdem die Zellen ausgesät wurden. Die Zellen, die weder mit Akt Inhibitor I, noch mit Arsentrioxid oder DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als eine weitere

Kontrollgruppe dienten unstimulierte Zellen, denen 2 Stunden nach der Zellaussaat 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid zugesetzt wurde. DMSO, das Lösungsmittel von Akt Inhibitor I, dient als dritte Kontrollgruppe. Die Iodaufnahme in die transformierten Schilddrüsenzellen wurde nach 24, 30 und 48 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten der Kontrollgruppen wurden mit jenen Gruppen verglichen, die entweder nur mit Akt Inhibitor I oder mit Akt Inhibitor I + Arsentrioxid stimuliert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Nach 24 und 48 Stunden tritt zwischen Akt Inhibitor I (10  $\mu\text{M}$ ) und Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) ein synergistischer Effekt auf. Nach 24 Stunden steigt die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme auf über das 5-fache der unbehandelten Thyreozyten an. Nach 48-stündiger Inkubation ist die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme immerhin noch 4mal höher. Durch 2  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor I allein, also ohne Kombination mit Arsentrioxid, kann zu keiner der Messzeiten eine gesteigerte Iodidinkorporation festgestellt werden.

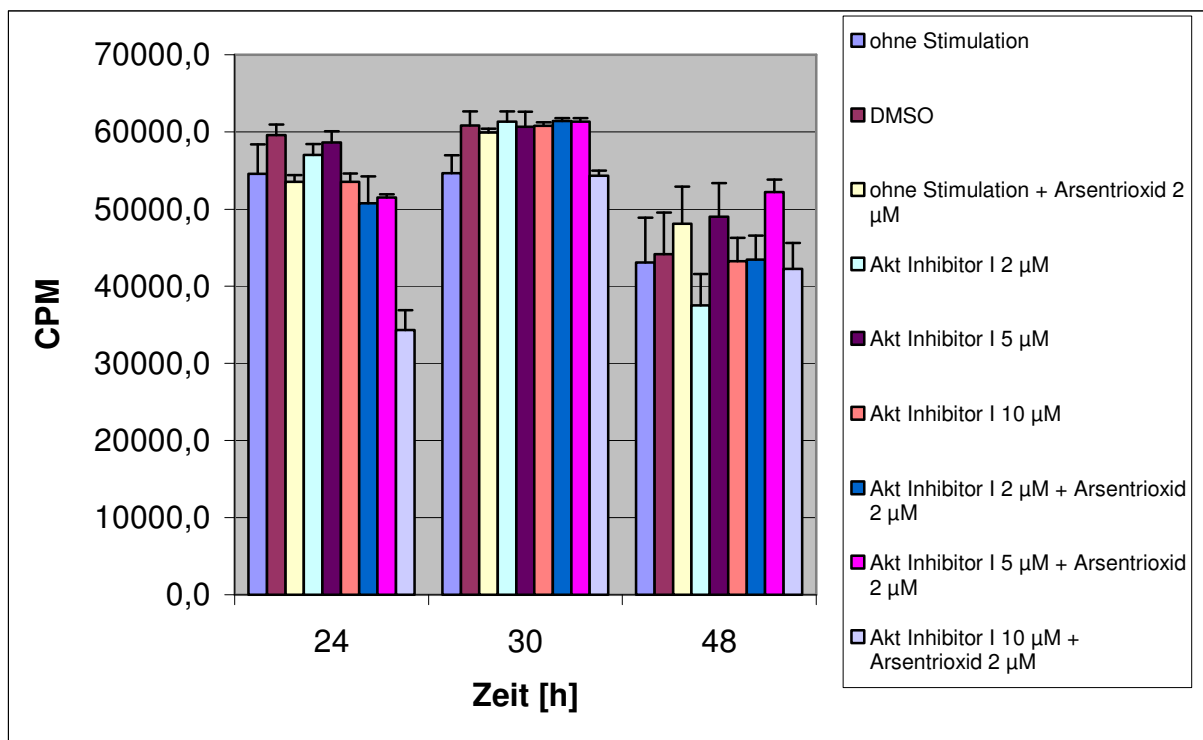


**Abb. 11:** Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Zugabe des Akt Inhibitors I erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die Zugabe von  $^{125}\text{I}$ -Iodid und Arsentrioxid erfolgte 2 Stunden nach der Zellaussaat. Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde nach 24, 30 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=6). Pro Kulturloch wurden 130 000 Zellen/ 200  $\mu\text{l}$  Medium eingesetzt.  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 4.1 im Anhang).

#### 4.1.12 $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme unter dem Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid.

Bei folgendem Versuch waren die Ausgangsbedingungen dieselben wie unter 4.1.11. Es wurde genau gleich verfahren, nur mit dem Unterschied, dass hier die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten gemessen wurde.

Zu keiner der Messzeiten kann ein bemerkenswerter Rückgang der Thymidineinbauraten nachgewiesen werden.



*Abb. 12: Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Zugabe des Akt Inhibitors I erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin und Arsentrioxid erfolgte 2 Stunden nach der Zellaussaat. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme wurde nach 24, 30 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=8). Pro Kulturloch wurden 65 000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt.  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe pro Kulturloch: 6 kBq  $^3\text{H}$ . ( Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 8.1 im Anhang).*

#### 4.1.13 $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme unter dem Einfluss von Akt Inhibitor V (Triciribine) unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid.

Transformierte humane Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM und 20 µM Akt Inhibitor V (Triciribine) und jeweils auch in Kombination mit 2 µM Arsentrioxid stimuliert. Die Zugabe des Akt Inhibitors V (Triciribine) erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die Zugabe von Arsen und  $^{125}\text{I}$ -Iodid erfolgte erst 2 Stunden nachdem die Zellen ausgesät wurden. Die Zellen, die weder mit Akt Inhibitor V (Triciribine), noch mit Arsentrioxid oder DMSO behandelt

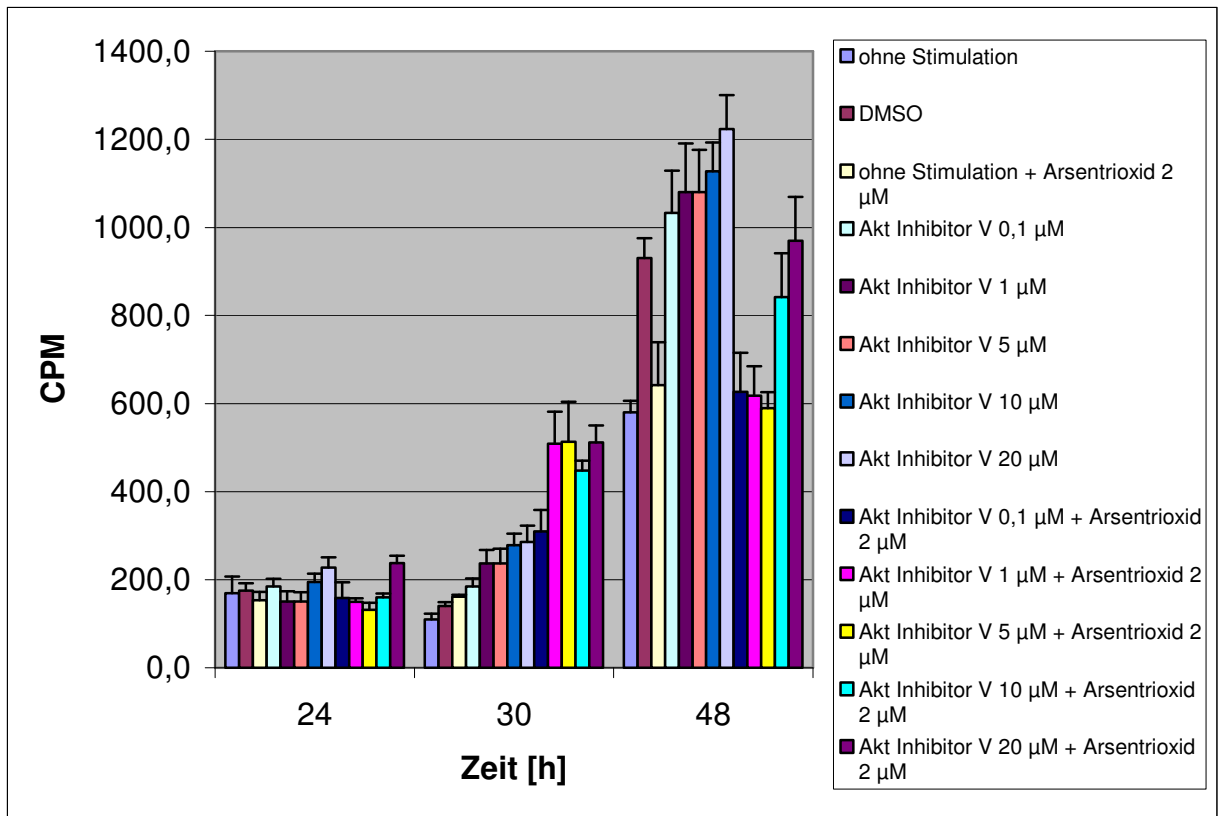
wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als eine weitere Kontrollgruppe dienten unstimulierte Zellen, denen 2 Stunden nach der Zellaussaat 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid zugesetzt wurde. DMSO, das Lösungsmittel von Akt Inhibitor V (Triciribine), dient als dritte Kontrollgruppe. Die Iodaufnahme in die transformierten Schilddrüsenzellen wurde nach 24, 30 und 48 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten der Kontrollgruppen wurden mit jenen Gruppen verglichen, die nur mit Akt Inhibitor V (Triciribine) oder mit Akt Inhibitor V (Triciribine) + Arsentrioxid stimuliert wurden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt.

Hierbei geht es wieder um die Frage, ob zwischen Akt Inhibitor V (Triciribine) und Arsentrioxid ein Synergismus besteht. Nach 24 Stunden ist unter keiner der getesteten Konzentrationen ein signifikanter Effekt zu sehen. Unter der Kombinationsbehandlung aus 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor V (Triciribine) und 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid ist nach 30 Stunden jedes Mal ein signifikanter Anstieg der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme zu erkennen. Die Iodidinkorporation nimmt mit zunehmender Triciribine-Konzentration zu, d.h. dass bei 20  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor V + 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid die höchste  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme zu verzeichnen ist.

Nach einer Stimulationszeit von 48 Stunden mit der Kombination aus 20  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor V (Triciribine) unterscheidet sich die Iodidinkorporation signifikant von der Kontrollgruppe, die mit keiner Substanz behandelt wurde. Diese Kombination zeigt aber gegenüber dem Lösungsmittel keinen signifikanten Effekt.

Die restlichen Stimulanzen zeigen nach 48 Stunden keinen Einfluss auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in die transformierten humanen Schilddrüsenzellen.





**Abb. 13:** Einfluss von Akt Inhibitor V (Triciribine) unterschiedlicher Konzentrationen auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in kultivierte humane Thyreozyten (CGTH-W-1). Die Zugabe des Akt Inhibitors V (Triciribine) erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die Zugabe von  $^{125}\text{I}$ -Iodid und Arsentrioxid erfolgte 2 Stunden nach der Zellaussaat. Die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme wurde nach 24, 30 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM ( $n=6$ ). Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt.  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe pro Kulturloch: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 4.5 im Anhang).

## 4.2 Photographische Abbildungen der follikulären Schilddrüsenkarzinomzellen

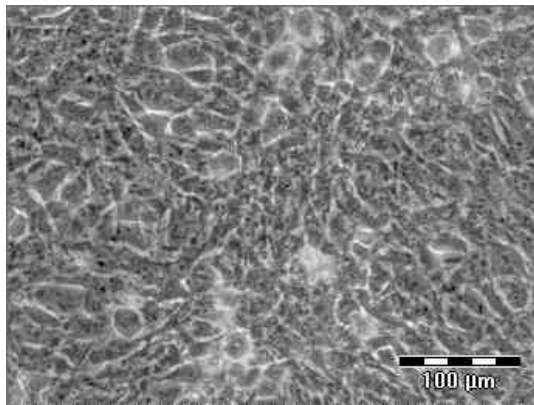


Abb. 4.2.1: CGTH-W-1 Zellen. Ohne Stimulation nach 28 h Inkubationszeit

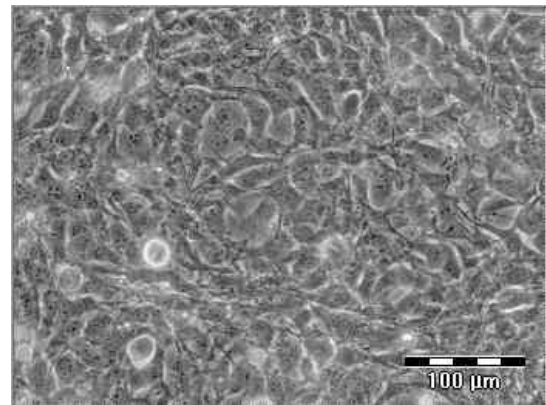


Abb. 4.4.2: CGTH-W-1 Zellen. Ohne Stimulation nach 48 h Inkubationszeit

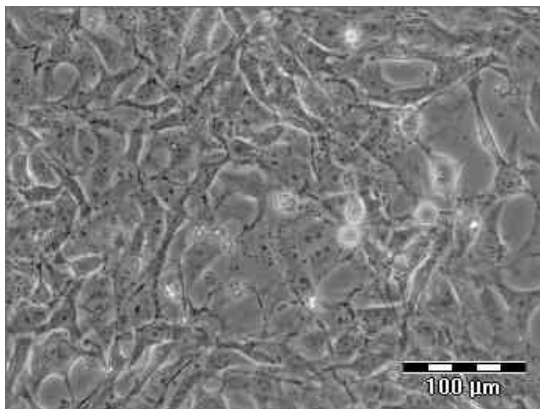


Abb. 4.2.3: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Troglitazon 5 μM nach 28 h Inkubationszeit

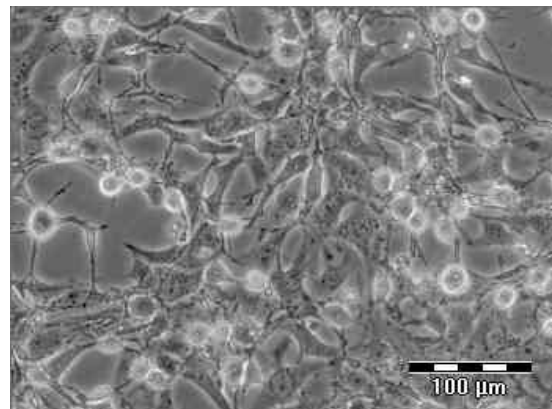


Abb. 4.2.4: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Troglitazon 5 μM nach 48 h Inkubationszeit

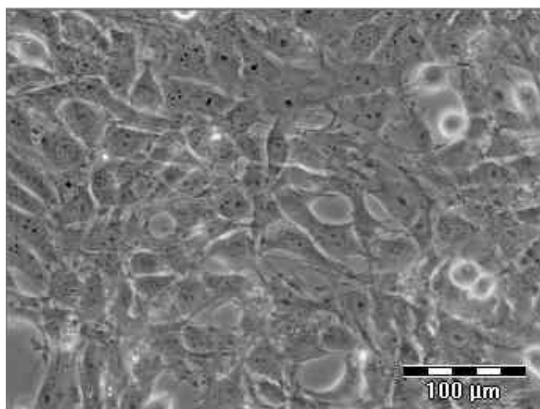


Abb. 4.2.5: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit APHA 1 μM nach 28 h Inkubationszeit

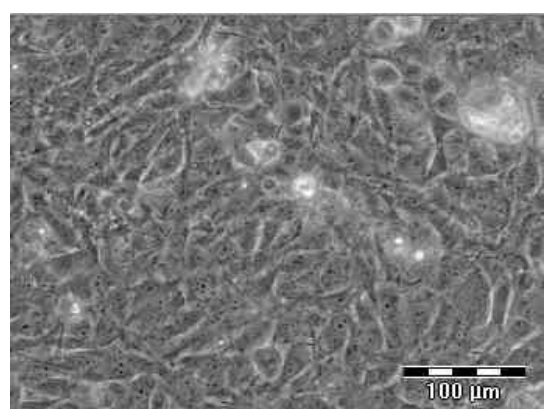


Abb. 4.2.6: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit APHA 1 μM nach 48 h Inkubationszeit

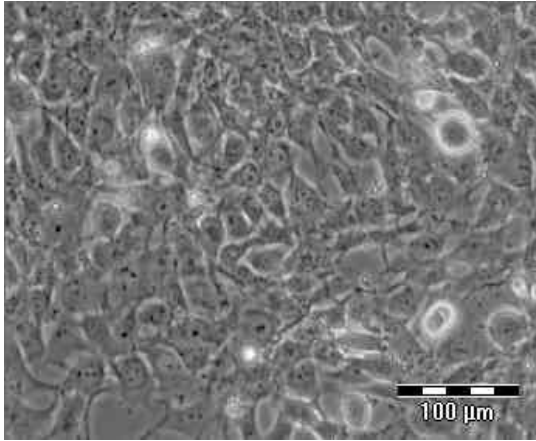


Abb. 4.2.7: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Apicidin 200 nM nach 28 h Inkubationszeit

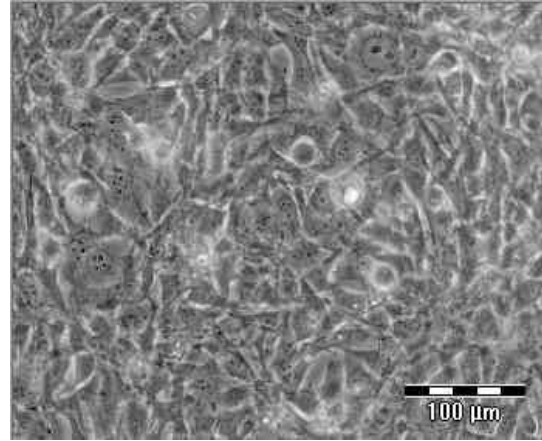


Abb. 4.2.8: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Apicidin 200 nM nach 48 h Inkubationszeit

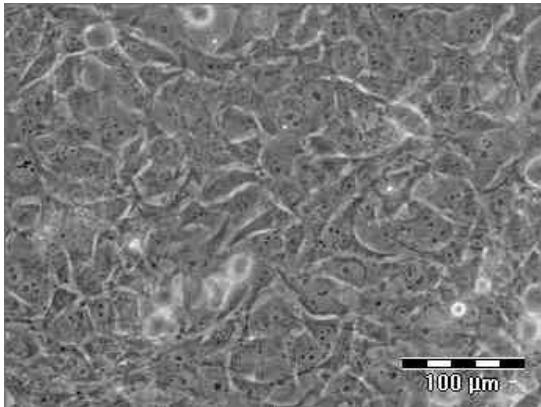


Abb. 4.2.9: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit 5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 μM nach 28 h Inkubationszeit

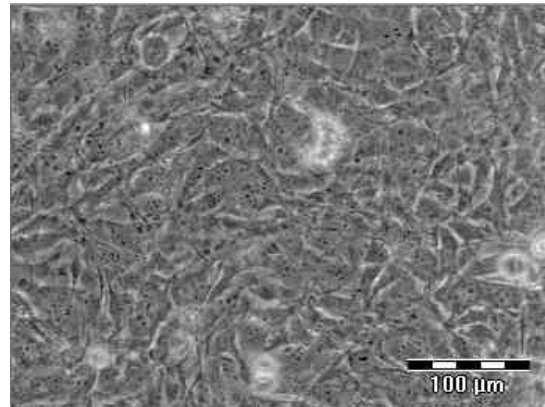


Abb. 4.2.10: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit 5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 μM nach 48 h Inkubationszeit

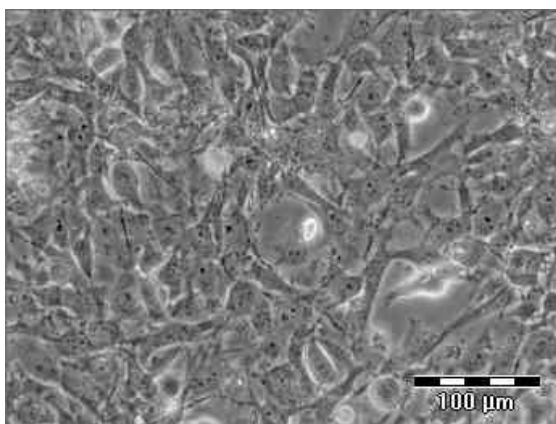


Abb. 4.2.11: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit all-trans-Retinsäure 1 μM nach 28 h Inkubationszeit

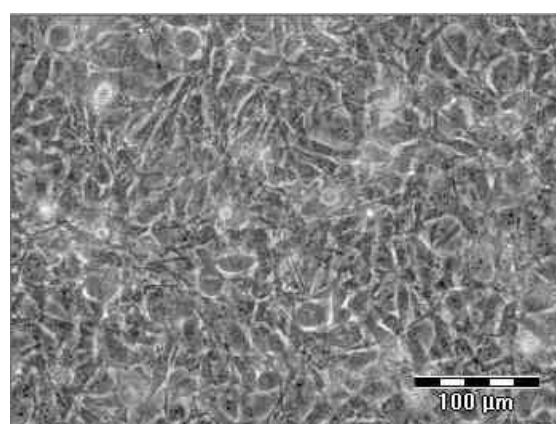


Abb. 4.2.12: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit all-trans-Retinsäure 1 μM nach 48 h Inkubationszeit

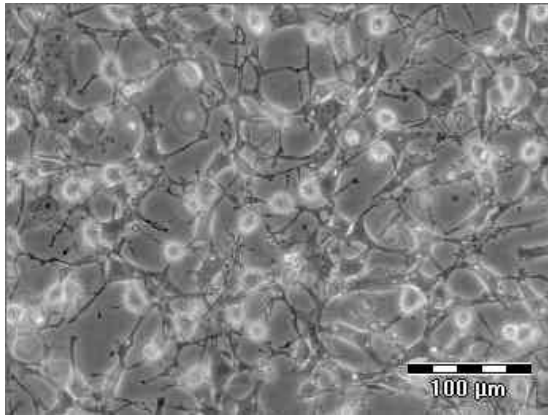


Abb. 4.2.13: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Mevinolin 100  $\mu\text{M}$  nach 28 h Inkubationszeit

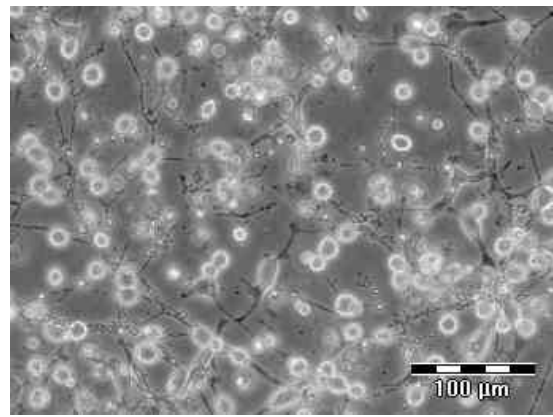


Abb. 4.2.14: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Mevinolin 100  $\mu\text{M}$  nach 48 h Inkubationszeit

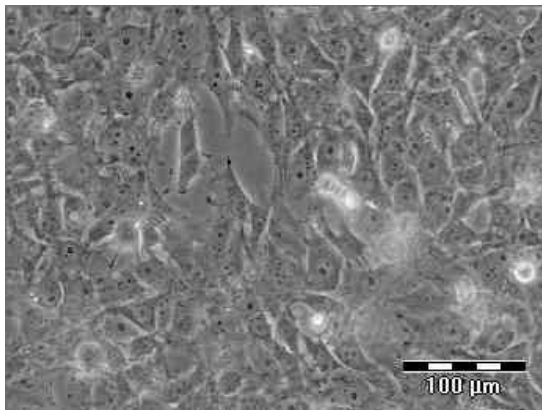


Abb. 4.2.15: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Arsenitrioxid 2  $\mu\text{M}$  nach 28 h Inkubationszeit

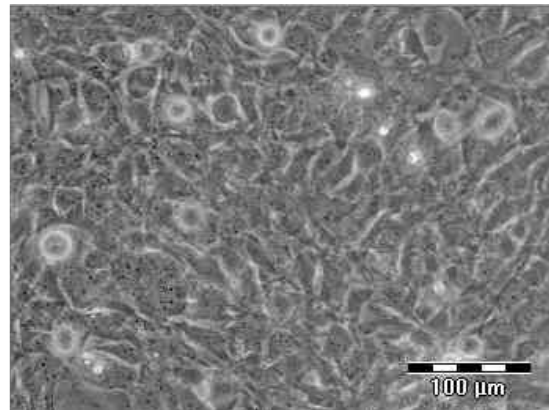


Abb. 4.2.16: CGTH-W-1 Zellen. Stimulation mit Arsenitrioxid 2  $\mu\text{M}$  nach 48 h Inkubationszeit

### **4.3 Einfluss verschiedener Differenzierungssubstanzen auf die Apoptose**

#### **4.3.1 Einfluss von Troglitazon, APHA Compound 8, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Mevinolin, Arsentrioxid, all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure auf die Apoptose maligner humaner Thyreozyten**

Die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit Troglitazon (5 µM), APHA (1 µM), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5 µM), Mevinolin (100 µM), Arsentrioxid (2 µM), all-trans-Retinsäure (1 µM) und 13-cis-Retinsäure (1 µM) stimuliert, um eine darunter ausgelöste Apoptose zu erfassen. Nach 24 und 48 Stunden Stimulation wurde der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers gemessen. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, und als Positiv-Kontrollen dienten Staurosporin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Weitere Kontrollgruppen waren die Lösungsmittel DMSO, Methanol und Ethanol.

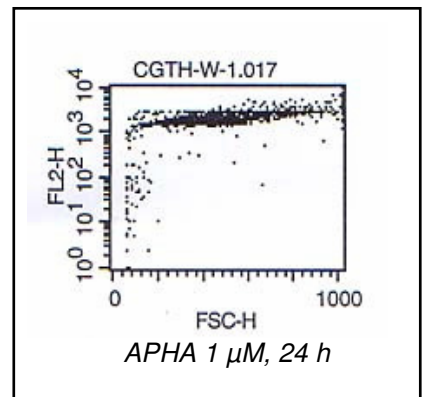
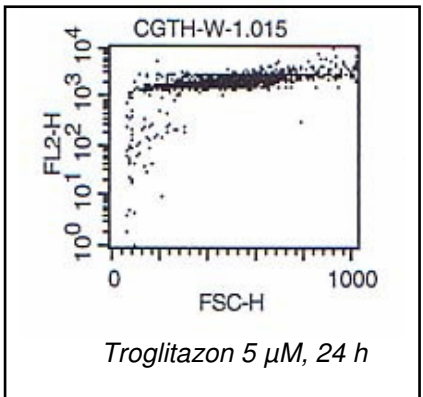
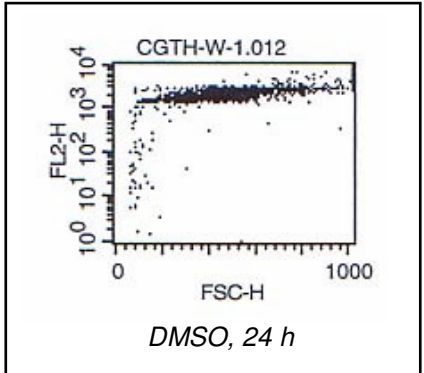
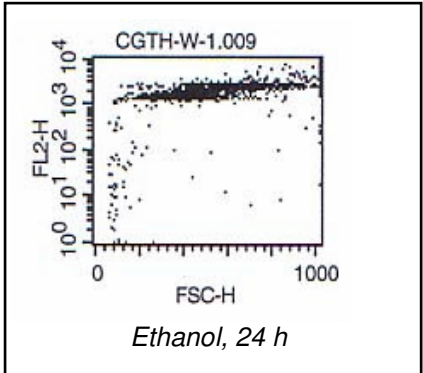
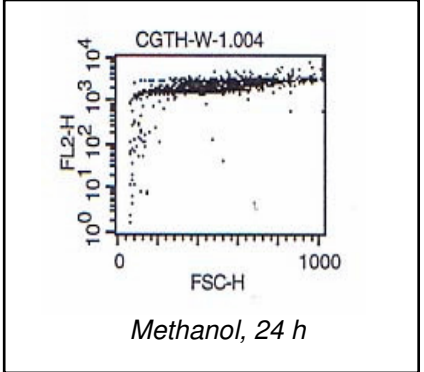
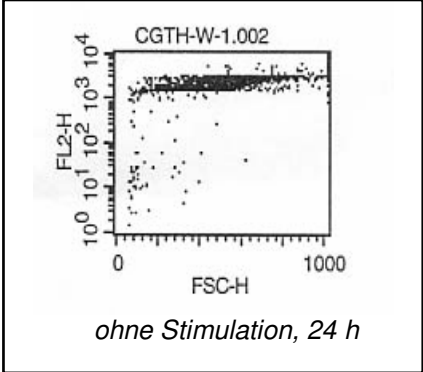
Bei der Negativ-Kontrolle liegt die Apoptoserate nach 24 Stunden bei 4 %. Bei Staurosporin liegt die Apoptoserate bei 12 % und unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liegt der entsprechende Wert bei 85 %.

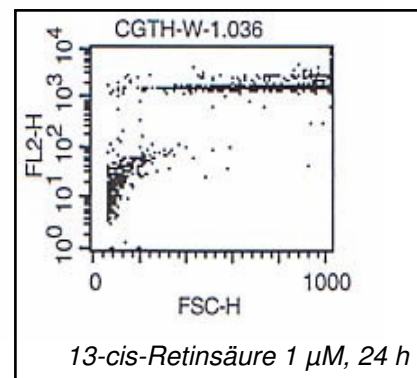
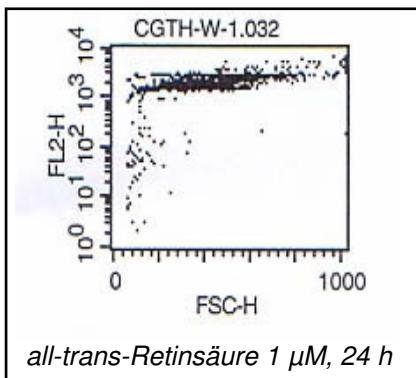
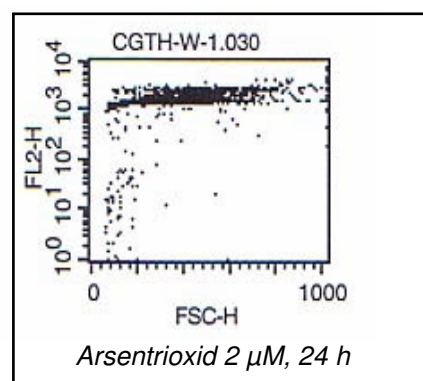
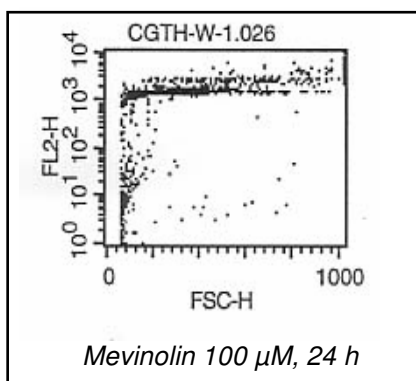
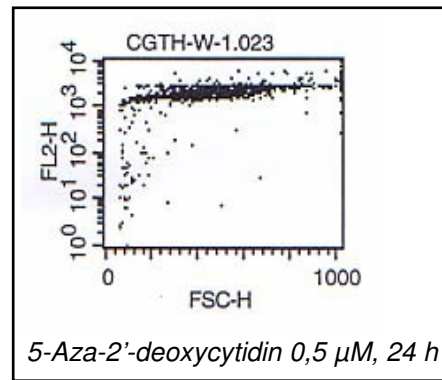
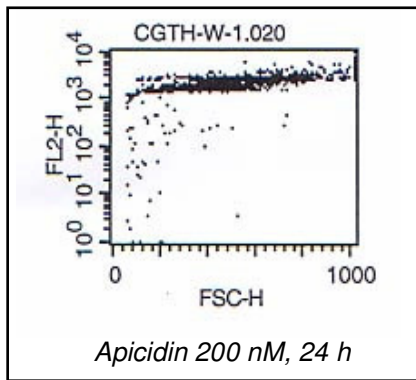
Bei Mevinolin (100 µM) und 13-cis-Retinsäure (1 µM) ist nach 24-stündiger Inkubationsdauer ein Anstieg der apoptotischen Zellen zu erkennen. Die Apoptoserate der mit Mevinolin stimulierten Schilddrüsenzellen liegt bei 18 % (Negativ-Kontrolle: 4 %). Die Inkubation mit 13-cis-Retinsäure (1 µM) erhöht die Rate an apoptotischen Thyreozyten auf 20 %. Nach Stimulation mit den restlichen Differenzierungssubstanzen ist entweder kein, nur ein minimaler Anstieg oder sogar eine Reduzierung der apoptotischen Zellen zu verzeichnen. Die Zugabe der Lösungsmittel Methanol und DMSO bewirkt jeweils eine Abnahme der apoptotischen Zellen auf 3 %. Bei Ethanol liegt der Wert bei 5 %.

Die Apoptoserate der mit APHA (1 µM), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5 µM) und all-trans-Retinsäure (1 µM) behandelten transformierten Thyreozyten verändert sich 24 Stunden nach Inkubation gegenüber der Negativ-Kontrolle nicht. Die Werte liegen jeweils auch bei 4 %.

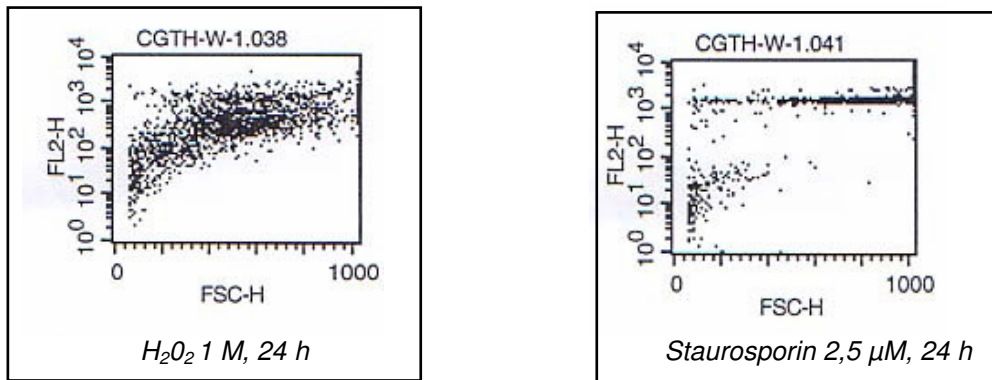
Bei den Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 führt Arsentrioxid (2 µM) nach einer 24-stündigen Inkubation zu einer Apoptoserate von 6 %. Unter Troglitazon (5 µM) liegt der Wert bei 3 %.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass nur durch die Stimulation mit 13-cis-Retinsäure und mit Mevinolin ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate zu verzeichnen ist. Die einzelnen Ergebnisse sind in Abb. 14 dargestellt.







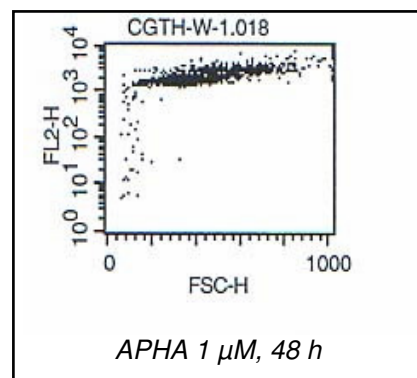
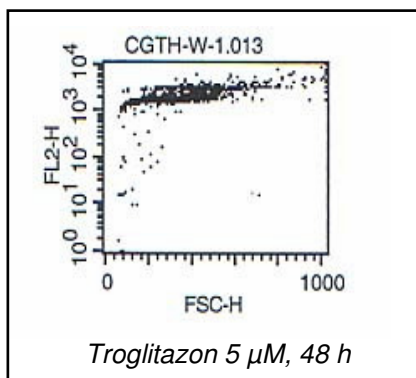
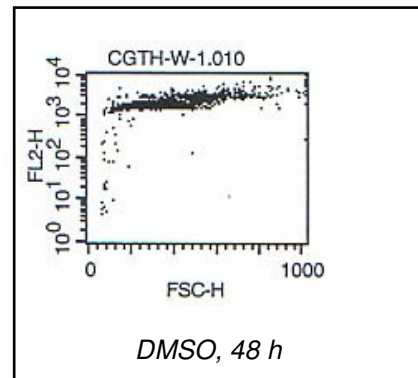
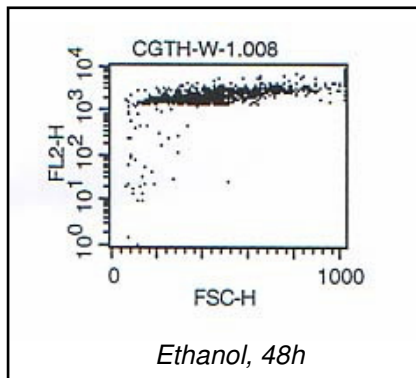
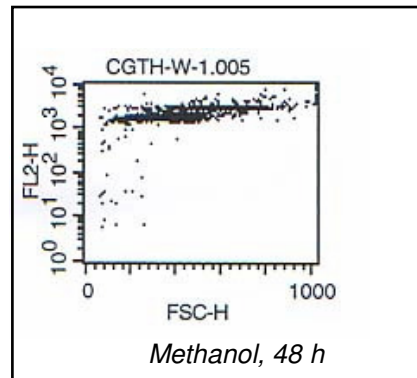
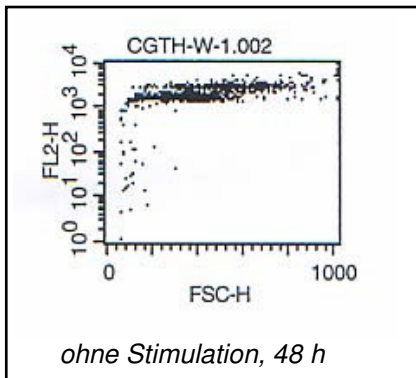


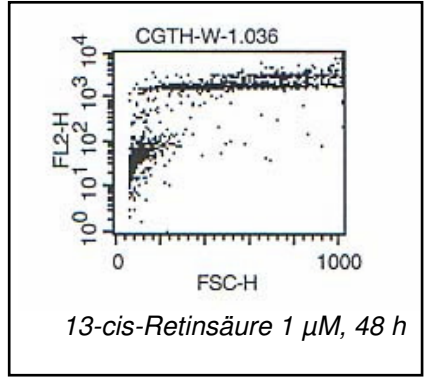
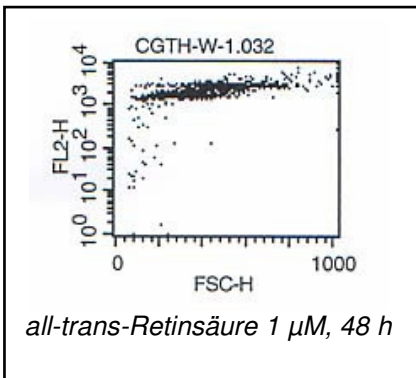
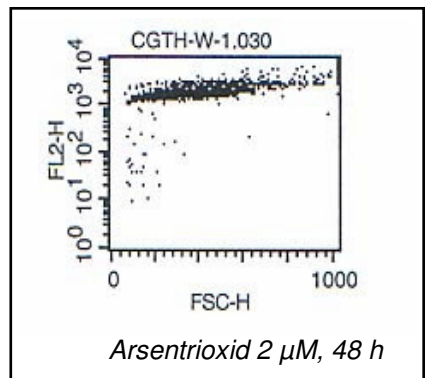
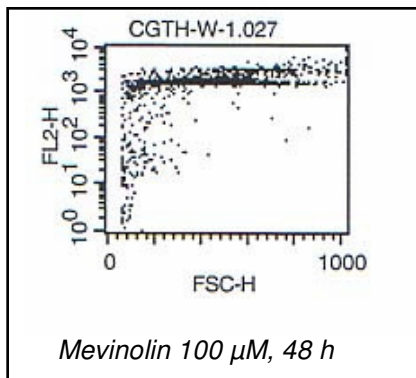
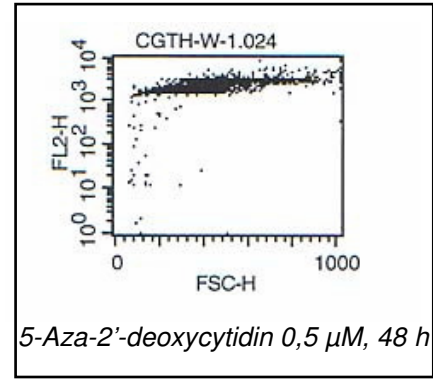
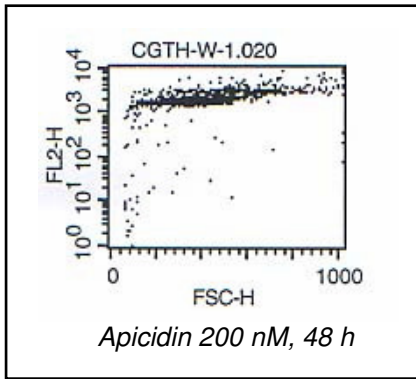
*Abb. 14: Einfluss von Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ), APHA Compound 8 (1  $\mu\text{M}$ ), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ), Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ), Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ), all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ), 13-cis-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ), deren Lösungsmittel,  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Apoptoserate wurde nach 24 Stunden gemessen. In den folgenden Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab. 9.1 im Anhang).*

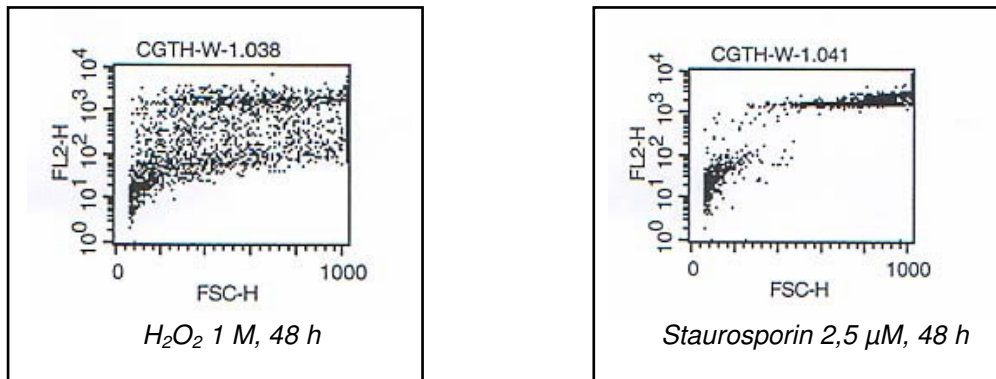
Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt die Apoptoserate der Negativ-Kontrolle bei 2 %. Auch die Zugabe der Lösungsmittel Methanol, Ethanol und DMSO zeigt keinerlei Wirkung in Bezug auf die Apoptose; hier liegt die Rate ebenfalls bei 2 %.  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Staurosporin, welche als Positiv-Kontrollen dienen, sind Zellgifte und bewirken somit höhere Raten an apoptotischen Zellen. Unter  $\text{H}_2\text{O}_2$  liegt die Apoptoserate bei 67 %, unter Staurosporin liegt sie bei 24 %. Die Differenzierungssubstanzen Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ), APHA Compound 8 (1  $\mu\text{M}$ ), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ), Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) und all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) bewirken im Vergleich zur Negativ-Kontrolle keine gesteigerte Apoptose. Die Apoptoseraten liegen alle bei 2 %.

13-cis-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) führt im Vergleich zu den anderen getesteten Differenzierungssubstanzen bei den cancerogenen Thyreozyten zur höchsten Apoptoserate (28 %). Auch die Zugabe von Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ) führt nach 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen (10 %). Die einzelnen Ergebnisse sind in Abb. 15 dargestellt. In Abb. 16 sind die Ergebnisse aus 3 separaten Ansätzen zusammengefasst.

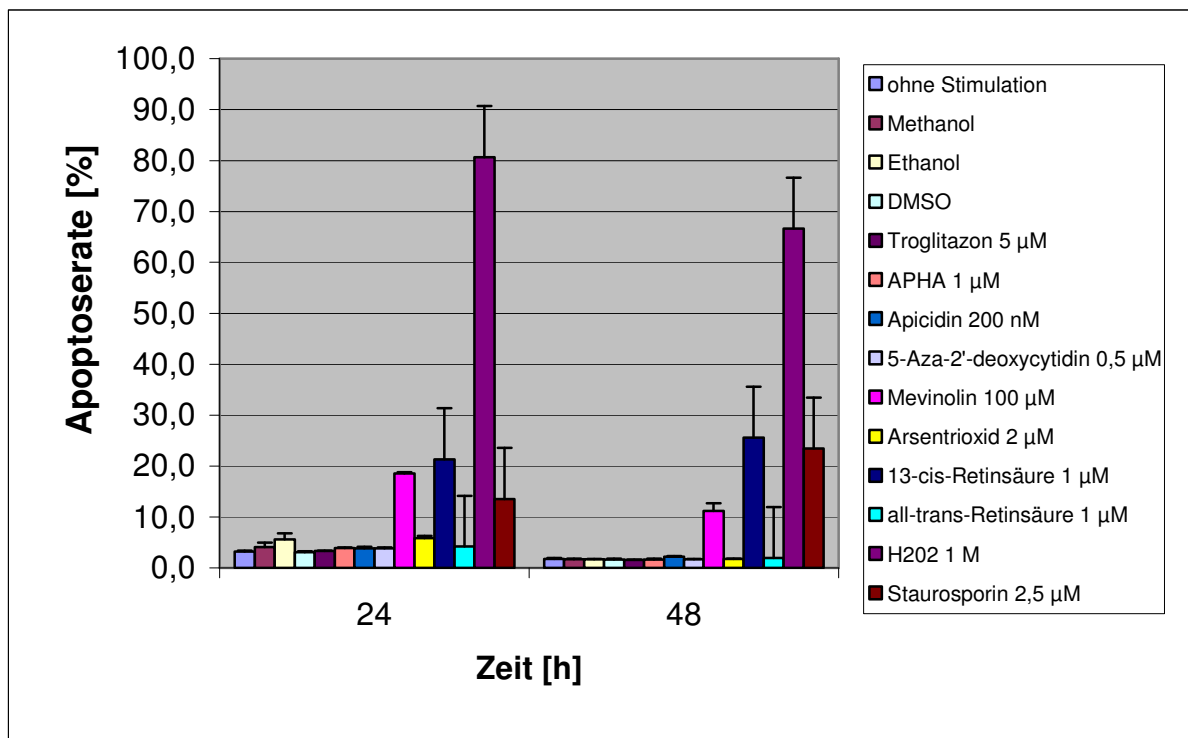








**Abb. 15:** Einfluss von Troglitazon (5 µM), APHA Compound 8 (1 µM), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5 µM), Mevinolin (100 µM), Arsentrioxid (2 µM), all-trans-Retinsäure (1 µM), 13-cis-Retinsäure (1 µM), deren Lösungsmittel, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Staurosporin auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Apoptoserate wurde nach 48 Stunden gemessen. In den folgenden Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab. 9.1 im Anhang).

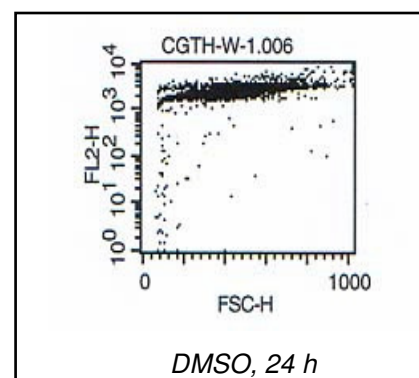
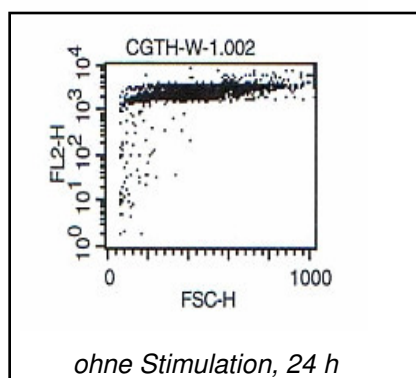


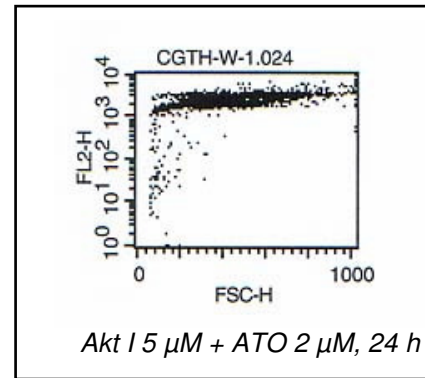
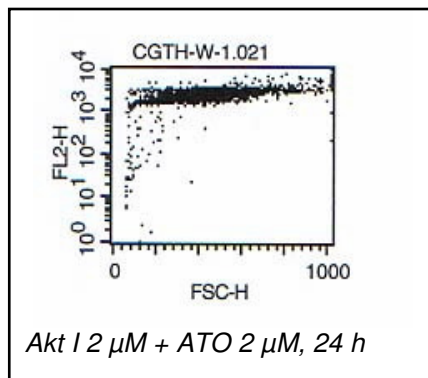
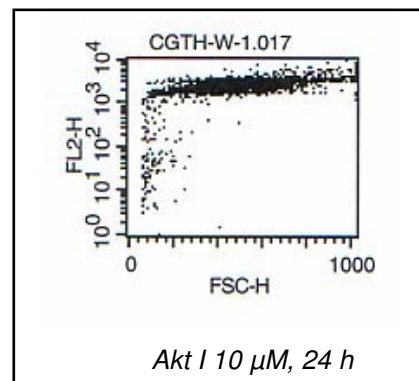
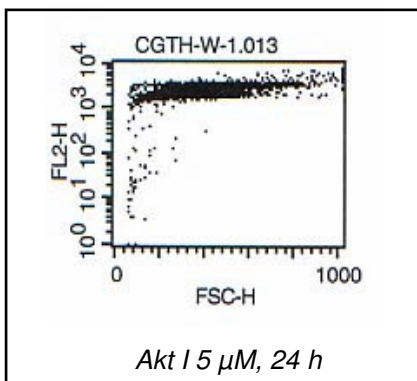
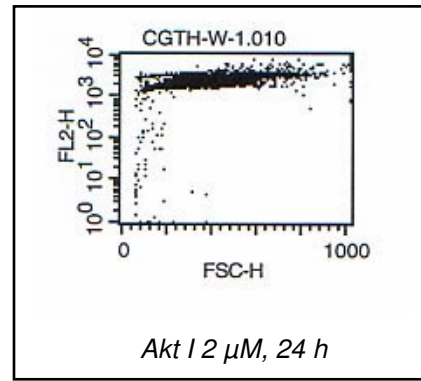
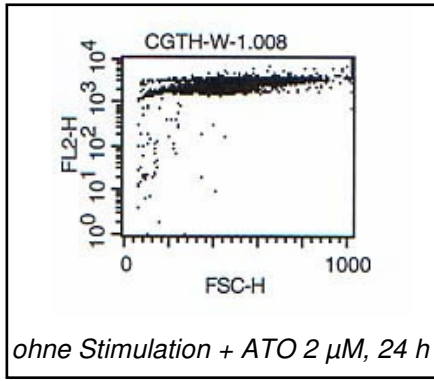
**Abb. 16:** Einfluss von Troglitazon (5 µM), APHA Compound 8 (1 µM), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5 µM), Mevinolin (100 µM), Arsentrioxid (2 µM), all-trans-Retinsäure (1 µM), 13-cis-Retinsäure (1 µM) auf die Apoptoserate von cancerogenen humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Zugabe der Stimulanzien zu den Zellen erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (n=3) und der Fehlerindikator SEM. Als Kontrollgruppen dienen unstimulierte Thyreozyten und Thyreozyten, die mit Staurosporin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und den Lösungsmitteln der Differenzierungsubstanzen stimuliert wurden. (Zugehörige Zahlenwerte in Tabelle 9.1 im Anhang).

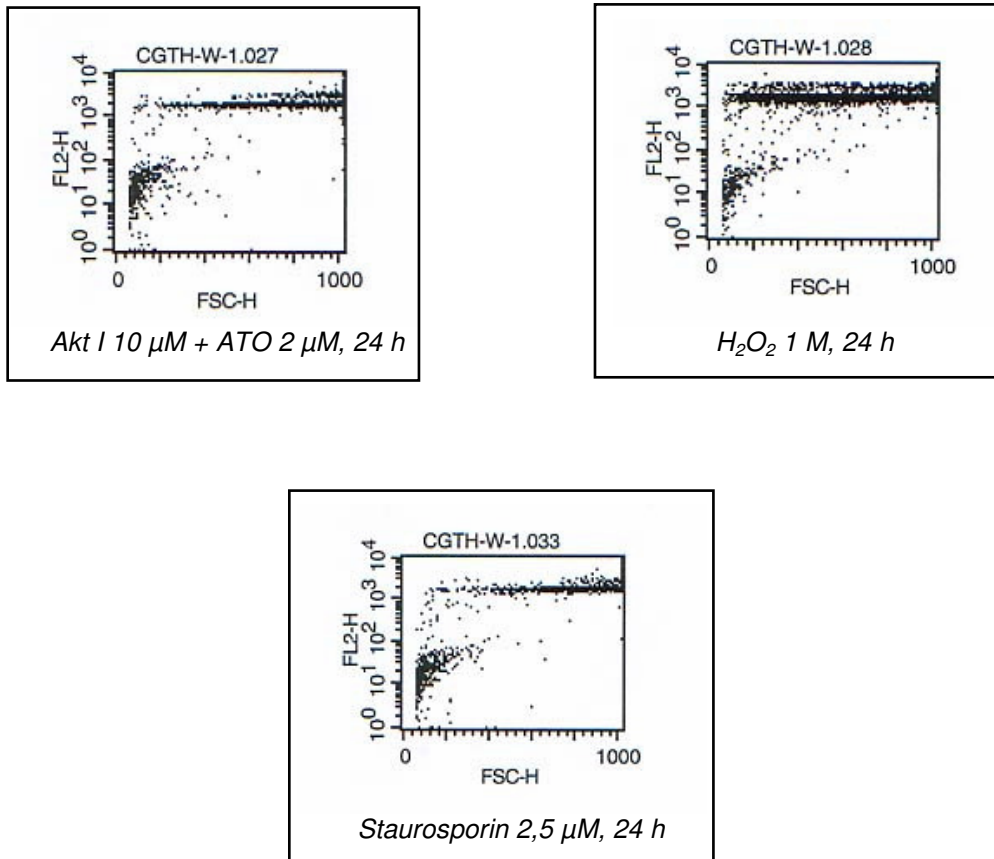
#### 4.3.2 Einfluss von Akt Inhibitor I unterschiedlicher Konzentrationen in Kombination mit Arsentrioxid (ATO) auf die Apoptose maligner humaner Thyreozyten

Die transformierten Schilddrüsenzellen der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit Akt Inhibitor I in den Konzentrationen 2, 5 und 10  $\mu\text{M}$  in Kombination mit 2  $\mu\text{M}$  Arsentrioxid stimuliert. Arsentrioxid wurde erst 2 Stunden nach der Aussaat zu den Zellkulturen gegeben. Nach 24 und 48 Stunden wurde der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers gemessen. Als Negativ-Kontrolle dienten unstimulierte Zellen; als Positiv-Kontrollen dienten die Zellgifte Staurosporin und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . DMSO, das Lösungsmittel von Akt Inhibitor I, war eine weitere Kontrollgruppe.

Nach 24-stündiger Inkubation liegt die Apoptoserate der unbehandelten Thyreozyten (Negativ-Kontrolle) bei 3 %. Die Stimulation mit Staurosporin bewirkt eine Erhöhung auf 12 %, bei  $\text{H}_2\text{O}_2$  liegt sie nach 24 Stunden bei 14 %. Die simultane Stimulation mit Akt Inhibitor I (10  $\mu\text{M}$ ) + Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) führt zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate auf 13 %. Die Kombination aus Akt Inhibitor I (2  $\mu\text{M}$ ) + Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ), sowie die Kombination aus Akt Inhibitor I (5  $\mu\text{M}$ ) + Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) zeigen jeweils eine Apoptoserate von 3 %. Wird der Akt Inhibitor I nicht simultan mit Arsentrioxid eingesetzt, sondern ohne Arsentrioxid zu den Zellen gegeben wird, dann ruft der Akt Inhibitor I eine erniedrigte oder eine nur minimal erhöhte Apoptoserate hervor. Bei 10  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor I liegt die Apoptoserate nach 24 Stunden bei 4 %. Bei 2 und 5  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor I liegt der Wert jeweils bei 2 %. Darstellung der einzelnen Ergebnisse in Abb. 17.



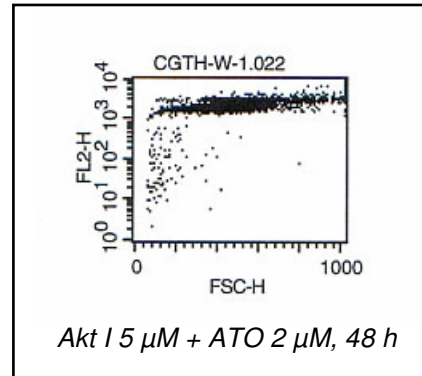
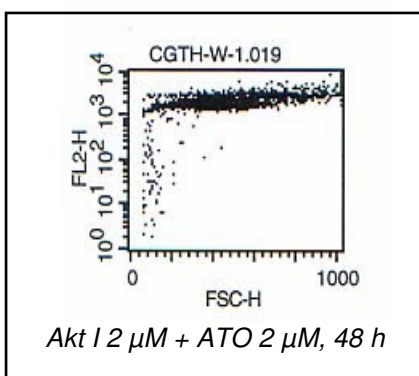
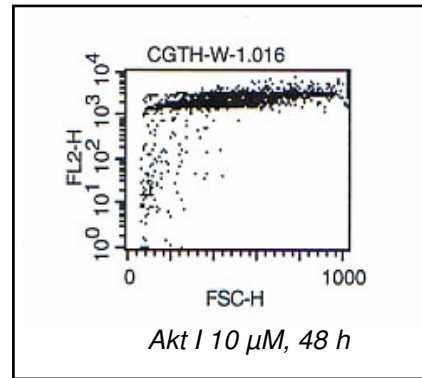
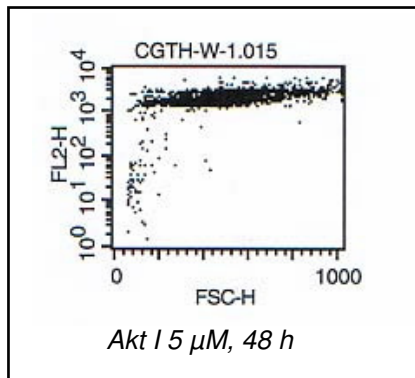
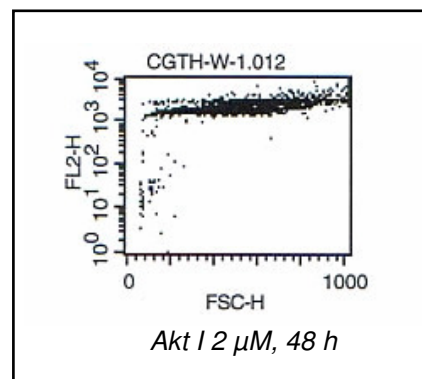
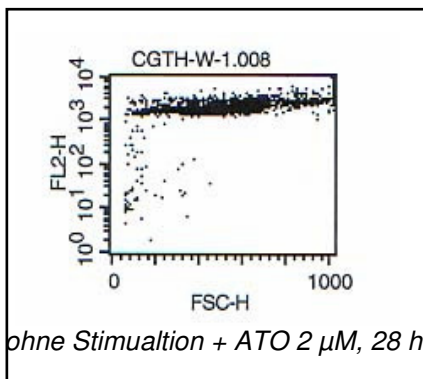
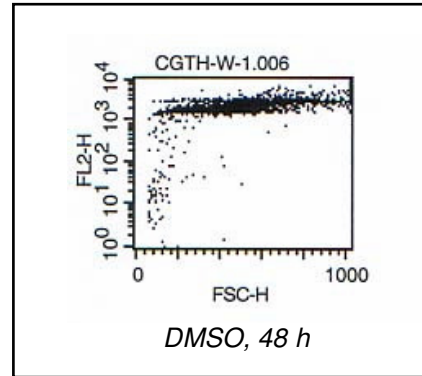
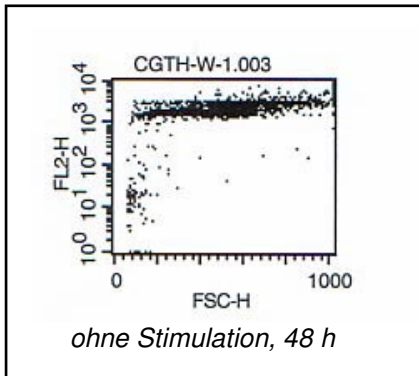


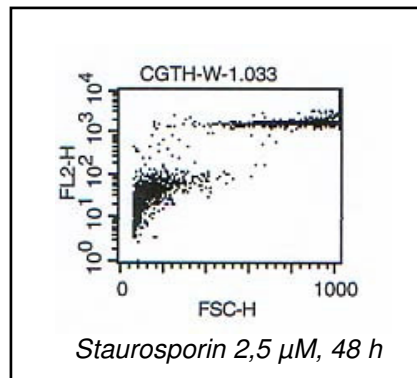
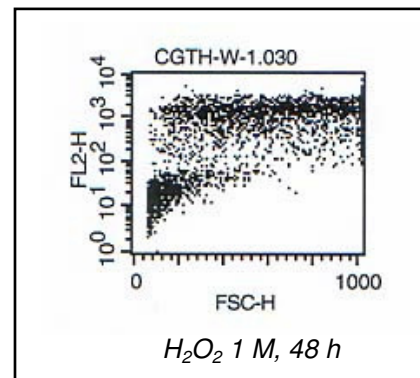
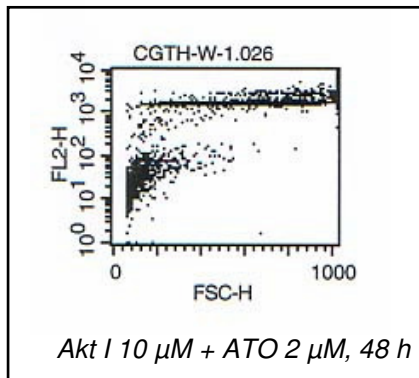


*Abb. 17: Einfluss von Akt Inhibitor I in den Konzentrationen 2, 5 und 10  $\mu$ M in Kombination mit 2  $\mu$ M Arsentrioxid, von DMSO, Staurosporin und  $H_2O_2$  auf die die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Arsentrioxid wurde erst 2 Stunden nach der Zellaussaat zu den Zellen gegeben. Die Apoptoserate wurde nach 24 Stunden gemessen. In den nachfolgenden Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab. 9.3 im Anhang).*

Nach 48-stündiger Inkubationsdauer liegt der Wert an apoptotischen Zellen wie schon nach 24 Stunden bei 3 %.  $H_2O_2$  führt zu einer Zunahme der Apoptoserate auf 50 %; bei Staurosporin liegt der Wert bei 39 %. Durch den Akt Inhibitor I kommt es bei keiner der gewählten Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung oder Erniedrigung der Apoptoserate. Bei 2 und 5  $\mu$ M Akt Inhibitor I liegt der Wert jeweils bei 2 %. Bei 10  $\mu$ M Akt Inhibitor I liegt die Apoptoserate bei 4 %. Bei 5  $\mu$ M Akt Inhibitor I + 2  $\mu$ M Arsentrioxid kommt es zu keiner Veränderung gegenüber der Kontrolle. Bei der simultanen Stimulation mit 2  $\mu$ M Akt Inhibitor I + 2  $\mu$ M Arsentrioxid erniedrigt sich die Anzahl der apoptotischen Zellen minimal (2 %). Die Zugabe der Kombination aus 10  $\mu$ M Akt Inhibitor I + 2  $\mu$ M Arsen führt wiederum zu einer Erhöhung der Anzahl der apoptotischen Zellen (27 %). Darstellung der einzelnen Ergebnisse in Abb. 18.

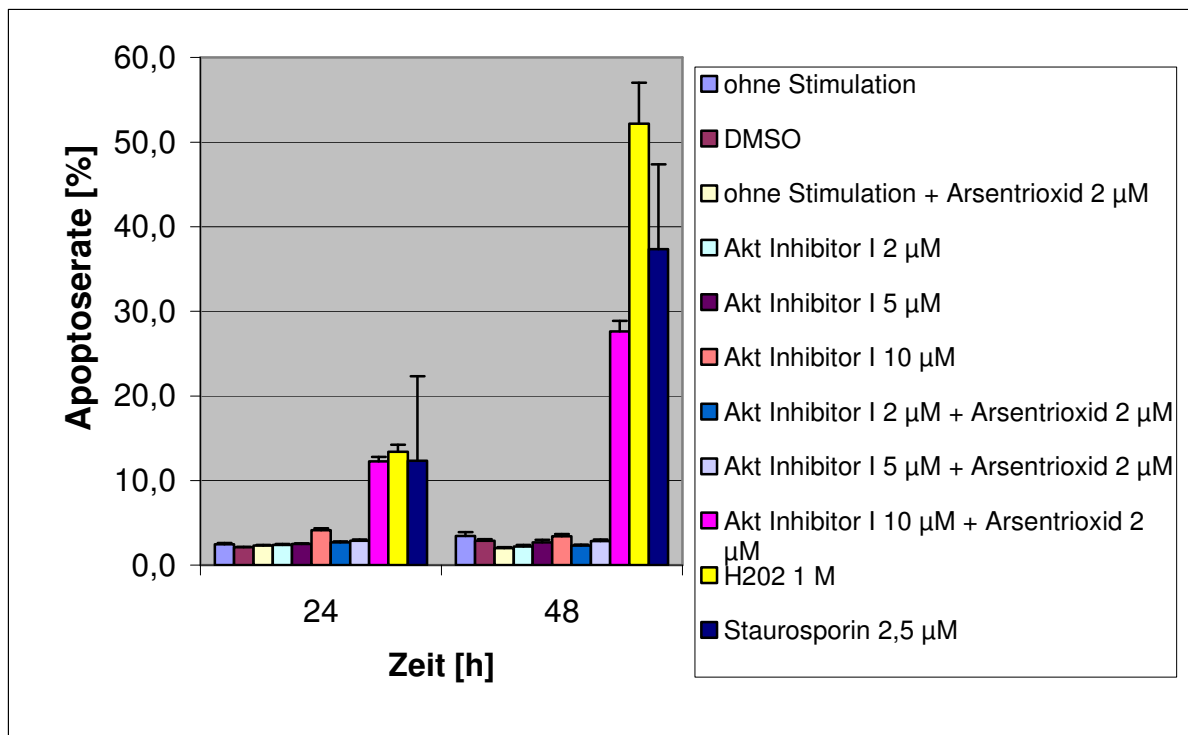






*Abb. 18: Einfluss von Akt Inhibitor I in den Konzentrationen 2, 5 und 10  $\mu$ M in Kombination mit 2  $\mu$ M Arsentrioxid, von DMSO, Staurosporin und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf die Apoptoserate maligner humaner Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Arsentrioxid wurde erst 2 Stunden nach der Zellaussaat zu den Zellen gegeben. Die Apoptoserate wurde nach 48 Stunden gemessen. In den nachfolgenden Auswertungen der FACS-Analyse ist auf der Ordinate die Zellzahl und auf der Abszisse die Fluoreszenzintensität dargestellt. (Zugehörige Zahlenwerte in Tab. 9.3 im Anhang).*





*Abb. 19: Einfluss von 2, 5 und 10 µM Akt Inhibitor I in Kombination mit 2 µM Arsenitrioxid auf die Apoptoserate von cancerogenen humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Die Zugabe des Akt Inhibitor I zu den Zellen erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat. Arsenitrioxid wurde erst 2 Stunden nach der Zellaussaat zu den Zellen gegeben. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte in Prozent (n=3) und der Fehlerindikator SEM. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Thyreozyten und Thyreozyten, die mit Staurosporin, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und dem Lösungsmittel des Akt Inhibitor I stimuliert wurden. (Zugehörige Zahlenwerte in Tabelle 9.3 im Anhang).*

#### 4.4 Immunhistochemische Detektion von NIS und Pendrin in den cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1

##### 4.4.1 Qualitative Auswertung

Zur Detektion von NIS und Pendrin wurden immunhistochemische Untersuchungen unter Verwendung von anti-NIS-3- und anti-PDS-1-Antikörpern durchgeführt. Die Tests erfolgten auf Objektträgern. Eingesetzt wurden die anti-PDS1-Antikörper in Verdünnungen von 1:150. Die anti-NIS-3-Antikörper wurden dagegen in Verdünnungen von 1:200 eingesetzt. Mittels der Avidin-Biotin-Technik erfolgte die Detektion der Immunreaktion, wobei zur Kopplung des enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Komplexes ein biotinylierter Sekundärantikörper diente. Die Umsetzung des chromogenen Substrats zu einem Farbstoff machte eine vorhandene Immunreaktion erkennbar. Eine Färbung der Zellen mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) wurde zur Verdeutlichung der Zellstruktur angefertigt. Dadurch wurden die Zellkerne blau-violett und das Cytoplasma rosa angefärbt.

Die Zellausstriche wurden einer qualitativen Auswertung unterzogen. Die Beurteilung der Präparate wurde nach folgender Einteilung vorgenommen:

<b>Symbol</b>	<b>Bedeutung</b>
0	keine Proteinexpression
(+)	1 - 20 % der Zellen exprimieren NIS-3 bzw. PDS-1
+	21 – 30 % der Zellen exprimieren NIS-3 bzw. PDS-1
++	31 – 60 % der Zellen exprimieren NIS-3 bzw. PDS-1
+++	> 60 % der Zellen exprimieren NIS-3 bzw. PDS-1

#### **4.4.2 Photographische Präsentation**

Im Folgenden werden Bilder von Zellausstrichen mit cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1, welche mit den anti-NIS-3- und PDS-1-Antikörpern immunhistochemisch untersucht wurden, dargestellt. Zu jeder Immunreaktion, bei welcher mindestens 1 - 20% [(+)] der Thyreozyten die zu detektierenden Proteine exprimieren, ist ein repräsentatives Bild gezeigt. Die zur Verdeutlichung der Zellstruktur angefertigte HE-Färbung zeigt Zellen, die Tumorzellmerkmale aufweisen, aber auch nekrotische, apoptotische und sich in Mitose befindliche Zellen.

#### **4.4.3 Einfluss von Retinoiden, Mevinolin und Valproinsäure auf die NIS- und die Pendrin-Expression in cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1**

Die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit all-trans-Retinsäure (1  $\mu$ M), 13-cis-Retinsäure (1  $\mu$ M), all-trans-Retinol (13  $\mu$ M), Mevinolin (100  $\mu$ M) und Valproinsäure (1mM) stimuliert. Nach der Stimulation wurden  $0,45 \times 10^6$  Zellen/50  $\mu$ l Medium dieser Suspension auf einem Objektträger verteilt. Voraussetzung für die immunhistochemische Untersuchung ist die Konservierung der Zellen, damit die Antigene und die strukturellen Details erhalten bleiben. Deshalb folgte ein Konservierungsschritt mit einer 4-prozentigen Paraformaldehyd/PBS-Lösung. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Zellen und

die Lösungsmittel Ethanol und Methanol. Die immunhistochemischen Nachweise mit Antikörpern gegen das darzustellende Antigen wurden nach 24- und 48-stündiger Stimulation vorgenommen. Zur Lokalisierung der Antigene stand eine immunenzymatische Färbetechnik (Ag + 1. Ak + 2. Ak/Biotin + Streptavidin/Enzym + Chromogen-Substrat) zur Verfügung.

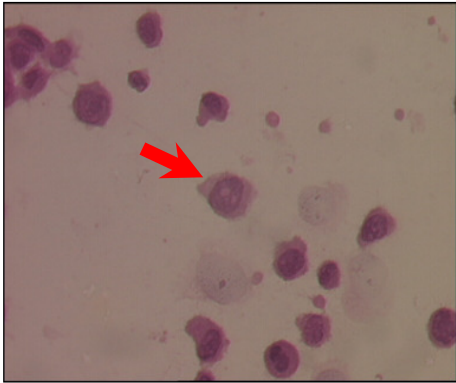


Abb. 1: HE-Färbung. Ohne Stimulation, 24 h; Tumorzellmerkmal (großer Kern mit großen Nucleoli)

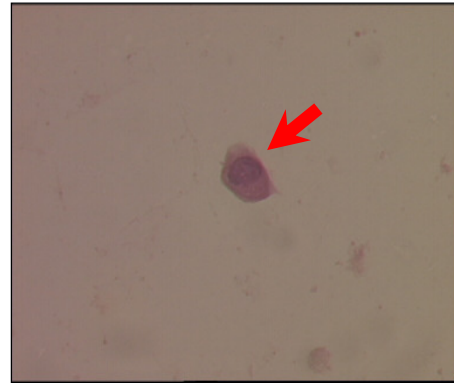


Abb. 2: HE-Färbung. All-trans-Retinsäure 1  $\mu$ M, 24 h; nekrotische Zelle

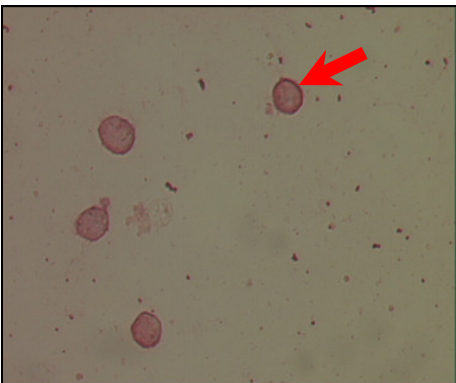


Abb. 3: NIS-Expression (90 %). mit NIS-3-Ak; Mevinolin 100  $\mu$ M, 24 h



Abb. 4: NIS-Expression (60 %). Nachweis mit NIS-3-Ak; Valproinsäure 1 mM, 24 h

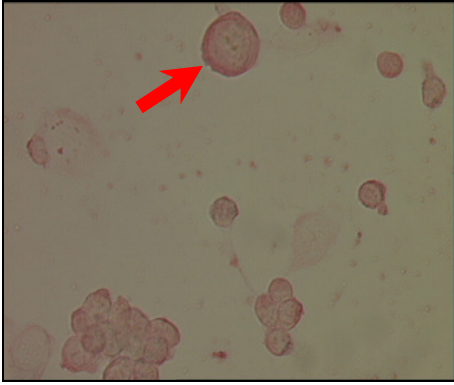


Abb. 5: NIS-Expression (30 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
ohne Stimulation, 48 h

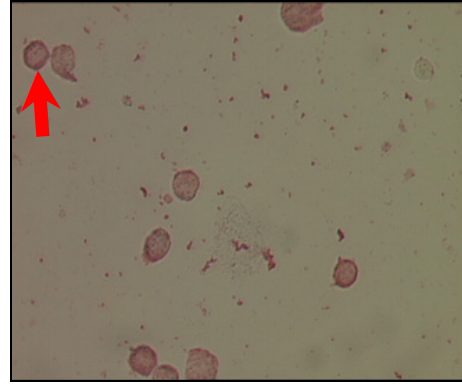


Abb. 6: NIS-Expression (30 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
Ethanol, 48 h

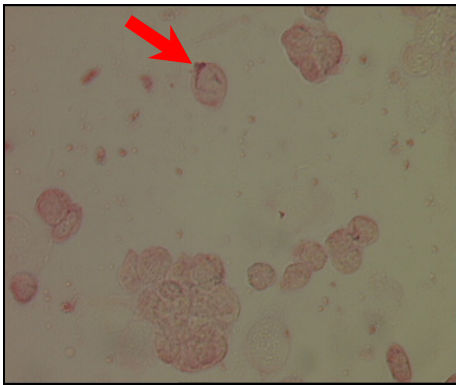


Abb. 7: NIS-Expression (45 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
all-trans-Retinsäure 1 μM, 48 h

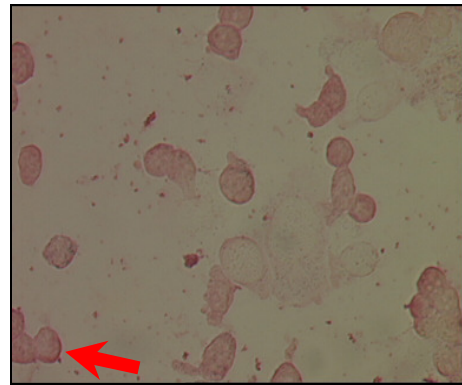


Abb. 8: NIS-Expression (70 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
13-cis-Retinsäure 1 μM, 48 h

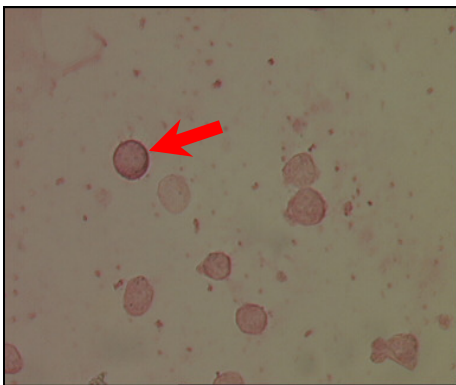


Abb. 9: NIS-Expression (40 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
all-trans-Retinol 13 μM, 48 h

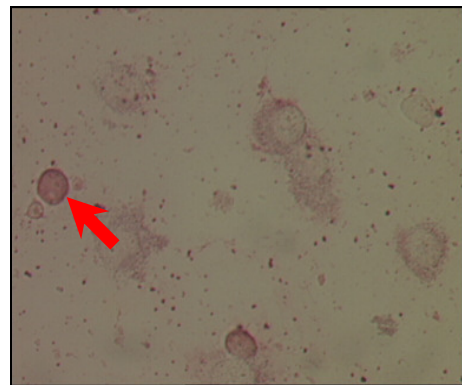


Abb. 10: NIS- Expression (100 %) +  
nekrotische Zellen.  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
Mevinolin 100 μM, 48 h

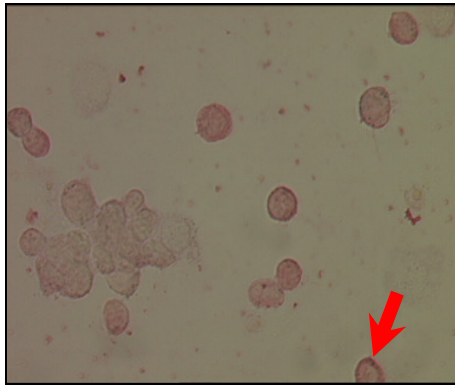


Abb. 11: NIS-Expression (50 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
Valproinsäure 1 mM, 48 h



Abb. 12: Pendrin-Expression (30 %).  
Nachweis mit PDS-1-Ak  
Mevinolin 100  $\mu$ M, 24 h

#### 4.4.3.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die cancerogenen Thyreozyten weisen nach 24- und 48-stündiger Stimulation mit Mevinolin (100  $\mu$ M) eine starke Anfärbung mit dem NIS-3-Antikörper auf [+++].

Auch Valproinsäure (1 mM) bewirkt nach einer Inkubationsdauer von 24 und 48 Stunden eine überdurchschnittlich starke Expression des NIS-3-Antigens. Nach 24 Stunden zeigen 60 % [++] und nach 48 Stunden 50 % [++] der Zellen eine Anfärbung mit dem NIS-3-Antikörper. Durch eine 48-stündige Inkubation der Thyreozyten mit 13-cis-Retinsäure (1  $\mu$ M) wird das NIS-3-Antigen stark [+++] exprimiert. Auch Retinol führt bei den Zellen nach 48 Stunden und bei einer Konzentration von 13  $\mu$ M zu einem positiven Ergebnis von 40 % [++]. Die auch zu den Retinoiden gehörende all-trans-Retinsäure (1  $\mu$ M) bewirkt nach 48 Stunden eine NIS-3-Expression bei 45 % [++] der Zellen. Die Zellen, die mit Ethanol, dem Lösungsmittel von Mevinolin, stimuliert wurden, zeigen genauso wie die unstimulierten Zellen bei 30 % [+] der Zellen das NIS-3-Antigen.

Mevinolin (100  $\mu$ M) bewirkt nach 24 h eine schwache [+] PDS-1-Expression. Die anderen getesteten Differenzierungsubstanzen rufen entweder nur bei weniger als 20 % [(+)] der Zellen eine NIS-3- oder PDS-1-Expression hervor oder bei keiner der Zellen.

#### 4.4.4 Einfluss von Troglitazon, APHA, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin und Arsentrioxid auf die NIS- und die Pendrin-Expression in cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1

Bei folgendem Ansatz wurden die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 24 und 48 Stunden mit Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ), APHA (1  $\mu\text{M}$ ), Apicidin (200 nM), 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5  $\mu\text{M}$ ), Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Zellen und das Lösungsmittel DMSO. Danach wurden die Zellsuspensionen immunhistochemisch auf die Antigene untersucht.



Abb. 13: HE-Färbung. Ohne Stimulation, 24 h; apoptotische Zelle

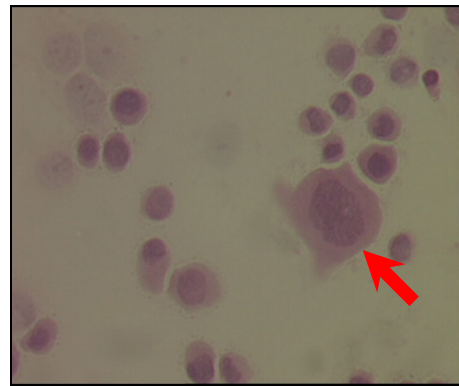


Abb. 14: HE-Färbung. DMSO, 24 h; nekrotische Zelle

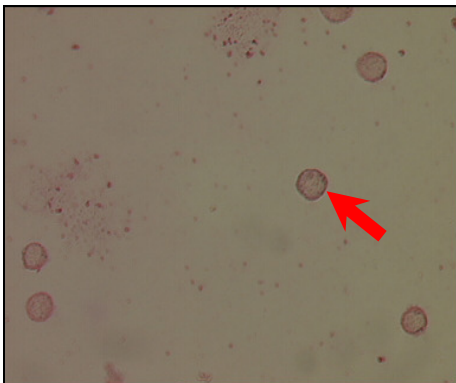


Abb. 15: NIS-Expression (30 %). Nachweis mit NIS-3-Ak; ohne Stimulation, 24 h



Abb. 16: NIS-Expression (40 %). Nachweis mit NIS-3-Ak; APHA 1  $\mu\text{M}$ , 24 h



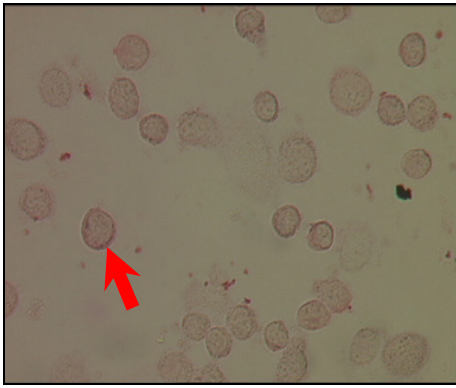


Abb. 17: NIS-Expression (40 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
Apicidin 200 nM, 24 h

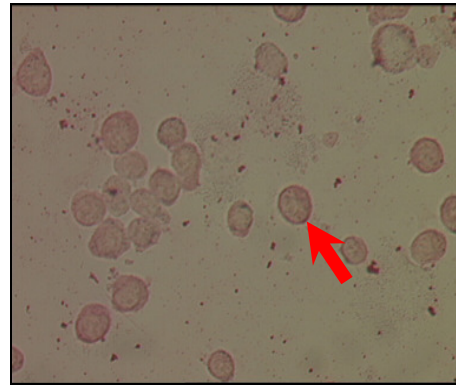


Abb. 18: NIS-Expression (30 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
DMSO, 24 h

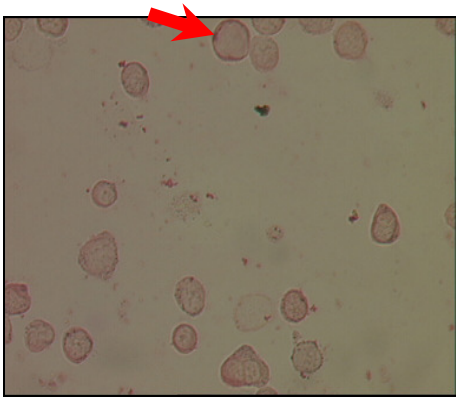


Abb. 19: NIS-Expression (40 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
APHA 1 μM, 48 h

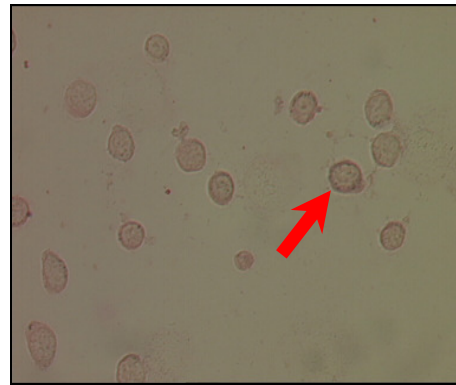


Abb. 20: NIS-3-Expression (30 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
5-Aza-2'-deoxycytidin, 48 h

#### 4.4.4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die transformierten Schilddrüsenzellen weisen durch die Stimulation mit den getesteten Differenzierungssubstanzen nach 24 und nach 48 Stunden keine signifikant erhöhte Pendrin-Expression auf. Die Ergebnisse liegen bei  $\leq 20\%$  [(+)] oder sogar bei 0 %.

Die unstimulierten Zellen zeigen nach 24-stündiger Inkubationszeit gegenüber allen anderen getesteten Stimulanzen die stärkste (50 % [++]) NIS-Expression. Auch unter DMSO, dem Lösungsmittel für Troglitazon, APHA, Apicidin und 5-Aza-2'-deoxycytidin lässt sich nach 48 Stunden bei 30 % [+] der Zellen das NIS-Antigen nachweisen. APHA (1 μM) ruft nach 24 und 48 Stunden bei 40 % [++] der Zellen eine NIS-3-Expression hervor. Ein Nachweis von NIS mit durch dem NIS-3-Antikörper lässt sich nach der 24-stündigen Stimulation mit Apicidin (200 nM) bei 40 % [++] der Thyrozyten nachweisen. 5-Aza-2'-deoxycytidin (0,5 μM) bewirkt nach 48 Stunden

bei 30 % der Zellen eine NIS-Expression. Ansonsten liegen die Ergebnisse bei  $\leq 20$  % [(+)] oder auch bei 0 %.

#### 4.4.5 Einfluss von Akt Inhibitor I und Akt Inhibitor V in Kombination mit 2 $\mu$ M Arsentrioxid auf die NIS- und die Pendrin-Expression in cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1

Nach folgendem Ansatz wurden die transformierten humanen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 24 und 48 Stunden mit Akt Inhibitor I (10  $\mu$ M) und Akt Inhibitor V simultan mit Arsentrioxid (2  $\mu$ M) stimuliert und immunhistochemisch auf die NIS- und Pendrin-Expression untersucht. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Zellen und das Lösungsmittel DMSO. Als weitere Kontrollgruppen dienten die Akt Inhibitoren ohne Zusatz von Arsentrioxid.



Abb. 21: HE-Färbung.  
Ohne Stimulation,  
24 h; Tumorzellmerkmal  
(großer Kern mit großen  
Nukleoli)

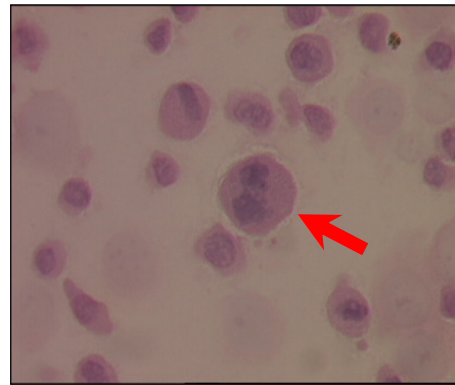


Abb. 22: HE-Färbung.  
Ohne Stimulation, 24 h;  
mitotische Zelle



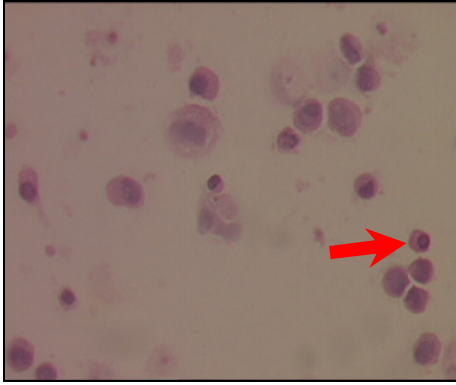


Abb. 23: HE-Färbung.  
Akt V Inhibitor 20  $\mu$ M +  
ATO 2  $\mu$ M, 24 h;  
apoptotische Zellen



Abb. 24: Pendrin-Expression (30 %).  
Nachweis mit PDS-1-Ak;  
Akt I Inhibitor 20  $\mu$ M, 48 h



Abb. 25: Pendrin-Expression (40 %).  
Nachweis mit PDS-1-Ak;  
Akt V Inhibitor 20  $\mu$ M, 48 h

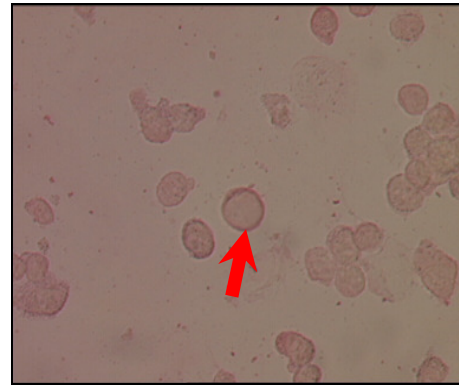


Abb. 26: NIS-Expression (30 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
DMSO, 48 h

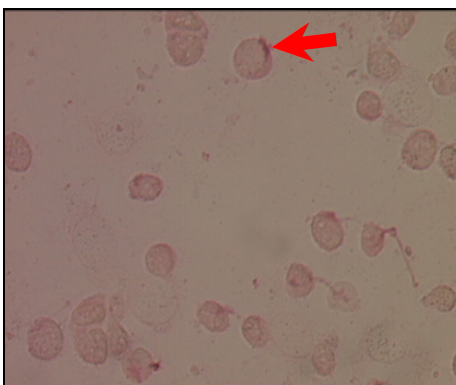


Abb. 27: NIS-Expression (30 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
Akt I Inhibitor 10  $\mu$ M, 48 h



Abb. 28: NIS-Expression (50 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak  
Akt I Inhibitor 10  $\mu$ M +  
ATO 2  $\mu$ M, 48 h

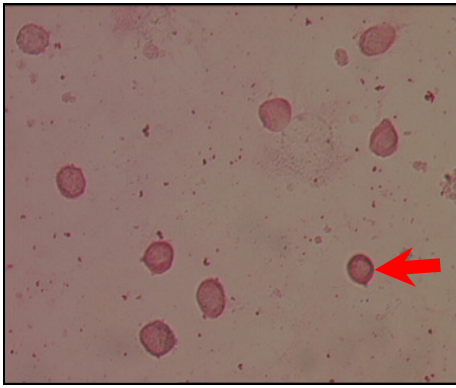


Abb. 29: NIS-Expression (60 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
Akt V Inhibitor 20  $\mu$ M, 48 h

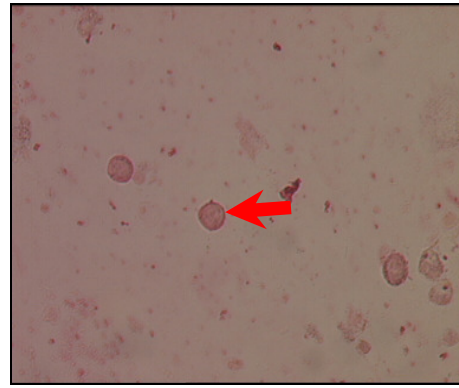


Abb. 30: NIS-Expression (50 %).  
Nachweis mit NIS-3-Ak;  
Akt V Inhibitor 20  $\mu$ M  
+ ATO 2  $\mu$ M, 48 h

#### 4.4.5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Schilddrüsenzellen der Zelllinie CGTH-W-1 weisen durch die 48-stündige Stimulation mit Akt Inhibitor I (10  $\mu$ M) eine Pendrin-Expression bei 30 % [+] der Zellen auf. Bei Akt Inhibitor V (20  $\mu$ M) liegt der Wert nach 48 Stunden bei 40 % [++]. Bei den unstimulierten Zellen sieht man nach 24 Stunden nur bei 5 % [(+)] der Zellen ein positives Ergebnis. Ansonsten ist bei keiner der Differenzierungssubstanzen bzw. der Kombinationen aus zwei Differenzierungssubstanzen eine Anfärbung mit dem PDS-1-Antikörper zu erkennen.

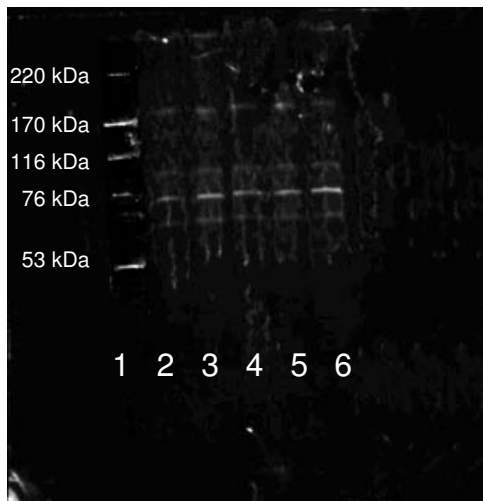
Nach 48 Stunden sieht man unter dem Lösungsmittel DMSO und bei Akt Inhibitor I (10  $\mu$ M) bei 30 % [+] der Thyreozyten eine NIS-Exprimierung. Bei der simultanen Stimulation von Akt Inhibitor I (10  $\mu$ M) + Arsentrioxid (2  $\mu$ M) steigt der Wert auf 50 % [++] an. Akt Inhibitor V (20  $\mu$ M) bewirkt nach 48 Stunden bei 60 % [++] der Zellen eine NIS-Expression. Der Wert geht bei der simultanen Stimulation von Akt Inhibitor V (20  $\mu$ M) + Arsentrioxid (2  $\mu$ M) auf 50 % [++] zurück.

#### **4.5 Semiquantitative Bestimmung von NIS und Pendrin mittels Western Blot**

Die cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 wurden mit Arsentrioxid 2  $\mu\text{M}$ , all-trans-Retinsäure 1  $\mu\text{M}$ , 13-cis-Retinsäure 1  $\mu\text{M}$  und deren Lösungsmittel stimuliert und für 30 Stunden inkubiert. Als Kontrollgruppe dienten unstimulierte Zellen. Anschließend wurden die extrahierten Proteine auf eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker lief ein high molecular marker (HMW, Electrophoresis Calibration Kit) mit. Dieser Proteinstandard enthält die Proteine Myosin (220000 Dalton),  $\alpha_2$ -Macroglobulin (170000 Dalton),  $\beta$ -Galactosidase (116000 Dalton), Transferrin (76000 Dalton) und Glutamat-Dehydrogenase (53000 Dalton). Der zu bestimmende Natrium-Iodid-Symporter hat ein Molekulargewicht von 800000 – 90000 Dalton; das Molekulargewicht von Pendrin liegt bei 85000 Dalton.

Der anschließend mit anti-PDS1 immunmarkierte Blot zeigt keine Bandenbildung bei 85000 Dalton. Auf dem mit anti-NIS-3 immunmarkierten Blot sind unter allen getesteten Stimulanzen einschließlich der Kontrollgruppe Banden zu sehen. Die unstimulierten Zellen zeigen die am schwächsten ausgeprägte Bande. Unter Arsentrioxid ist hinsichtlich der Bandenausprägung kein Unterschied zu den unstimulierten Zellen zu sehen, was bedeutet, dass Arsentrioxid nach 30 Stunden Inkubationszeit keinen stimulierenden Effekt in Bezug auf die NIS-Expression zeigt. All-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure und Methanol bewirken nach 30 Stunden alle dieselbe NIS-Expression, d. h. die Banden sind ungefähr gleich breit. Vergleicht man die Banden von all-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure und Methanol mit der Bande der unstimulierten Zellen, so erkennt man eine leichte Zunahme der NIS-Expression. Die Effekte sind in dem Fall nicht der all-trans-Retinsäure und der 13-cis-Retinsäure zuzuschreiben, sondern ihrem Lösungsmittel Methanol.

### Blot 1 (NIS)



### Blot 2 (Pendrin)



#### Blot 1

- 1: HMW
- 2: ohne Stimulation
- 3: Methanol
- 4: Arsentrioxid 2  $\mu$ M
- 5: All-trans-Retinsäure 1  $\mu$ M
- 6: 13-cis-Retinsäure 1  $\mu$ M

#### Blot 2

- 1: HMW
- 2: ohne Stimulation
- 3: Methanol
- 4: Arsentrioxid 2  $\mu$ M
- 5: All-trans-Retinsäure 1  $\mu$ M
- 6: 13-cis-Retinsäure 1  $\mu$ M

Abb. 31: Einfluss von Arsentrioxid, all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure auf die Proteine NIS und Pendrin bei den humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Zugabe der Stimulanzen bereits beim Aussäen. Dargestellt sind Blots einer SDS-Gelelektrophorese nach einer Inkubationszeit der Thyreozyten von 30 Stunden. Als Marker liefen in den Blots 1 und 2 HMW mit.

#### 4.6 Kurze Übersicht über das Wirkprofil der untersuchten Substanzen

In Tab. 1 sind die wichtigsten Wirkungen der untersuchten Substanzen auf die Zelllinie CGTH-W-1 dargestellt.

Tab. 1: Wirkung verschiedener Substanzen auf die Zelllinie CGTH-W-1, wenn diese bei der Zellaussaat dem Medium zugefügt werden.

<b>Substanz</b>	<b>Iodidaufnahme</b>	<b>Thymidinaufnahme</b>	<b>Apoptoserate</b>
all-trans-Retinsäure	verstärkt	vermindert	
13-cis-Retinsäure	verstärkt		erhöht
5-Aza-2'-deoxycytidin		vermindert	
Troglitazon	verstärkt	vermindert	
APHA Compound 8	verstärkt		
Apicidin			
Mevinolin	verstärkt	vermindert	erhöht
Valproinsäure	verstärkt	vermindert	
Arsentrioxid	verstärkt		
Akt Inhibitor I/Arsentrioxid	verstärkt		erhöht
Akt Inhibitor V/Arsentrioxid	verstärkt		

## 5. Diskussion

Transformierte Schilddrüsenzellen haben die Fähigkeit, Iodid aufzunehmen, weitgehend verloren. Nichttransformierte Zellen, welche dazu noch fähig sind, nehmen das Iodid-Anion über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS), der an der basolateralen Zellmembran lokalisiert ist, auf. TSH steigert die Iodid-Aufnahme in die Thyreozyten. Das Anion  $\text{ClO}_4^-$  zum Beispiel hemmt die Aufnahme von  $\text{I}^-$ . Das sich nun in der Zelle befindliche Iodid wird durch den Halogenid-Transporter Pendrin, der sich an der apikalen Zellmembran befindet, in das Follikellumen abgegeben. Das in den Thyreozyten synthetisierte Thyreoglobulin wird ebenfalls in das Follikellumen transportiert; für diesen Transport sind jedoch sekretorische Vesikel verantwortlich. Für die Synthese der Hormone Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3) muss Iodid vorher an der apikalen Membran oxidiert werden, um danach auf zwei Tyrosinreste des Thyreoglobulins übertragen werden zu können. Dadurch entstehen Monoiod- und Diiodtyrosin, zwei hormonell inaktive Komponenten. Triiodthyronin (T3) und Tetraiodthyronin (T4) werden nun aus der Verbindung zweier Tyrosylreste hergestellt. Dieser Vorgang kann nun in transformiertem Schilddrüsengewebe in dieser Art nicht mehr stattfinden, da sich bei 30-40 % aller Schilddrüsenkarzinome keine oder nur eine geringe NIS-Expression findet (Köhrle et al., 1998). Der Natrium-Iodid-Symporter bildet einerseits auch die Grundlage für die Schilddrüsen-Diagnostik in der Form der Schilddrüsenszintigraphie, andererseits auch die Grundlage für die therapeutische Anwendung von Radioiod bei der Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen und ihrer Metastasen (Spitzweg, 2007). Aufgrund der gestörten Iodidaufnahme in transformierte Zellen wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dabei eine Redifferenzierung des NIS-Proteins mittels Substanzen wie Troglitazon, APHA Compound 8, Apicidin, 5-Aza-2'-deoxycytidin, Mevinolin, 13-cis-Retinsäure, all-trans-Retinsäure, Arsentrioxid und Akt Inhibitor I und V in Kombination mit Arsentrioxid erfolgreich sind. Als transformierte Schilddrüsenzellen wurde die Zelllinie CGTH-W-1 eingesetzt. Kontrolliert wurde eine verstärkte NIS-Aktivität und/oder NIS-Expression indirekt über die Messung der  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation in diese Thyreozyten und die Expression direkt über den immunhistochemischen Nachweis und die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Western Blot). Die Pendrin-Expression wurde immunhistochemisch und über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfasst.

Bei jeder Krebstherapie spielt das Wachstum bzw. der Rückgang der Zahl der transformierten Zellen eine entscheidende Rolle. Wichtige Parameter hierfür sind unter anderem die Thymidinaufnahme, welche Voraussetzung für das Zellwachstum ist und die Apoptose, der programmierte Zelltod. Die Apoptose ist ein physiologischer Prozess und spielt eine bedeutende Rolle für die Gewebshomöostase. Unter pathologischen Bedingungen kann jedoch eine Dysregulation dieses Vorgangs auftreten. So kann ihre Dysregulation eine bedeutende Rolle bei der Atherosklerose, sowie bei chronisch entzündlichen und degenerativen Krankheiten, aber z. B. auch beim Myokardinfarkt haben (Hristov, 2003). Eine besondere Bedeutung erzielt die dysregulierte Apoptose aber bei der Tumorbildung und der Tumorprogression.

Der Nachweis der  $^3\text{H}$ -Thymidin-Aufnahme ist allerdings kein Beweis für den Einbau in die DNA, Thymidin kann nämlich auch im Zytosol verweilen. Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme ist folglich als Beweis für das Zellwachstum nicht spezifisch genug. Die Apoptose wurde mit Hilfe der FACS-Analyse anhand des Anteils hypodiploider Kerne bestimmt

### **5.1 Einfluss unterschiedlicher differenzierungsaktiver Substanzen auf die Apoptose, die Proliferation und den Iodidstoffwechsel transformierter Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1**

#### a) Retinoide

Chirurgische Intervention und Radioiodtherapie sind die bislang einzigen verfügbaren Maßnahmen mit erwiesener Wirksamkeit und prognostischer Relevanz für den Patienten mit Schilddrüsenmalignomen (Schmutzler et al., 2002). Retinoide können in vivo und in vitro durch eine Redifferenzierung der Thyreozyten die Fähigkeit zur Aufnahme von Iodid wieder herstellen (Schmutzler et al., 2002). Bei unseren In-vitro-Untersuchungen konnte über die gesteigerte Radioiodaufnahme nachgewiesen werden, dass 13-cis-Retinsäure während einer 30-stündigen Stimulation einen redifferenzierenden Effekt auf die Schilddrüsenkarzinomzellen der Zelllinie CGTH-W-1 besitzt. Die 13-cis-Retinsäure wurde hierbei zum Zeitpunkt der Zellaussaat zu den Zellen gegeben. Zugleich induziert 13-cis-Retinsäure auch einen gesteigerten programmierten Zelltod (Apoptose). All-trans-Retinsäure führt bei unseren transformierten Zellen zwischen 6 und 48 Stunden Stimulation ebenfalls zu einer gesteigerten  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation. Die all-trans-Retinsäure wurde nicht zum Zeitpunkt der Zellaussaat, sondern erst 23 Stunden nach der Aussaat den Zellen

zugegeben. Nach 48 Stunden wurde auch eine erhöhte <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in die Zellen nachgewiesen. Werden die Zellen jedoch mit der all-trans-Retinsäure vorinkubiert (7 oder 14 Tage), dann erst in frischem Medium ausgesät und nochmals 6 Stunden mit all-trans-Retinsäure inkubiert, dann wirkt sie hemmend auf die Zellproliferation.

Auch bei Patienten mit einer Promyelozyten-Leukämie sind Therapieerfolge mit der all-trans-Retinsäure erzielt worden (Köhrle et al., 1999). Der Wirkstoff scheint die Ausdifferenzierung der Tumorzellen zu fördern (Köhrle et al., 1999). All-trans-Retinsäure zeigt auch in einer Kombinationstherapie zusammen mit Arsentrioxid bedeutende Erfolge. In einer Studie von Zhu Chen et al. (2004) wurden 61 neu diagnostizierte APL-Patienten (APL: Unterart der akuten myeloischen Leukämie) randomisiert drei Behandlungsgruppen (nur all-trans-Retinsäure, nur Arsentrioxid oder Kombination beider Medikamente) zugewiesen. Die Raten völliger Remission waren in allen Gruppen hoch (> 90 %), aber die Leukämiezellbelastung zum Zeitpunkt der völligen Remission ging in der Kombinationstherapiegruppe im Vergleich zu den Monotherapiegruppen signifikant zurück. Retinoide zeigen in vivo aber auch gravierende Nebenwirkungen. Sie sind teratogen und neurotoxisch. All-trans-Retinsäure erwies sich in allen bisher untersuchten Spezies als teratogen (Nau, 1992). Studien zur Teratogenität von 13-cis-Retinsäure haben ergeben, dass 13-cis-Retinsäure bei Nagern ein wesentlich schwächeres Teratogen ist als all-trans-Retinsäure. Die geringste teratogene Dosis war bei Hamstern ca. 4-fach höher als die entsprechende Dosis all-trans-Retinsäure (Willhite et al., 1989).

#### b) Mevinolin

Mevinolin gehört zu den HMG-CoA-Reduktase-Hemmern, den Statinen. Der Haupteffekt der Statine besteht in der Inhibierung des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese (der 3-Hydroxy, 3-Methylgluaryl Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase). Durch eine Hochregulierung der hepatischen LDL-Rezeptoren kommt es zu einer Senkung des LDL-Cholesterins im Blut (Goldstein et al., 1990). Die Statine besitzen zusätzlich auch noch pleiotrope oder gefäßwandgerichtete Eigenschaften. Im Folgenden werden einige dieser Eigenschaften aufgeführt:

- Antientzündliche Wirkungen (Crisby et al., 2001; Ortego et al., 1999; Strandberget et al., 1999)
- Antiproliferative Wirkung (Funkumoto et al., 2001; Laufs et al., 1998; Sindermann et al., 2000; Yasunari et al., 2001)



- Antithrombotische Wirkung (z.B. Inhibierung der Expression von Tissue Faktor und von Plasminogen Aktivator Inhibitor in Endothelzellen) (Eto et al., 2002; Libby et al., 2003; Seljeflot et al., 2002; Wiesbauer et al., 2002)

In unseren Untersuchungen an der Zelllinie CGTH-W-1 konnte eine antiproliferative Wirkung von Mevinolin bestätigt werden. Die transformierten Thyreozyten wurden dabei ab dem Zeitpunkt der Zellaussaat mit dem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer behandelt, 24 und 30 Stunden später wurde eine verminderte Thymidinaufnahmerate bestimmt. Gleichzeitig wird das unbegrenzte (tumoröse) Wachstum der entarteten CGTH-W-1-Zellen, welches auf ein defektes Apoptoseprogramm zurückzuführen ist, durch Mevinolin unterbunden, indem eine Apoptose induziert wird. Bei Untersuchungen bei denen Mevinolin erst 23 Stunden nach der Zellaussaat zu den Thyreozyten gegeben wird, wird auch die Iodidaufnahme stimuliert. Die Erfolgsaussichten einer Radioiodtherapie erhöhen sich somit beträchtlich.

#### c) Troglitazon

Troglitazon ist ein Antidiabetikum, das zur Gruppe der Insulinsensitizern gehört. Bei den Patienten mit Typ-2-Diabetes kann Insulin seine Wirkung an den Zellen nicht mehr richtig entfalten. Die Glitazone greifen genau dort an. Sie verbessern die Insulinempfindlichkeit indem sie die Insulinresistenz verringern. Das Medikament war bereits viele Jahre zugelassen, ist aber vor einiger Zeit vom Markt genommen worden, da es in wenigen Fällen Nebenwirkungen auf die Leber hatte (Roth, 2006). Troglitazon kann bestimmte Tumorzellen für den Zelltod durch den Tumor necrosis related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sensibilisieren (Roth et al., 2006). TRAIL bindet an auf der Zelloberfläche befindliche Rezeptoren und leitet auf diese Weise den programmierten Zelltod ein (Roth et al., 2006). Troglitazon ist im Hinblick auf eine Therapie von Gliomen und Neuroblastomen vielversprechend. Bei In-vitro-Untersuchungen mit den transformierten Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 konnten allerdings eine gesteigerte Induktion der Apoptoserate erzielt werden. Wurden die Thyreozyten jedoch 7 Tage mit Troglitazon vorinkubiert, und dann nochmals 48 Stunden in Troglitazon inkubiert, dann stimulierte Troglitazon die Iodidaufnahme in die entarteten Thyreozyten. Die Thymidininkorporation vermindert sich, wenn die Zellen 7 Tage in Troglitazon vorinkubiert und noch zusätzlich 6 oder 24 Stunden mit Troglitazon stimuliert werden.

#### d) Akt-Kinase-Inhibitoren

Die Akt-Kinase/PKB ist das Schlüsselenzym vieler intrazellulärer Signalwege. Akt ist auch mitinvolviert in die Entstehung von Krebs. Seine Aktivierung greift inhibitorisch in die apoptotische Signaltransduktion ein und führt gleichzeitig zur Proliferation von Zellen (Künstle, 2005). Diese Eigenschaften machen die Kinase außerordentlich attraktiv als Zielmolekül für therapeutische Interventionsstrategien, und zwar zum einen durch Inhibitoren gegen malignes Wachstum, zum anderen zur Unterstützung regenerativer Prozesse (Künstle, 2005). In unseren Untersuchungen wurden die Wirkungen zweier Akt Inhibitoren auf das maligne Wachstum der Zelllinie CGTH-W-1 untersucht. Hierbei handelte es sich um den Akt Inhibitor I und den Akt Inhibitor V (Triciribine). Es wurde vor allem untersucht, wie die Akt Inhibitoren in Kombination mit Arsentrioxid wirken. Wurden die cancerogenen Zellen 24 oder 48 Stunden simultan mit 10 µM Akt Inhibitor I und 2 µM Arsentrioxid stimuliert, kam es zu einer außerordentlich hohen Iodidinkorporation und gleichzeitig zu einer signifikant erhöhten Induktion der Apoptose gegenüber der Kontrollgruppe. Nach 24 Stunden ist die Apoptoserate 10 % höher und nach 48 Stunden 24 % höher als bei den unstimulierten Zellen. An der Proliferation der malignen Thyreozyten hat sich durch die Stimulation mit Akt Inhibitor I und Arsentrioxid nichts geändert.

Der Akt Inhibitor V (Triciribine) bewirkte in allen Konzentrationen (0,1, 1, 5, 10 und 20 µM) nach 30 Stunden Inkubation eine signifikant erhöhte Iodidaufnahme und somit eine gesteigerte NIS-Expression und/oder gesteigerter NIS-Aktivität.

#### e) Arsentrioxid

Arsentrioxid kann bei Leukämiezellen eine Apoptose induzieren. Bei der Promyelozytenleukämie, die durch eine chromosomale Translokation gekennzeichnet ist, wird ein Protein gebildet, das die Reifung der Vorläuferzellen der weißen Blutkörperchen beeinträchtigt (Mutschler, 2001). Arsentrioxid bewirkt eine Schädigung dieses Proteins. Arsentrioxid hat als Medikament aber auch eine Reihe von Nebenwirkungen wie die Induktion einer Hyperglykämie, Hypokaliämie, Neutropenie und eines erhöhten Alaninaminotransferase-Plasmaspiegels. Bei unserer Zelllinie CGTH-W-1 bewirkt Arsentrioxid allein (also nicht in Kombination mit Akt Inhibitor), nachdem es 23 Stunden nach der Aussaat zu den transformierten Thyreozyten gegeben wurde, nach 20, 24, 30, 44 und 48-stündiger Inkubation eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Iodidaufnahmerate. Bei demselben Versuch war nach 48 Stunden eine gesteigerte Thymidinaufnahme zu beobachten.

In einem weiteren Versuchsansatz mit veränderten Bedingungen, kam es unter Arsentrioxid nach 6 und 24 Stunden zu einer signifikanten Abnahme der Thymidinaufnahme. Die Zellen wurden hierbei 7 Tage mit Arsentrioxid vorinkubiert, dann wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, ausgesät und nochmals 6 bzw. 24 Stunden mit Arsentrioxid stimuliert. Hier war die Iodidaufnahme erst nach 48 Stunden gegenüber der Kontrolle erhöht, während nach 6 und 24 Stunden kein eindeutiger Effekt erkennbar war.

#### f) Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Histon-Deacetylase-Inhibitoren zeigen Antitumoreffekte. Die Behandlung einer Vielzahl von Tumorzellen mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren führt zur Apoptose (Weidle et al., 2000; Lipinski et al., 1999; Ruefli et al., 2001; Kwon et al., 2001; Vrana et al., 1999). Hierbei werden die intrinsische und die extrinsische Apoptose-Signalkaskade aktiviert. Apicidin und APHA beispielsweise, zwei Histon-Deacetylase-Inhibitoren, stimulieren die Expression des Todesrezeptors CD95.

Die Gabe von Histon-Deacetylase-Inhibitoren führt zu einer Zunahme der Expression von pro-apoptotischen Bcl2-Proteinen und einer Abnahme der anti-apoptotischen Vertreter, wie z. B. E2F-1, E2F-4, HDAC1, p53 (Kramer et al., 2001; Suzuki et al., 2000; Cao et al. 2001).

Valproinsäure, ein Histon-Deacetylase-Hemmer, wird klinisch als Antiepileptikum eingesetzt. Sie hat nach neuesten Erkenntnissen auch eine Wirkung auf Krebszellen. Aus der Tumorforschung ist bekannt, dass in vielen Arten von Krebszellen die Expression zahlreicher Gene fehlreguliert ist. In einigen unter ihnen bewirkt Valproinsäure durch Hemmung der Histon-Deacetylase eine Genaktivierung und kann so das Zellwachstum verzögern und sogar Krebszellen abtöten (Göttlicher, 2006). Valproinsäure hemmt den so genannten nukleären Ko-Repressor, ein Regulator der Transkription. Sie bindet direkt an die Ko-Repressor-assoziierten Histondeacetylasen und unterdrückt deren Funktion. Histondeacetylasen entfernen Acetylgruppen von den Histonproteinen, die im Zellkern das Chromatin organisieren. Bei unserer untersuchten Zelllinie CGTH-W-1 führen die getesteten Histon-Deacetylase-Hemmer Valproinsäure, Apicidin und APHA Compound 8 nicht zur Induktion von Apoptose. Somit wird das Abschalten von Genaktivitäten unterdrückt. Bei unseren cancerogenen Schilddrüsenzellen (CGTH-W-1) induziert Valproinsäure eine Wiederaufnahme von Iodid durch Reexpression des Natrium-Iodid-Symporters, wenn die Zellen ab dem Zeitpunkt der Zellaussaat mit Valproinsäure stimuliert

werden. Nach 30, 43 und 48 Stunden Inkubation konnte ein positiver Effekt erzielt werden. Valproinsäure hat aber nicht nur die Fähigkeit bei der untersuchten Zelllinie die NIS-Expression zu induzieren und damit die Iodidaufnahme zu verstärken, sondern unter den gleichen Bedingungen auch die Thymidinaufnahme zu hemmen. Apicidin besitzt keinerlei Wirkung auf die maligne Zelllinie. APHA Compound 8 hingegen bewirkt bei einer Vorinkubation von 7 Tagen und zusätzlicher Inkubation von 6 Stunden nach Mediumwechsel und Zellaussaat eine signifikant gesteigerte Radioiodaufnahme.

#### h) DNA-Methyltransferase-Hemmer

Durch Deletion, Mutation oder Hypermethylierung können Gene inaktiviert werden. Es wurde gezeigt, dass Gene, die durch Hypermethylierung inaktiviert waren, durch das Cytidin-Analog 5-Aza-2'-deoxycytidin wieder reaktiviert werden können (Esteller et al., 2002). Bereits im Jahr 1968 wurde in Untersuchungen eine Korrelation zwischen inhibierter DNA-Methylierung und einem antileukämischen Effekt gezeigt (Sorm et al., 1968). Es können demnach entdifferenzierte Zellen einen kontrollierten Zellzyklus erreichen, wenn Gene, die durch 5-Aza-2'-deoxycytidin reaktiviert werden, die Funktion von Tumorsuppressorgenen aufweisen. 5-Aza-2'-deoxycytidin ist aufgrund unserer Untersuchungen auch dazu fähig, in die Proliferation der Schilddrüsenkarzinomzelllinie CGTH-W-1 einzugreifen. Nach einer 7-tägigen Vorinkubation der Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin, anschließender Aussaat und nochmaliger Inkubation (6 bzw. 24 Stunden) mit der Stimulans, kam es bei unseren Zellen zu einer verminderten Thymidinaufnahmerate. 5-Aza-2'-deoxycytidin besitzt somit Antitumoreffekte.

## **5.2 Einfluss verschiedener differenzierungsaktiver Substanzen auf die Protein-Expression von NIS und PDS**

Mit Hilfe der Immunhistochemie lässt sich überprüfen, wie unterschiedliche Differenzierungssubstanzen die Expression bestimmter Antigene beeinflussen. In unserem Fall wurden Proteine nachgewiesen, die für den Transport von Iodid in die Thyreozyten (NIS) und von dort aus in das Follikellumen (Pendrin) zuständig sind. Hierzu wurden spezielle Antikörper (anti-NIS-3 und anti-PDS-1) verwendet. Aufgrund der wichtigen Rolle des NIS in der Physiologie der Schilddrüse haben viele Autoren die Hypothese aufgestellt, dass eine Veränderung der NIS-Expression bzw. seiner Funktion infolge von Mutationen Ursache eines breiten Spektrums an

Schilddrüsenerkrankungen sein könnte (Pession, 2001). Schon vor der Klonierung des hNIS wurden 37 Fälle von Hypothyreose (aus 22 Familien) einem Defekt in der Iodidaufnahme zugeschrieben (Matsuda et al., 1997; Wolff et al.). Nach der Klonierung des humanen NIS konnten 6 unterschiedliche Mutationen der Keimbahn identifiziert werden, die zu einer gestörten Iodidaufnahme führen (Fujiwara H. et al., 1997; Kosugi et al., 1998; Matsuda et al., 1997; Pohlenz et al., 1997; Pohlenz et al., 1998). In nicht verwandten Familien wurden Substitutionen von einem einzelnen Nukleotid (T354P) innerhalb der neunten transmembranen Domäne gefunden (Fujiwara et al., 1997; Fujiwara et al., 1998): an dieser Stelle führt folglich eine Mutation zum Funktionsverlust.

Ohne die Expression eines funktionsfähigen NIS ist die therapeutische Angehörbarkeit von Schilddrüsenkarzinomen mit Hilfe der Radioiodtherapie unmöglich. Der immunhistochemische Antigennachweis von NIS und Pendrin mittels NIS-3- oder PDS-1-Antikörpern wurde nach 24- und 48-stündiger Inkubation der Zellen mit den Differenzierungssubstanzen durchgeführt. Da die NIS-Expression in den Thyreozyten eine Voraussetzung für die  $^{125}\text{I}$ -Iodidinkorporation darstellt, können beide Parameter miteinander korreliert werden sofern die Zellzahl unter Behandlung konstant bleibt. Die Expression von NIS-Protein nahm durch die Stimulation mit Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ) stark zu. Nach 24 Stunden Inkubation kam es bei 90 % und nach 48 Stunden kam es sogar bei 100 % der Zellen zu einer Anfärbung mit dem NIS-3-Antikörper. Diese Ergebnisse korrelieren aber nicht mit der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in die Zellen unter der Behandlung mit diesem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, zumal eine signifikant erhöhte  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme ausbleibt. Eine plausible Erklärung hierfür ist, dass der Thymidineinbau unter Mevinolin abfällt. Es ist somit davon auszugehen, dass sich die Zellzahl verringert hat. Nach einer 24- und 48-stündigen Behandlung der transformierten Zellen mit 1 mM Valproinsäure ist dagegen zu erkennen, dass die erhöhte NIS-Expression auch zu einer signifikant stärkeren Iodidaufnahmerate gegenüber der Kontrolle führt. Unter 13-cis-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) lässt sich ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen der NIS-Expression und der Iodidaufnahmerate feststellen. 70 % der Zellen, die mit 13-cis-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) behandelt wurden, zeigen nach 48 Stunden eine Anfärbung mit anti-NIS-3. Unter all-trans-Retinsäure (1  $\mu\text{M}$ ) ist nach 48 Stunden gegenüber den unstimulierten Zellen (NIS-Expression bei 30 % der Zellen) ebenfalls ein Anstieg der NIS-Protein-Expression zu erkennen. Dieses Ergebnis korreliert mit der  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in die Thyreozyten.

Nach der simultanen Inkubation der Zellen mit Akt Inhibitor I (10  $\mu\text{M}$ ) und Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) konnte nach 48 Stunden ein Anstieg der NIS-Protein-Expression gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. 50 % der Zellen exprimierten das NIS-Protein, wohingegen der Anteil der NIS-exprimierenden Zellen unter der Kontrollgruppe (unstimulierte Zellen) bei 0 % lag. Dieses Ergebnis wird durch die Messung des Iodid-Uptakes bestätigt. Der Akt Inhibitor V (20  $\mu\text{M}$ ) ruft nach 48-stündiger Inkubationzeit bei 60 % der Zellen eine Expression des Natrium-Iodid-Symporters hervor. Es ist davon auszugehen, dass sich unter diesen Bedingungen die Zellzahl nach 48 Stunden verringert hat. Bei der simultanen Inkubation der cancerogenen Thyreozyten mit 20  $\mu\text{M}$  Akt Inhibitor V und Arsentrioxid (2  $\mu\text{M}$ ) steigt dagegen sowohl die Iodidaufnahmerate, als auch die NIS-Expression an; nach 48 Stunden zeigen 50 % der Zellen eine positive Reaktion.

Die cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1 exprimieren im Allgemeinen wenig Pendrin. Mevinolin (100  $\mu\text{M}$ ) bewirkt nach 24 Stunden bei 30 % der Zellen eine Pendrin-Protein-Expression. Nach 48-stündiger Inkubation mit Akt Inhibitor I sind es 30 % und mit Akt Inhibitor V sogar 40 % der Thyreozyten, die mit dem Antikörper anti-PDS-1 eine Reaktion eingehen, wohingegen bei den Kontrollgruppen keine der Zellen Pendrin exprimieren.

Einige der getesteten Substanzen kann man möglicherweise bei einer Redifferenzierungstherapie bei Patienten mit Schilddrüsenmalignomen einsetzen. Zu nennen sind dabei 13-cis-Retinsäure, Troglitazon, Valproinsäure, Arsentrioxid und Akt Inhibitor I in Kombination mit Arsentrioxid.

Aufgrund der vorliegenden In-vitro-Ergebnisse sind insbesondere die In-vivo-Untersuchungen von 13-cis-Retinsäure und Akt Inhibitor I in Kombination mit Arsentrioxid interessant.

## **6. Zusammenfassung**

Das Schlüsselmolekül für die Iodidaufnahme in die Schilddrüsenzellen ist der Natrium-Iodid-Symporter. Er transportiert das für die Biosynthese der Schilddrüsenhormone notwendige Iodid in die Thyreozyten. Schilddrüsenmalignomzellen können die Fähigkeit, Iodid aufzunehmen, nach und nach verlieren. Eine Radioiodtherapie mit dem Isotop  $^{131}\text{I}$  wird dadurch unmöglich. Die Radioiodtherapie gilt als Therapie der Wahl, da das radioaktiv markierte Iod selektiv in der Schilddrüse angereichert wird. Eine Speicherung in anderen Organen ist vernachlässigbar. Nicht angereichertes Iodid wird rasch über die Nieren ausgeschieden. In die Thyreozyten aufgenommenes  $^{131}\text{I}$  wird intrathyroidal im Follikellumen und den apikalen Zellmembranen der aktiven Thyreozyten gespeichert (Bell E., Grünwald F., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde an der karzinogenen Thyreozytenzelllinie CGTH-W-1 überprüft inwieweit, bestimmte Stimulanzen zur Redifferenzierung und somit zur NIS- und Pendrin-Expression beitragen. Der Effekt wurde anhand der Iodidaufnahme, der Proliferationsrate, welche über die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme gemessen wurde, und der Apoptose beurteilt.

Zu den untersuchten Stimulanzen gehören:

- Retinoide & all-trans-Retinol
- Methyltransferase-Hemmer
- Histon-Deacetylase-Hemmer
- HMG-CoA-Reduktase-Hemmer
- Akt/ProteinkinaseB-Hemmer
- Arsenitoxid
- Thiazolidindione

13-cis-Retinsäure, all-trans-Retinsäure, Valproinsäure, Mevinolin, Arsenitoxid und Akt Inhibitor (I und V) in Kombination mit Arsenitoxid erzielten alle einen bemerkenswert steigernden Effekt auf die Radioiodaufnahme in die transformierten Thyreozyten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen innerhalb einer Inkubationszeit von 48 h. Bei Troglitazon und APHA Compound 8 waren die Effekte etwas geringer ausgeprägt. Bei den Substanzen all-trans-Retinsäure, Valproinsäure, Mevinolin, Arsenitoxid und Troglitazon trat gleichzeitig der Effekt einer verminderten  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme auf. Die Kombination dieser Effekte ist bei der Behandlung von Malignomzellen erstrebenswert, da einerseits die Proliferation

gehemmt wird und andererseits radioaktiv markiertes Iodid vermehrt in die transformierten Zellen aufgenommen wird. Im Western Blot ist unter all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure ein, allerdings nur leichter, Anstieg der NIS-Protein-Expression zu erkennen.

Mevinolin erzielte bei unseren Schilddrüsenmalignomzellen die beste Wirkung auf die NIS-Protein-Expression. Diese korrelierte jedoch nicht signifikant mit dem Iodideinbau zumal die Thymidinaufnahme und damit die Zellzahl abgefallen ist. Die Pendrin-Protein-Expression stieg unter Mevinolin auf 30 %.

Bei Valproinsäure ließ sich der Zusammenhang zwischen NIS-Expression und signifikant gesteigerter Iodidinkorporation deutlich erkennen. Auch bei der simultanen Inkubation der Zellen mit Akt Inhibitor I + Arsentrioxid ist nach 48 Stunden sowohl eine verstärkte NIS-Expression als auch eine erhöhte Iodideinbaurrate messbar. Entgegen unseren Erwartungen war eine erhöhte NIS-Expression nach 24 Stunden noch nicht nachweisbar, obwohl der Iodideinbau signifikant angestiegen war. Dies ist am ehesten damit zu erklären, dass sich viele NIS-Moleküle wahrscheinlich noch in inaktivem Zustand befanden und noch nicht in ausreichend detektierbarer Zahl aus dem Zytoplasma zur Membran transportiert wurden. Ein derartiger NIS-Transfer ist für den Iodidtransport in die Zelle Voraussetzung. Ein anderer Grund könnte aber auch das Ausbleiben der Phosphorylierung des Natrium-Iodid-Symporters durch TSH sein.

Bei der Behandlung der Malignomzellen mit 13-cis-Retinsäure, aber auch bei der simultanen Behandlung mit Arsentrioxid + Akt Inhibitor V ist nach 30 Stunden ein signifikanter Anstieg der Iodidinkorporation zu sehen. Die NIS-Expression wurde in unseren Versuchen erst nach 48 h gemessen. Zu diesem Zeitpunkt war sie verstärkt, der Iodideinbau allerdings nicht (mehr) signifikant erhöht. Wahrscheinlich ist nach dieser Zeit bereits ein partielles Absterben an Zellen eingetreten.

Mevinolin, 13-cis-Retinsäure und Akt Inhibitor I + Arsentrioxid induzieren bei unserer untersuchten Zelllinie den programmierten Zelltod.

Von all den getesteten Substanzen zeigt Mevinolin den stärksten differenzierungssteigernden Effekt in der untersuchten Zelllinie.



## 7. Anhang

Die mit ● gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle (unstimulierte Thyreozyten).

Die mit ■ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zum Lösungsmittel.

Die mit ◆ gekennzeichneten Ergebnisse sind in der gesamten Versuchsreihe signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle, in vorliegendem Ansatz allerdings nicht.

Die mit ◇ gekennzeichneten Ergebnisse sind in der gesamten Versuchsreihe signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zum Lösungsmittel, in vorliegendem Ansatz allerdings nicht.

Die mit ○ gekennzeichneten Ergebnisse sind in vorliegendem Ansatz signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle, nicht aber in der gesamten Versuchsreihe.

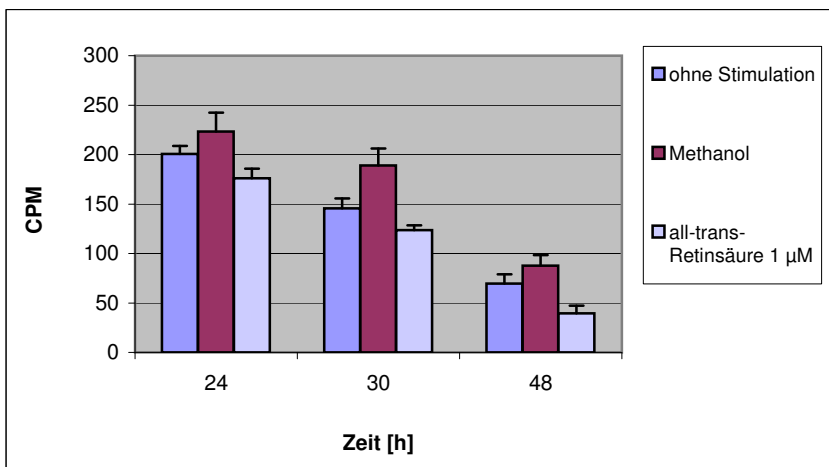
Die mit □ gekennzeichneten Ergebnisse sind in vorliegendem Ansatz signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zum Lösungsmittel, nicht aber in der gesamten Versuchsreihe.

**Tabelle 1**

$^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1. Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM ( $n = 6$ ).

**Tabelle 1.1**

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	200,6	145,5	69,5
STABW	23,0	28,7	26,4
SEM	8,1	10,1	9,3
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	223,0	189,0	87,7
STABW	53,8	48,7	29,9
SEM	19,0	17,2	10,6
signifikant			
all-trans-Retinsäure 1 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	176,0	123,7	39,5
STABW	27,1	13,4	22,3
SEM	9,6	4,7	7,9
signifikant		■	●



**Abb. 1.1:** Diagramm zu Tabelle 1.1.

Tabelle 1.2

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	37,4	76,5	24,9
STABW	8,2	18,7	8,9
SEM	3,4	7,6	3,6
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	38,5	105,0	22,0
STABW	10,5	34,4	3,6
SEM	4,3	14,0	1,5
signifikant			
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	74,5	130,7	18,5
STABW	27,6	15,7	6,5
SEM	11,3	6,4	2,7
signifikant			
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	61,5	60,8	13,0
STABW	25,4	40,7	2,5
SEM	10,4	16,6	1,0
signifikant			
APHA 1 µM			
Mittelwert	58,6	64,2	15,0
STABW	27,8	43,3	1,5
SEM	11,3	17,7	0,6
signifikant			

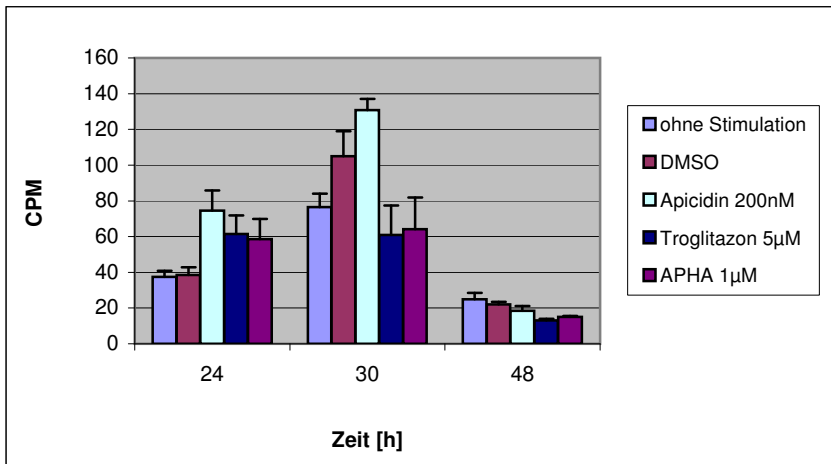


Abb. 1.2: Diagramm zu Tabelle 1.2

Tabelle 1.3

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	453,3	50,4	883,8
STABW	172,0	14,1	276,5
SEM	70,2	5,8	112,9
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	428,5	57,6	755,3
STABW	125,1	12,3	236,0
SEM	51,1	5,0	96,4
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	455,5	55,6	460,9
STABW	124,3	21,5	212,7
SEM	50,7	8,8	86,0
signifikant			
13-cis-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	140,6	36,8	267,5
STABW	95,1	7,0	225,4
SEM	38,8	2,8	92,0
signifikant	○/□	◆/■	○/□
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	321,9	59,8	315,6
STABW	99,7	8,6	183,5
SEM	40,7	3,5	74,9
signifikant			○/□
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	290,6	60,3	367,0
STABW	52,5	10,9	48,9
SEM	21,4	4,4	24,4
signifikant	○/□		○/□
APHA 1 µM			
Mittelwert	409,0	112,3	1322,7
STABW	111,9	59,3	732,9
SEM	45,7	24,2	299,2
signifikant		○/□	○/□

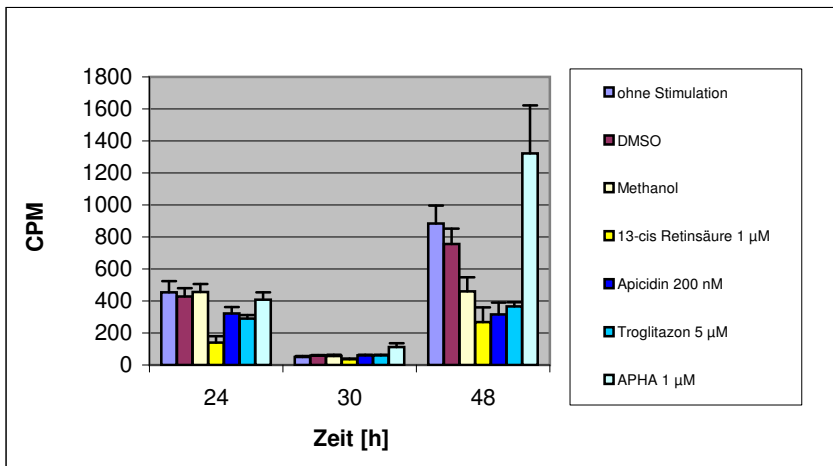


Abb. 1.3: Diagramm zu Tabelle 1.3.

Tabelle 1.5

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	58,9	84,8	51,9
STABW	5,9	27,9	18,8
SEM	3,4	16,1	10,8
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	70,7	66,5	65,0
STABW	9,4	11,0	10,3
SEM	5,4	6,3	5,9
signifikant			
Ethanol			
Mittelwert	94,7	42,1	53,8
STABW	30,4	7,2	12,4
SEM	17,6	4,1	7,2
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	66,3	50,2	67,1
STABW	3,9	9,1	10,1
SEM	2,3	5,2	5,9
signifikant			
Mevinolin 100 µM			
Mittelwert	58,5	52,6	73,0
STABW	12,0	10,4	15,2
SEM	4,9	4,3	6,2
signifikant	□	○/◇	●
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	42,4	64,9	65,4
STABW	8,9	14,7	21,4
SEM	3,6	6,0	8,7
signifikant	□		
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	42,3	64,4	70,0
STABW	5,8	30,4	26,3
SEM	2,4	12,4	10,7
signifikant			
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	11,5	60,3	67,5
STABW	11,6	9,9	14,1
SEM	4,7	4,0	5,8
signifikant	○/◇	◇	●/◆

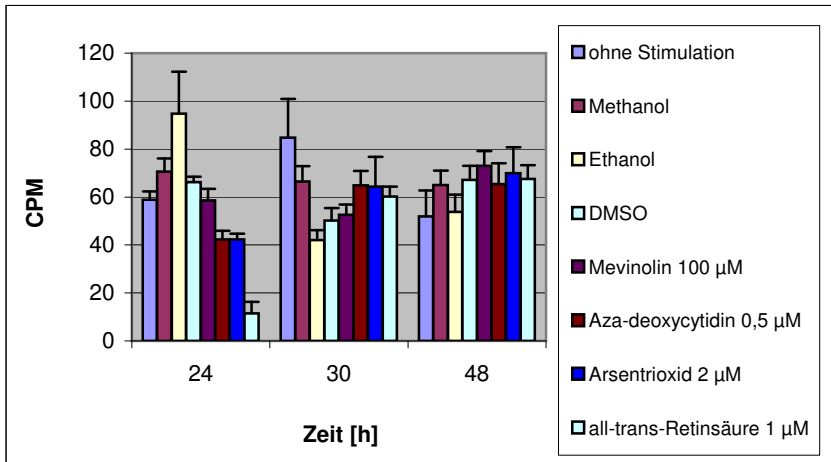


Abb. 1.5: Diagramm zu Tabelle 1.5.

Tabelle 1.6

	24 h	30 h	48 h
<b>ohne Stimulation</b>			
Mittelwert	50,8	47,6	740,6
STABW	7,2	17,0	258,4
SEM	3,0	6,9	105,5
signifikant			
<b>Methanol</b>			
Mittelwert	49,5	98,3	717,4
STABW	6,2	26,5	205,9
SEM	2,5	10,8	84,1
signifikant			
<b>Ethanol</b>			
Mittelwert	48,6	77,6	519,6
STABW	10,1	8,6	192,8
SEM	4,1	3,5	78,7
signifikant			
<b>DMSO</b>			
Mittelwert	53,3	83,2	542,5
STABW	6,9	8,8	48,0
SEM	2,8	3,6	19,6
signifikant			
<b>Troglitazon 5 µM</b>			
Mittelwert	57,5	88,2	786,3
STABW	5,7	12,5	129,5
SEM	2,3	5,1	52,9
signifikant		○	□

5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	36,5	69,7	441,0
STABW	13,3	8,3	209,9
SEM	5,4	3,4	85,7
signifikant	□	○	○
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	118,2	127,9	2451,7
STABW	34,4	44,4	1205,2
SEM	14,0	18,1	492,0
signifikant	○/□	○/◇	●
Mevinolin 100 µM			
Mittelwert	130,3	138,7	2805,4
STABW	62,5	52,5	1394,4
SEM	25,5	21,4	569,3
signifikant	○/□	○/■	●/□
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	104,8	113,1	1607,8
STABW	34,2	23,8	715,6
SEM	14,0	9,7	292,2
signifikant	○	○	○

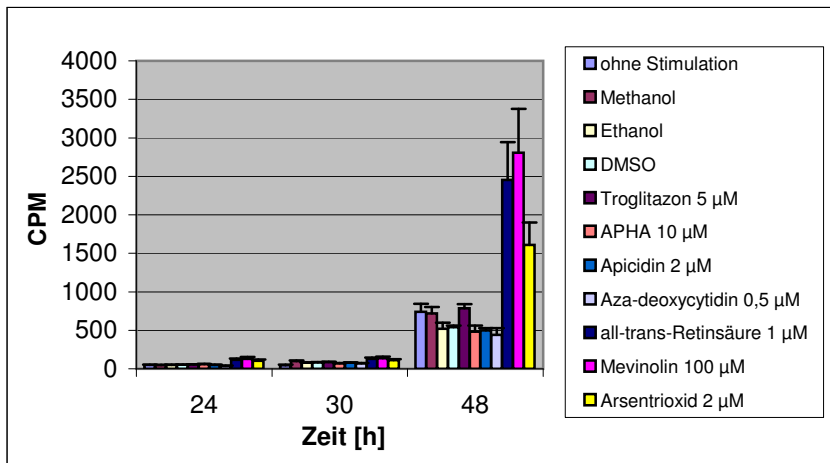


Abb. 1.6: Diagramm zu Tabelle 1.6.

Tabelle 1.7 zu Abb. 1

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	143,3	137,6	158,0
STABW	11,9	23,9	16,8
SEM	4,9	9,7	6,8
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	137,9	132,8	188,7
STABW	6,6	7,6	39,1
SEM	2,7	3,1	16,0
signifikant			
Ethanol			
Mittelwert	146,4	137,5	158,5
STABW	12,3	15,7	24,1
SEM	5,0	6,4	9,8
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	135,6	156,5	143,7
STABW	6,4	27,1	8,3
SEM	2,6	11,1	3,4
signifikant			
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	128,9	157,3	149,9
STABW	14,0	11,4	15,4
SEM	5,7	4,6	6,3
signifikant			
APHA 1 µM			
Mittelwert	136,8	137,7	145,4
STABW	14,4	25,1	8,7
SEM	5,9	10,3	3,5
signifikant			
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	140,1	135,1	171,2
STABW	11,5	7,0	11,5
SEM	4,7	2,8	4,7
signifikant			
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	138,3	131,8	178,9
STABW	17,3	17,6	19,3
SEM	7,1	7,2	7,9
signifikant			



Mevinolin 100 µM			
Mittelwert	168,4	191,7	158,3
STABW	26,6	46,2	26,9
SEM	10,9	18,9	11,0
signifikant		◇	●
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	185,2	223,1	185,2
STABW	34,3	40,4	22,9
SEM	14,0	16,5	9,4
signifikant		○/□	
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	148,9	227,4	228,8
STABW	23,0	31,5	28,6
SEM	9,4	12,9	11,7
signifikant		○/■	●
13-cis-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	155,1	317,2	242,2
STABW	36,4	98,4	34,4
SEM	14,9	40,2	14,0
signifikant		●/■	○

Tabelle 1.8

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	257,5	226,3	282,4
STABW	131,5	53,6	87,9
SEM	53,7	21,9	35,9
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	241,1	301,1	369,8
STABW	83,5	128,8	74,2
SEM	34,1	52,6	30,3
signifikant			
Ethanol			
Mittelwert	188,7	216,6	344,7
STABW	30,5	32,1	106,3
SEM	12,5	13,1	43,4
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	206,7	286,1	313,0
STABW	22,6	36,3	108,0
SEM	9,2	14,8	44,1
signifikant			

Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	192,9	353,7	336,3
STABW	51,6	125,0	96,4
SEM	21,1	51,0	39,4
signifikant		○	
APHA 1 µM			
Mittelwert	203,7	280,4	377,7
STABW	25,6	49,6	64,3
SEM	10,5	20,3	26,3
signifikant			
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	211,3	271,0	568,8
STABW	34,7	90,7	102,2
SEM	14,2	37,0	41,7
signifikant			○/□
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	196,7	223,8	413,7
STABW	34,2	112,7	146,0
SEM	14,0	46,0	59,6
signifikant			○
Mevinolin 100 µM			
Mittelwert	139,0	243,6	521,1
STABW	24,6	55,3	77,0
SEM	10,0	22,6	31,4
signifikant	○	◇	●/□
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	158,4	477,0	647,6
STABW	54,1	337,8	144,9
SEM	22,1	137,9	59,2
signifikant	○/□	○/□	○/□
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	160,8	480,5	1305,1
STABW	44,0	104,3	551,2
SEM	17,9	42,6	225,0
signifikant	○/□	○/■	●/□
13-cis-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	167,9	929,5	1558,3
STABW	42,7	779,9	692,6
SEM	17,4	318,4	282,8
signifikant	○/□	●/■	○/□

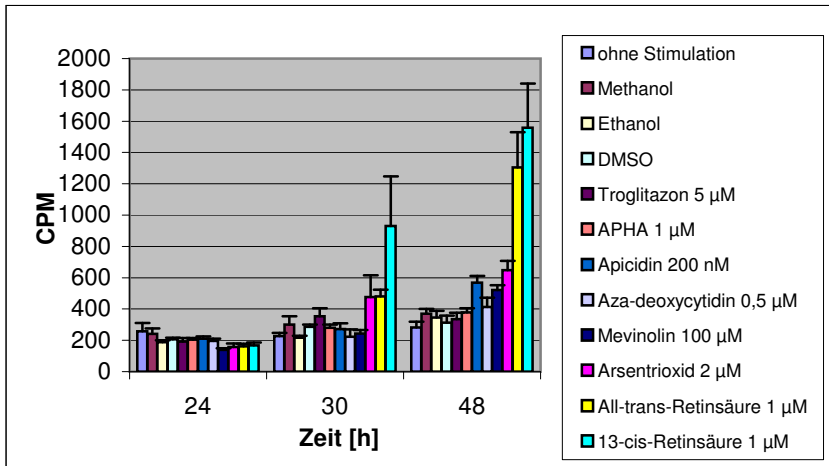


Abb. 1.7: Diagramm zu Tabelle 1.8.

Tabelle 1.9 zu Abb. 8

	6 h	19 h	24 h	30 h	43 h	48 h
ohne Stimulation						
Mittelwert	164,1	160,7	184,4	203,1	66,5	92,5
STABW	58,6	14,4	18,2	125,8	54	47,1
SEM	20,7	5,1	6,4	44,5	19,1	16,7
signifikant						
Valproinsäure 3 mM						
Mittelwert	201,9	137,3	141,2	286,3	137,9	160,7
STABW	123,2	13,9	21,5	88,2	66,9	49,8
SEM	43,6	4,9	7,6	31,2	23,7	17,6
signifikant				●/■	●/■	●/■
Valproinsäure 1 mM						
Mittelwert	167,9	163,3	152,1	728,5	415,2	351,7
STABW	89,1	47,4	6,4	267,4	150,9	65,3
SEM	31,5	16,7	2,3	94,5	53,3	23,1
signifikant				●/■	●/■	●/■
Valproinsäure 0,5 mM						
Mittelwert	119,9	144,9	152,5	681	481,1	312,7
STABW	11,2	11,1	17,8	259,2	58,4	75,1
SEM	4,0	3,9	6,3	91,6	20,6	26,6
signifikant				●/■	●/■	●/■

**Tabelle 2**<sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angabe sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 6).

Zugabe der Stimulanzen 23 Stunden nach der Zellaussaat.

Tabelle 2.1 zu Abb. 3

	6 h	20 h	24 h	30 h	44 h	48 h
ohne Stimulation						
Mittelwert	151,8	243,9	136,8	126,5	105,5	109,9
STABW	35,0	129,1	17,8	21	32,7	7
SEM	14,3	52,7	7,3	8,6	13,3	2,9
signifikant						
Methanol						
Mittelwert	138,9	249,5	119,0	146,5	98,8	169
STABW	20,6	66,5	19,3	32,5	9,7	89
SEM	8,4	27,1	7,9	13,3	3,9	36,3
signifikant						
Ethanol						
Mittelwert	148,1	294,6	100,1	144,5	101,2	132
STABW	44,8	117,0	9,9	16,5	34	24,1
SEM	18,3	47,8	4,0	6,7	13,9	9,9
signifikant						
DMSO						
Mittelwert	162,1	479,3	105,5	139,3	101,3	114,7
STABW	25,9	213,8	6,4	24,9	7,5	20,9
SEM	10,6	87,3	2,6	10,2	3,1	8,5
signifikant						
Troglitazon 5 µM						
Mittelwert	152,4	324,4	126,6	220,3	117,5	123,4
STABW	32,8	143,9	10,3	141,8	9,3	9,6
SEM	13,4	58,7	4,2	57,9	3,8	3,9
signifikant				●/■		
APHA 1 µM						
Mittelwert	143,7	407,6	135,9	147,6	129,5	130,6
STABW	27,0	142,8	18,8	20,3	36,2	11,9
SEM	11,0	58,3	7,7	8,3	14,8	4,8
signifikant		●				
Apicidin 200 nM						
Mittelwert	135,4	447,6	127,5	134,6	123,1	153,8
STABW	13,4	164,2	19,4	18,2	18	29,2
SEM	5,5	67,0	7,9	7,4	7,3	11,9
signifikant		●				

Mevinolin 100 µM						
Mittelwert	131,4	682,2	128,2	115,7	134	148,2
STABW	24,7	177,6	26,3	11,7	29,9	30,6
SEM	10,1	72,5	10,7	4,8	12,2	12,5
signifikant		●/■				
Arsentrioxid 2 µM						
Mittelwert	175,4	1583,0	271,8	324	302,7	413,3
STABW	35,9	471,2	112,3	90,9	82	235
SEM	14,7	192,4	45,8	37,1	33,5	95,9
signifikant		●/■	●/■	●/■	●/■	●/■
all-trans-Retinsäure 1 µM						
Mittelwert	233,1	1477,5	321,1	326,1	322,7	369,4
STABW	48,4	397,6	111,0	67,1	76,3	52,6
SEM	19,8	162,3	45,3	27,4	31,1	21,5
signifikant	●/■	●/■	●/■	●/■	●/■	●/■

**Tabelle 3**

**Tabelle 3.1 zu Abb. 5**

<sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 6).

Die <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe erfolgte 7 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe.

	6 h	24 h	48 h
<b>ohne Stimulation</b>			
Mittelwert	118,6	211,2	182,1
STABW	8,5	54,9	20,9
SEM	3,4	22,4	8,5
signifikant			
<b>Methanol</b>			
Mittelwert	122,3	237,4	161,5
STABW	15,2	111,8	16,6
SEM	6,2	45,7	6,8
signifikant			
<b>Ethanol</b>			
Mittelwert	113,6	143,6	162,9
STABW	8,6	11,0	11,5
SEM	3,5	4,5	4,7
signifikant			
<b>DMSO</b>			
Mittelwert	127,9	142,6	202,4
STABW	11,3	10,0	56,8
SEM	4,6	4,1	23,2
signifikant			
<b>Troglitazon 5 µM</b>			
Mittelwert	139,2	134,9	292,4
STABW	35,8	14,1	107,2
SEM	14,6	5,8	43,8
signifikant		●	●/■
<b>APHA 1 µM</b>			
Mittelwert	203,9	141,0	209,2
STABW	67,8	16,4	10,7
SEM	27,7	6,7	4,4
signifikant	●/■	■	
<b>Apicidin 200 nM</b>			
Mittelwert	174,8	165,8	217,9
STABW	58,4	38,9	32,6
SEM	23,8	15,9	13,3
signifikant	●		

5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	117,7	131,7	189,0
STABW	14,0	15,4	24,8
SEM	5,7	6,3	10,1
signifikant		•	
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	137,2	172,3	271,8
STABW	34,9	15,0	54,4
SEM	14,3	6,1	22,2
signifikant			•/■
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	139,7	199,4	246,9
STABW	12,7	31,0	47,2
SEM	5,2	12,7	19,3
signifikant			■

Tabelle 3.2 zu Abb. 7

<sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 6).

Die <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe erfolgte 14 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe.

	6 h	24 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	196,0	265,0	241,5
STABW	17,6	22,8	65,6
SEM	7,2	9,3	26,8
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	176,9	245,5	204,0
STABW	14,8	27,2	16,2
SEM	6,0	11,1	6,6
signifikant			
Ethanol			
Mittelwert	179,6	245,8	200,2
STABW	12,7	24,5	19,1
SEM	5,2	10,0	7,8
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	191,0	258,4	264,6
STABW	10,8	55,4	73,2
SEM	4,4	22,6	29,9
signifikant			
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	178,3	249,0	260,7
STABW	17,0	15,0	25,0
SEM	7,0	6,1	10,2
signifikant			
APHA 1 µM			
Mittelwert	183,1	233,8	306,7
STABW	26,8	33,9	53,5
SEM	10,9	13,9	21,8
signifikant			
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	187,6	230,4	352,5
STABW	9,1	20,8	61,8
SEM	3,7	8,5	25,2
signifikant			●
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	168,4	219,4	260,3
STABW	15,7	25,3	30,8
SEM	6,4	10,3	12,6
signifikant			■



**Tabelle 4**

<sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 6).

Die Zugabe des Akt Inhibitors erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat.

Die Zugabe von <sup>125</sup>I-Iodid und Arsenitoxid erfolgte 2 Stunden nach der Zellaussaat.

Tabelle 4.1 zu Abb. 11

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	218,4	445,1	219,4
STABW	26,5	111,1	58,6
SEM	10,8	45,4	23,9
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	209,9	453,4	208,5
STABW	30,2	69,7	30,4
SEM	12,3	28,5	12,4
signifikant			
ohne Stimulation+ATO 2 µM			
Mittelwert	239,9	315,5	332,3
STABW	44,8	118,1	92,3
SEM	18,3	48,2	37,7
signifikant			
Akt Inhibitor I 2 µM			
Mittelwert	261,7	382,0	272,9
STABW	38,2	26,0	73,4
SEM	15,6	10,6	30,0
signifikant			
Akt Inhibitor I 5 µM			
Mittelwert	260,6	392,7	321,3
STABW	16,4	39,3	48,0
SEM	6,7	16,0	19,6
signifikant			
Akt Inhibitor I 10 µM			
Mittelwert	253,7	403,5	333,3
STABW	29,1	65,9	63,1
SEM	11,9	26,9	25,8
signifikant			
Akt Inhibitor I 2 µM + ATO 2 µM			
Mittelwert	242,6	369,8	360,7
STABW	42,6	80,8	72,7
SEM	17,4	33,0	29,7
signifikant			
Akt Inhibitor I 5 µM + ATO 2 µM			
Mittelwert	252,0	349,4	265,0
STABW	16,9	97,5	32,9
SEM	6,9	39,8	13,5
signifikant			

Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	1160,9	376,7	919,3
STABW	625,1	209,8	225,0
SEM	255,2	85,6	91,8
signifikant	●/■		●/■

Tabelle 4.2

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	233,2	226,9	360,3
STABW	34,4	35,2	72,0
SEM	14,1	14,4	29,4
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	218,5	241,1	370,0
STABW	15,3	25,7	59,7
SEM	6,3	10,5	24,4
signifikant			
ohne Stimulation + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	221,0	242,7	325,5
STABW	26,2	48,8	56,8
SEM	10,7	19,9	23,2
signifikant			
Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M			
Mittelwert	227,9	241,4	409,5
STABW	16,6	40,8	34,9
SEM	6,8	16,7	14,3
signifikant			
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M			
Mittelwert	226,2	228,3	409,4
STABW	22,6	19,7	54,1
SEM	9,2	8,0	22,1
signifikant			
Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M			
Mittelwert	209,7	233,9	426,2
STABW	14,3	35,4	50,2
SEM	5,8	14,4	20,5
signifikant			
Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	200,8	209,1	368,5
STABW	18,1	8,8	46,3
SEM	7,4	3,6	18,9
signifikant			
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	224,3	242,0	367,6
STABW	25,1	18,9	40,7
SEM	10,2	7,7	16,6
signifikant			

Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	277,0	237,1	1114,1
STABW	46,6	27,0	638,2
SEM	19,0	11,0	260,5
signifikant	●/■		●/■

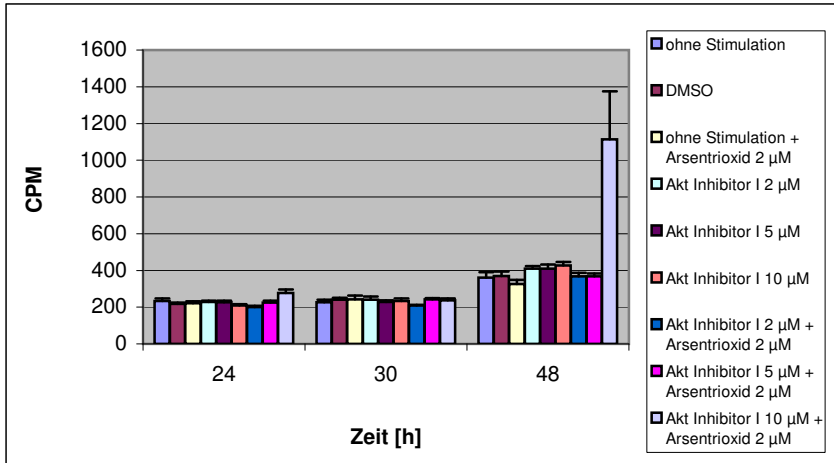


Abb. 4.1: Diagramm zu Tabelle 4.2.

Tabelle 4.3

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	109,9	192,2	142,1
STABW	12,1	38,4	18,2
SEM	5,0	15,7	7,4
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	93,1	213,1	191,0
STABW	10,7	87,4	38,5
SEM	4,4	35,7	15,7
signifikant			
ohne Stimulation + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	90,0	166,4	186,8
STABW	7,0	64,9	29,2
SEM	2,9	26,5	11,9
signifikant			
Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M			
Mittelwert	97,3	196,1	204,2
STABW	9,8	98,9	27,5
SEM	4,0	40,4	11,2
signifikant			
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M			
Mittelwert	115,9	180,6	187,3
STABW	26,0	48,8	20,2
SEM	10,6	19,9	8,2
signifikant			

Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M			
Mittelwert	102,3	175,7	180,4
STABW	12,7	36,1	20,9
SEM	5,2	14,7	8,5
signifikant			
Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	98,2	174,3	160,7
STABW	6,0	27,1	16,0
SEM	2,4	11,1	6,5
signifikant			
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	91,4	143,1	170,5
STABW	10,8	20,4	41,1
SEM	4,4	8,3	16,8
signifikant		□	
Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	161,1	194,0	246,8
STABW	37,4	76,4	86,4
SEM	15,3	31,2	35,3
signifikant	●/■		●/■

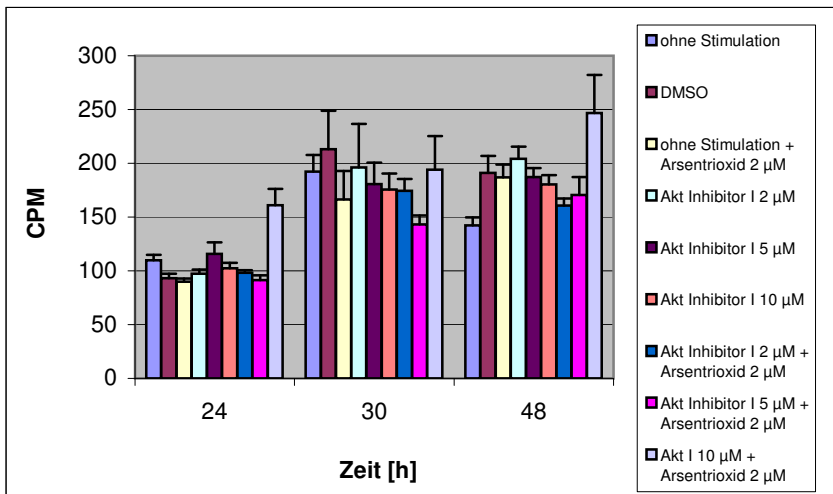


Abb. 4.2: Diagramm zu Tabelle 4.3.

Tabelle 4.4

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	257,5	226,3	282,4
STABW	131,5	53,6	87,9
SEM	53,7	21,9	35,9
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	206,7	286,1	313,0
STABW	22,6	36,3	108,0
SEM	9,2	14,8	44,1
signifikant			
ohne Stimulation + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	158,4	339,9	647,6
STABW	54,1	42,1	144,9
SEM	22,1	17,2	59,2
signifikant	o/ $\square$	o/ $\square$	o/ $\square$
Akt Inhibitor V 0,1 $\mu$ M			
Mittelwert	162,6	149,1	480,2
STABW	14,5	25,9	206,9
SEM	5,1	9,2	73,1
signifikant	o	o/ $\square$	o/ $\square$
Akt Inhibitor V 1 $\mu$ M			
Mittelwert	177,7	186,2	367,0
STABW	27,4	35,0	156,7
SEM	9,7	12,4	55,4
signifikant	o	$\square$	
Akt Inhibitor V 5 $\mu$ M			
Mittelwert	188,8	194,2	129,2
STABW	29,5	129,9	30,9
SEM	10,4	45,9	10,9
signifikant			
Akt Inhibitor V 10 $\mu$ M			
Mittelwert	195,3	125,3	104,0
STABW	39,8	23,2	13,7
SEM	14,1	8,2	4,8
signifikant		o/ $\square$	o/ $\square$
Akt Inhibitor V 20 $\mu$ M			
Mittelwert	237,1	113,7	96,7
STABW	51,9	15,9	9,3
SEM	18,4	5,6	3,3
signifikant		o/ $\square$	o/ $\square$
Akt Inhibitor V 0,1 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	183,6	288,2	383,5
STABW	34,1	89,8	87,2
SEM	12,1	31,7	30,8
signifikant		$\blacklozenge/\emptyset$	

Akt Inhibitor V 1 $\mu\text{M}$ + ATO 2 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	172,3	330,9	339,6
STABW	24,2	107,6	61,4
SEM	8,6	38,0	21,7
signifikant	○	●/◇	◇
Akt Inhibitor V 5 $\mu\text{M}$ + ATO 2 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	194,2	394,2	306,3
STABW	27,2	394,8	93,0
SEM	9,6	139,6	32,9
signifikant		●/◇	◇
Akt Inhibitor V 10 $\mu\text{M}$ + ATO 2 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	220,4	167,2	268,2
STABW	45,1	34,2	85,3
SEM	15,9	12,1	30,2
signifikant		◆/■	
Akt Inhibitor V 20 $\mu\text{M}$ + ATO 2 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	228,9	166,2	267,6
STABW	88,9	41,1	93,8
SEM	31,4	14,5	33,2
signifikant		◆/■	◇

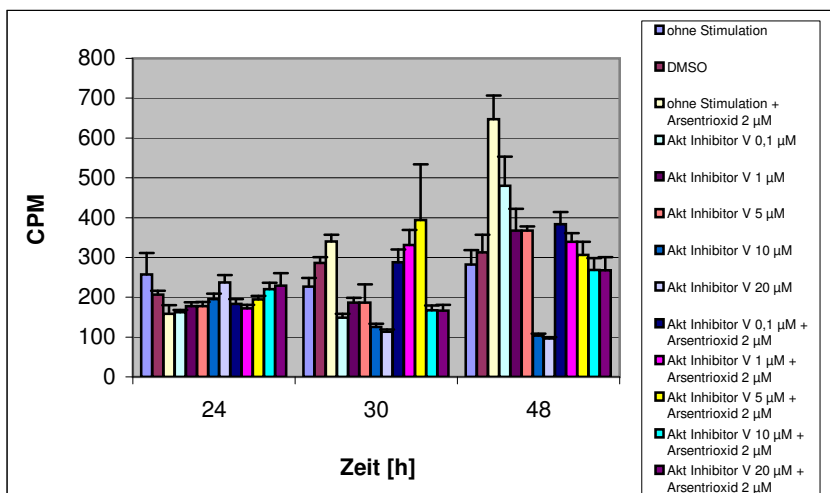


Abb. 4.3: Diagramm zu Tabelle 4.4.

Tabelle 4.5 zu Abb. 13

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	169,2	110,0	580,5
STABW	92,5	30,5	62,9
SEM	37,8	12,4	25,7
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	174,9	140,2	930,8
STABW	40,9	20,3	111,2
SEM	16,7	8,3	45,4
signifikant			

ohne Stimulation + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	153,5	161,5	642,0
STABW	46,2	9,8	238,9
SEM	18,9	4,0	97,5
signifikant		●	■
Akt Inhibitor V 0,1 $\mu$ M			
Mittelwert	184,2	184,8	1033,5
STABW	44,1	44,4	234,5
SEM	18,0	18,1	95,7
signifikant		●	●
Akt Inhibitor V 1 $\mu$ M			
Mittelwert	150,3	237,3	1080,7
STABW	57,8	75,4	270,6
SEM	23,6	30,8	110,5
signifikant		●	●
Akt Inhibitor V 5 $\mu$ M			
Mittelwert	154,9	281,9	958,3
STABW	51,1	81,5	233,4
SEM	20,9	33,3	95,3
signifikant		●/■	●
Akt Inhibitor V 10 $\mu$ M			
Mittelwert	194,9	279,2	1127,9
STABW	44,9	63,5	159,4
SEM	18,3	25,9	65,1
signifikant		●/■	●
Akt Inhibitor V 20 $\mu$ M			
Mittelwert	228,0	286,4	1223,5
STABW	57,6	90,0	188,7
SEM	23,5	36,7	77,0
signifikant		●/■	●
Akt Inhibitor V 0,1 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	158,6	310,0	626,3
STABW	86,3	120,0	218,4
SEM	35,2	49,0	89,2
signifikant		●/■	■
Akt Inhibitor V 1 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	149,5	509,0	618,3
STABW	19,7	177,9	162,3
SEM	8,1	72,6	66,3
signifikant		●/■	■
Akt Inhibitor V 5 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	131,7	513,5	589,7
STABW	39,5	222,2	88,3
SEM	16,1	90,7	36,1
signifikant		●/■	■

Akt Inhibitor V 10 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	159,5	448,4	841,5
STABW	21,8	53,9	244,9
SEM	8,9	22,0	100,0
signifikant		●/■	●
Akt Inhibitor V 20 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	238,1	511,7	969,8
STABW	41,5	94,2	245,3
SEM	16,9	38,5	100,1
signifikant		●/■	●



**Tabelle 5**

<sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 8).

Die mit ● gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p < 0,05) zur Kontrolle (unstimulierte Thyreozyten).

Die mit ■ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p < 0,05) zum Lösungsmittel.

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind in der gesamten Versuchsreihe signifikant verschieden (p < 0,05) zur Kontrolle, in vorliegendem Ansatz allerdings nicht.

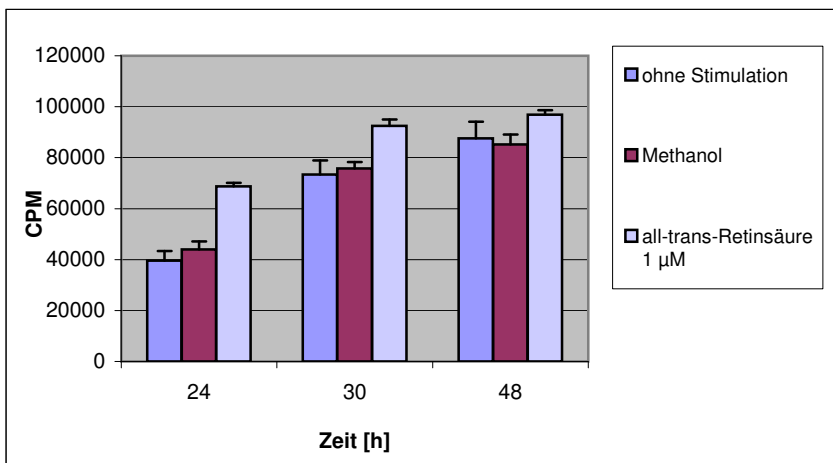
Die mit ◇ gekennzeichneten Ergebnisse sind in der gesamten Versuchsreihe signifikant verschieden (p < 0,05) zum Lösungsmittel, in vorliegendem Ansatz allerdings nicht.

Die mit ○ gekennzeichneten Ergebnisse sind in vorliegendem Ansatz signifikant verschieden (p < 0,05) zur Kontrolle, nicht aber in der gesamten Versuchsreihe.

Die mit □ gekennzeichneten Ergebnisse sind in vorliegendem Ansatz signifikant verschieden (p < 0,05) zum Lösungsmittel, nicht aber in der gesamten Versuchsreihe.

**Tabelle 5.1**

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	39618,8	73402,8	87594,6
STABW	7350,6	10902,1	18507,3
SEM	3675,3	5451,0	6543,3
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	44020,0	75807,5	85254,8
STABW	6141,3	4949,9	10855,1
SEM	3070,7	2474,9	3837,9
signifikant			
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	68713,3	92433,8	96873,3
STABW	2680,0	5197,0	5107,0
SEM	1340,0	2598,5	1805,6
signifikant	○/□		



**Abb 5.1:** Diagramm zu Tabelle 5.1.

Tabelle 5.2

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	62833,8	46718,0	59853,8
STABW	12253,6	10560,5	15862,5
SEM	6126,8	5280,2	5608,2
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	78571,3	52685,0	52339,3
STABW	3116,1	3837,6	20141,2
SEM	1558,1	1918,8	7121,0
signifikant			
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	63995,3	49348,5	46694,4
STABW	12375,4	21248,7	23955,0
SEM	6187,7	10624,4	8469,4
signifikant			
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	65704,3	51369,5	72080,1
STABW	1137,4	19749,8	6508,8
SEM	568,7	9874,9	2301,2
signifikant			
APHA 1 µM			
Mittelwert	63377,5	64829,5	66190,4
STABW	12194,9	9112,6	22801,4
SEM	6097,5	4556,3	8061,5
signifikant			

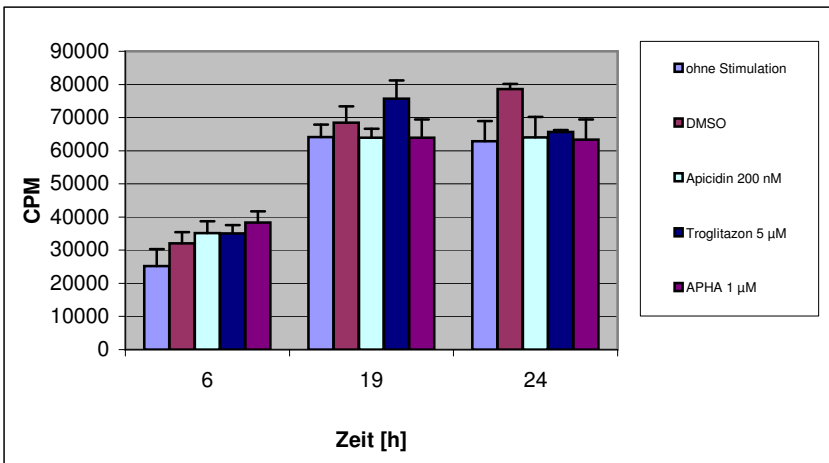


Abb. 5.2: Diagramm zu Tabelle 5.2.

Tabelle 5.3

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	56630,5	73064,3	62221,3
STABW	10413,8	10241,0	33308,0
SEM	4251,4	4180,9	13597,9
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	78684,0	60571,2	49469,7
STABW	14905,2	18877,9	40249,6
SEM	6085,0	7706,9	16431,8
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	75813,5	82215,2	17874,3
STABW	23659,3	13573,3	10557,0
SEM	9658,8	5541,3	4309,9
signifikant			
13-cis-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	91381,3	91498,2	47631,2
STABW	3086,5	1300,4	20090,4
SEM	1260,1	530,9	8201,9
signifikant	○		□
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	82636,8	61382,7	55752,8
STABW	10413,6	19776,3	25409,1
SEM	4251,3	8073,6	10373,2
signifikant	○		
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	77968,8	64503,2	45063,0
STABW	14489,0	13972,3	31300,5
SEM	5915,1	5704,2	12778,4
signifikant			
APHA 1 µM			
Mittelwert	79996,3	69480,8	49681,8
STABW	8486,2	8425,3	28213,0
SEM	3464,5	3439,6	11517,9
signifikant	○		

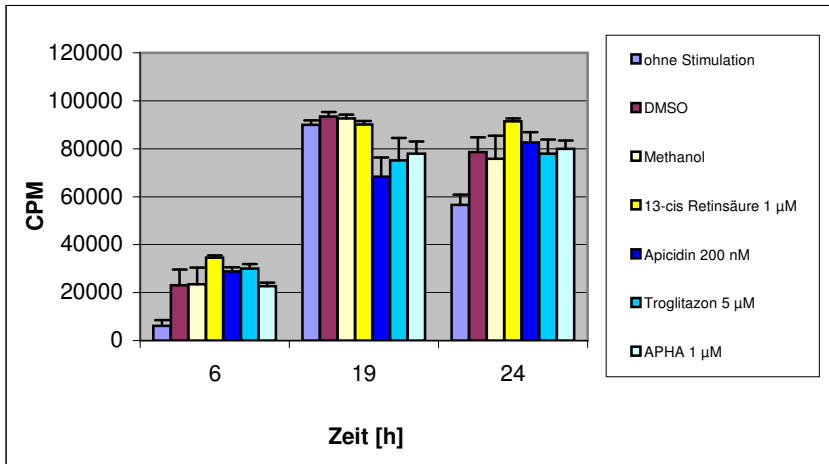
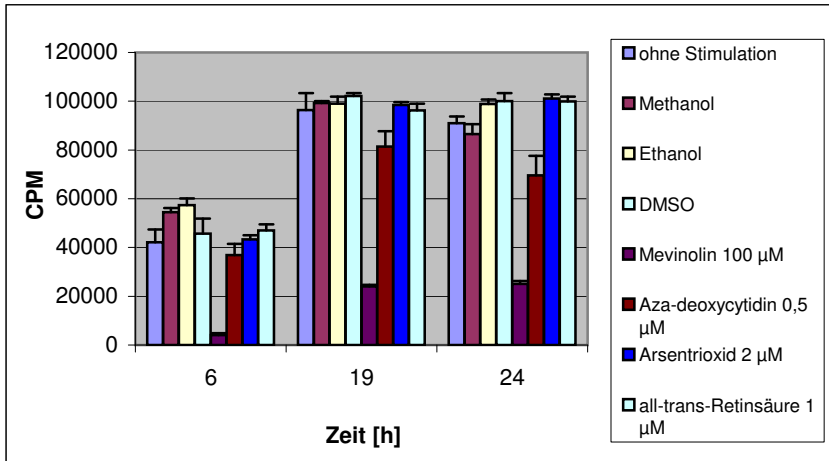


Abb. 5.3: Diagramm zu Tabelle 5.3.

Tabelle 5.4

	24 h	30 h	48 h
<b>ohne Stimulation</b>			
Mittelwert	90966,8	87677,8	77551,0
STABW	5453,0	12618,3	14137,4
SEM	2726,5	6309,1	7068,7
signifikant			
<b>Methanol</b>			
Mittelwert	86585,8	94848,5	60240,7
STABW	8039,5	11864,1	24730,3
SEM	4019,8	5932,0	12365,2
signifikant			
<b>Ethanol</b>			
Mittelwert	98915,3	98502,3	86921,3
STABW	3539,4	7410,9	1036,8
SEM	1769,7	3705,4	518,4
signifikant			
<b>DMSO</b>			
Mittelwert	100103,8	93230,5	42974,8
STABW	6521,1	6240,2	36865,7
SEM	3260,6	3120,1	18432,9
signifikant			
<b>Mevinolin 100 µM</b>			
Mittelwert	25081,8	31645,0	31214,5
STABW	3471,9	1946,9	3176,8
SEM	1227,5	688,3	1123,2
signifikant	●/■	●/■	○/□
<b>5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM</b>			
Mittelwert	69541,6	83329,4	43897,6
STABW	22907,3	15648,5	29711,9
SEM	8099,0	5532,6	10504,8
signifikant	□		○

Arsentrioxid 2 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	101140,9	90738,9	63294,6
STABW	4738,9	18162,7	24950,5
SEM	1675,5	6421,5	8821,3
signifikant			
all-trans-Retinsäure 1 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	99969,3	95196,4	61467,9
STABW	5169,3	6032,4	14885,0
SEM	1953,8	2280,0	5626,0
signifikant			



**Abb. 5.4:** Diagramm zu Tabelle 5.4.

Tabelle 5.5

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	23298,3	38847,9	12683,4
STABW	12623,4	18753,5	12694,8
SEM	4463,0	6630,4	4488,3
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	22949,6	27425,1	15074,1
STABW	8006,2	13336,4	9105,2
SEM	2830,6	4715,1	3219,2
signifikant			
Ethanol			
Mittelwert	21267,3	30315,1	9298,3
STABW	15901,5	16942,2	8474,4
SEM	5622,0	5990,0	2996,2
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	44403,0	35667,8	20197,6
STABW	23458,2	25197,5	14653,6
SEM	8293,7	8908,7	5180,8
signifikant			
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	8486,1	10698,3	2922,6
STABW	6855,4	7729,8	5236,5
SEM	2423,7	2732,9	1851,4
signifikant	○/□	○/□	○/□
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	37772,1	59767,9	14166,8
STABW	15637,3	9557,1	10516,8
SEM	5528,6	3378,9	3718,3
signifikant	○	○/□	
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	39760,9	43815,9	14786,1
STABW	21838,6	24289,9	7106,5
SEM	7721,1	8587,8	2512,5
signifikant	○/□	□	
Mevinolin 100 µM			
Mittelwert	14027,0	18967,0	31979,6
STABW	4091,2	2592,4	4585,2
SEM	1446,4	916,5	1621,1
signifikant	●/■	●/■	○/□
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	17327,4	26449,3	13543,8
STABW	6705,3	4914,1	4755,8
SEM	2370,7	1737,4	1681,4
signifikant		○/□	

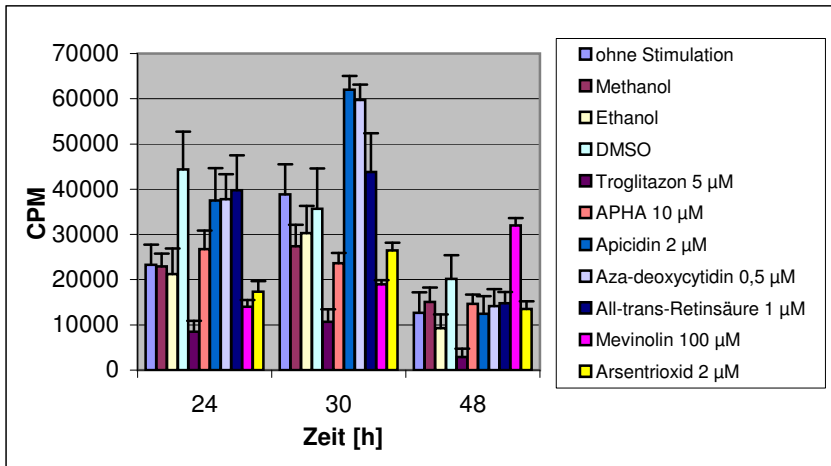


Abb. 5.5: Diagramm zu Tabelle 5.5.

Tabelle 5.6

	24 h	30 h	48 h
<b>ohne Stimulation</b>			
Mittelwert	94170,8	98582,0	95067,0
STABW	13633,6	2947,7	7724,2
SEM	4820,2	1042,2	2730,9
signifikant			
<b>Methanol</b>			
Mittelwert	98257,9	96633,6	87930,4
STABW	2532,0	2622,6	7814,1
SEM	895,2	927,2	2762,7
signifikant			
<b>Ethanol</b>			
Mittelwert	99576,8	98225,0	92233,4
STABW	1902,2	2395,4	6914,3
SEM	672,5	846,9	2444,6
signifikant			
<b>DMSO</b>			
Mittelwert	101676,5	99331,8	81707,1
STABW	4448,7	2731,7	22598,1
SEM	1572,9	965,8	7989,6
signifikant			
<b>Troglitazon 5 µM</b>			
Mittelwert	99963,0	100058,8	71339,8
STABW	1403,2	2366,0	23174,4
SEM	496,1	836,5	8193,4
signifikant			
<b>APHA 1 µM</b>			
Mittelwert	100399,0	101172,0	71192,0
STABW	2265,6	1785,7	35889,9
SEM	801,0	631,3	12689,0
signifikant			

Apicidin 200 nM			
Mittelwert	100996,4	101245,3	70067,3
STABW	2824,1	2095,6	31768,4
SEM	998,5	740,9	11231,8
signifikant			
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	97210,5	98040,9	78414,9
STABW	2281,2	2796,3	27326,7
SEM	806,5	988,7	9661,5
signifikant			
Mevinolin 100 µM			
Mittelwert	13007,1	18348,1	24504,0
STABW	948,0	222,4	972,2
SEM	335,2	78,6	343,7
signifikant	●/■	●/■	○/○
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	89434,0	93355,3	72995,0
STABW	4020,5	3810,8	36195,6
SEM	1421,5	1347,3	12797,1
signifikant			
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	96327,0	96553,0	90775,3
STABW	2420,9	2826,7	6950,2
SEM	855,9	999,4	2457,3
signifikant			
13-cis-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	94576,8	93068,3	86860,5
STABW	4166,4	5748,3	9987,2
SEM	1473,1	2032,3	3531,0
signifikant			

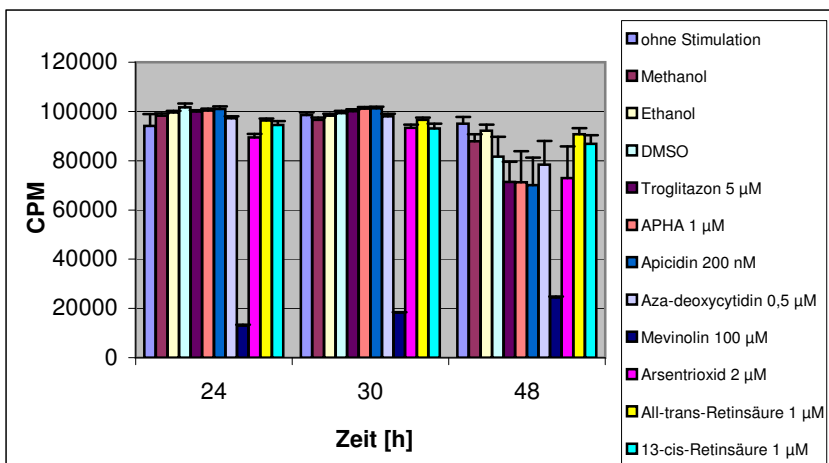


Abb. 5.6: Diagramm zu Tabelle 5.6.



Tabelle 5.7 zu Abb. 10

	6 h	19 h	24 h	30 h	43 h	48 h
ohne Stimulation						
Mittelwert	24987,9	76901,5	80500,5	71254,4	47249,3	17055,3
STABW	5560,2	4873,8	2277,6	2017,4	14692,6	20806,2
SEM	1965,8	1723,1	805,3	713,3	5194,6	7356,1
signifikant						
Valproinsäure 3 mM						
Mittelwert	27008,1	59235,5	70947,9	53940,0	29194,6	10799,9
STABW	4016,2	7283,7	13085,8	14543,1	18428,3	8955,9
SEM	1420,0	2575,2	4626,5	5141,8	6515,4	3166,4
signifikant					●/■	●/■
Valproinsäure 1 mM						
Mittelwert	25912,1	73088,0	80344,4	74547,4	56360,3	11329,5
STABW	4703,8	7907,0	2432,1	5700,8	19322,5	14532,2
SEM	1663,0	2795,5	859,9	2015,5	6831,5	5137,9
signifikant						●/■
Valproinsäure 0,5 mM						
Mittelwert	27393,8	76868,8	81051,5	75743,4	67253,9	15880,6
STABW	2278,1	6086,3	4019,6	3519,9	9044,9	20214,3
SEM	805,4	2151,8	1421,2	1244,5	3197,9	7146,8
signifikant					●/■	

Tabelle 5.8 zu Abb. 2

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	85383,6	93920,5	46791,0
STABW	8693,0	7406,5	38924,0
SEM	3073,4	2618,6	13761,7
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	96087,1	91924,0	39915,0
STABW	5882,5	7026,8	35069,7
SEM	2079,8	2484,3	12399,0
signifikant			
Ethanol			
Mittelwert	94720,0	98028,5	29774,8
STABW	10210,5	4119,3	32515,7
SEM	3610,0	1456,4	11496,0
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	89624,1	100256,8	34663,1
STABW	13865,8	8726,7	40566,3
SEM	4902,3	3085,3	14342,4
signifikant			

Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	94771,6	97799,8	38428,8
STABW	12301,6	6526,2	41264,7
SEM	4349,3	2307,4	14589,3
signifikant			
APHA 1 µM			
Mittelwert	95081,8	100603,9	46585,6
STABW	6235,8	4190,3	33542,1
SEM	2204,7	1481,5	11858,9
signifikant			
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	88484,6	102664,1	45716,8
STABW	9136,0	3248,5	34355,0
SEM	3230,1	1148,5	12146,3
signifikant			
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM			
Mittelwert	88445,6	98244,4	53585,1
STABW	9595,1	3637,1	35119,4
SEM	3392,4	1285,9	12416,6
signifikant			□
Mevinolin 100 µM			
Mittelwert	13075,3	32260,0	44707,3
STABW	8065,0	1220,2	3364,2
SEM	2851,4	431,4	1189,4
signifikant	●/■	●/■	□
Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	79261,6	90165,9	55646,0
STABW	4261,5	3907,0	40410,1
SEM	1506,7	1381,3	14287,1
signifikant			
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	98654,5	99556,1	43170,0
STABW	4902,3	3117,3	20398,6
SEM	1733,2	1102,1	7212,0
signifikant			
13-cis-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	94560,6	99165,1	57032,3
STABW	7545,8	3774,7	35025,7
SEM	2667,8	1334,6	12383,4
signifikant			□

**Tabelle 6**<sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angabe sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 8).

Zugabe der Stimulanzen 23 Stunden nach der Zellaussaat.

Tabelle 6.1 zu Abb. 4

	6 h	20 h	24 h	30 h	44 h	48 h
ohne Stimulation						
Mittelwert	93085,3	103491,5	93888,3	109669,0	95849,1	55746,8
STABW	2994,8	7150,1	5085,9	6956,2	4822,4	5266,6
SEM	1058,8	2528,0	1798,1	2459,4	1705,0	1862,0
signifikant						
Methanol						
Mittelwert	96769,1	105175,4	99597,4	110842,0	95788,8	54803,5
STABW	6492,6	4941,4	6170,8	6390,7	4353,7	5343,6
SEM	2295,5	1747,1	2181,7	2259,4	1539,2	1889,3
signifikant						
Ethanol						
Mittelwert	96948,5	103845,8	96134,5	113137,9	76081,5	57372,1
STABW	8510,6	12545,6	5978,9	4092,8	20392,3	3774,9
SEM	3008,9	4435,5	2113,9	1447,0	7209,8	1334,6
signifikant						
DMSO						
Mittelwert	85983,9	98314,5	92136,6	110032,6	76688,4	65509,6
STABW	3899,3	12730,5	10177,0	3451,1	18049,5	2142,2
SEM	1378,6	4500,9	3598,1	1220,1	6381,5	757,4
signifikant						
Troglitazon 5 µM						
Mittelwert	89107,0	106851,5	91173,6	111793,5	88321,0	58809,3
STABW	2299,1	6961,9	11993,7	3765,6	3968,5	4970,8
SEM	812,8	2461,4	4240,4	1331,3	1403,1	1757,4
signifikant						
APHA 1 µM						
Mittelwert	91443,0	100131,3	92603,3	113639,9	92620,0	62113,8
STABW	2632,5	7238,8	14040,4	3006,9	7631,9	3626,1
SEM	930,7	2559,3	4964,0	1063,1	2698,3	1282,0
signifikant						
Apicidin 200 nM						
Mittelwert	94797,0	105281,0	100001,4	115561,1	96435,4	58831,1
STABW	3763,7	7981,2	9750,1	2543,2	7443,8	2632,7
SEM	1330,7	2821,8	3447,2	899,2	2631,8	930,8
signifikant						
Mevinolin 100 µM						
Mittelwert	85976,4	105324,5	101166,3	109158,3	99067,4	68374,0
STABW	2419,7	4186,1	8237,7	4001,2	5216,7	4454,6
SEM	855,5	1480,0	2912,5	1414,6	1844,4	1574,9
signifikant	♦					♦

Arsentrioxid 2 µM						
Mittelwert	88946,5	104390,4	101993,3	109180,3	104916,9	83216,3
STABW	2024,4	9960,3	4787,3	10858,6	2809,4	6009,7
SEM	715,7	3521,5	1692,6	3839,1	993,3	2124,7
signifikant						●/■
all-trans-Retinsäure 1 µM						
Mittelwert	94497,8	104964,1	101160,8	99193,3	95031,4	96187,3
STABW	3778,3	6346,8	5808,0	8122,8	8665,3	7097,2
SEM	1335,8	2243,9	2053,4	2871,8	3063,6	2509,2
signifikant						●/■

**Tabelle 7**

Tabelle 7.1 zu Abb. 6

<sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 8).

Die <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe erfolgte 7 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe.

	6 h	24 h	48 h
<b>ohne Stimulation</b>			
Mittelwert	39243,6	103424,7	72141,1
STABW	7284,4	4450,8	16924,1
SEM	2575,4	1573,6	5983,6
signifikant			
<b>Methanol</b>			
Mittelwert	26886,1	80463,4	31006,0
STABW	2182,4	2117,6	26207,9
SEM	771,6	748,7	9265,9
signifikant			
<b>Ethanol</b>			
Mittelwert	10654,8	59867,6	53560,3
STABW	1127,8	13497,1	33837,8
SEM	398,7	4771,9	11963,5
signifikant			
<b>DMSO</b>			
Mittelwert	31974,6	97894,6	35643,6
STABW	3586,5	3062,5	29283,5
SEM	1268,0	1082,8	10353,3
signifikant			
<b>Troglitazon 5 µM</b>			
Mittelwert	516,5	36386,4	53289,9
STABW	406,0	2928,8	17413,3
SEM	143,5	1035,5	6156,5
signifikant	●/■	●/■	□
<b>APHA 1 µM</b>			
Mittelwert	33062,4	86408,6	25909,8
STABW	3404,0	2471,9	21880,0
SEM	1203,5	874,0	7735,7
signifikant			●
<b>Apicidin 200 nM</b>			
Mittelwert	41215,7	99091,4	39262,6
STABW	2476,6	3144,0	33664,5
SEM	875,6	1111,6	11902,2
signifikant			●
<b>5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM</b>			
Mittelwert	6902,6	20443,4	22131,1
STABW	1393,6	2241,4	2439,9
SEM	492,7	792,5	862,6
signifikant	●/■	●/■	●/□

Arsentrioxid 2 µM			
Mittelwert	9526,4	63400,0	80655,0
STABW	838,9	7975,5	23823,6
SEM	296,6	2819,8	8422,9
signifikant	●/■	●/■	
all-trans-Retinsäure 1 µM			
Mittelwert	4622,1	63829,1	93332,6
STABW	693,9	5578,5	3702,2
SEM	245,3	1972,3	1308,9
signifikant	●/■	●	■

**Tabelle 7.2 zu Abb. 8**

<sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 8).

Die <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe erfolgte 14 Tage nach der Zellaussaat und der Stimulanzienzugabe.

	6 h	24 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	34975,1	110938,3	40946,3
STABW	6963,5	5509,0	45777,5
SEM	2462,0	1947,7	16184,8
signifikant			
Methanol			
Mittelwert	34773,1	92533,5	35281,0
STABW	2009,3	3202,6	29406,4
SEM	710,4	1132,3	10396,7
signifikant			
Ethanol			
Mittelwert	28220,4	86438,0	32182,8
STABW	1187,7	1998,5	26785,4
SEM	419,9	706,6	9470,1
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	45840,8	112209,1	17762,1
STABW	2570,5	4113,5	29877,9
SEM	908,8	1454,4	10563,4
signifikant			
Troglitazon 5 µM			
Mittelwert	43084,4	111785,3	34767,5
STABW	2736,5	3555,8	36520,7
SEM	967,5	1257,2	12912,0
signifikant			■

APHA 1 $\mu$ M			
Mittelwert	48640,6	98370,6	15575,9
STABW	1255,2	3643,5	26706,4
SEM	443,8	1288,2	9442,1
signifikant	○		●
Apicidin 200 nM			
Mittelwert	39952,6	109692,1	36193,5
STABW	2255,8	3672,5	35284,5
SEM	797,5	1298,4	12475,0
signifikant			■
all-trans-Retinsäure 1 $\mu$ M			
Mittelwert	11366,9	69046,0	65943,6
STABW	244,1	1362,1	4845,3
SEM	86,3	481,6	1713,1
signifikant	●/■	●	●/■

**Tabelle 8**

<sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in cancerogene Thyreozyten der Zelllinie CGTH-W-1.

Angegeben sind die Mittelwerte, STABW und SEM (n = 8).

Die Zugabe des Akt Inhibitors erfolgte zum Zeitpunkt der Zellaussaat.

Die Zugabe von <sup>3</sup>H-Thymidin und Arsentrioxid erfolgte 2 Stunden nach der Zellaussaat.

Tabelle 8.1 zu Abb. 12

	24 h	30 h	48 h
<b>ohne Stimulation</b>			
Mittelwert	54577,4	54646,4	43054,5
STABW	10824,8	6650,4	16601,2
SEM	3827,1	2351,3	5869,4
signifikant			
<b>DMSO</b>			
Mittelwert	59583,4	60831,6	44198,0
STABW	3898,8	5174,2	15244,5
SEM	1378,4	1829,4	5389,7
signifikant			
<b>ohne Stimulation + ATO 2 µM</b>			
Mittelwert	53564,9	59916,6	48105,8
STABW	2459,9	1387,4	13686,3
SEM	869,7	490,5	4838,8
signifikant			
<b>Akt Inhibitor I 2 µM</b>			
Mittelwert	57017,6	61319,6	37516,1
STABW	3997,7	3818,5	11471,0
SEM	1413,4	1350,0	4055,6
signifikant			
<b>Akt Inhibitor I 5 µM</b>			
Mittelwert	58653,3	60682,0	49018,0
STABW	4059,5	5464,3	12336,9
SEM	1435,3	1931,9	4361,7
signifikant			
<b>Akt Inhibitor I 10 µM</b>			
Mittelwert	53539,6	60804,3	43209,4
STABW	3065,3	1316,9	8696,7
SEM	1083,8	465,6	3074,8
signifikant			
<b>Akt Inhibitor I 2 µM + ATO 2 µM</b>			
Mittelwert	50754,5	61433,0	43418,1
STABW	9891,2	967,3	8976,2
SEM	3497,1	342,0	3173,6
signifikant			
<b>Akt Inhibitor I 5 µM + ATO 2 µM</b>			
Mittelwert	51516,9	61344,3	52212,1
STABW	1166,5	1234,1	4611,1
SEM	412,4	436,3	1630,3
signifikant			

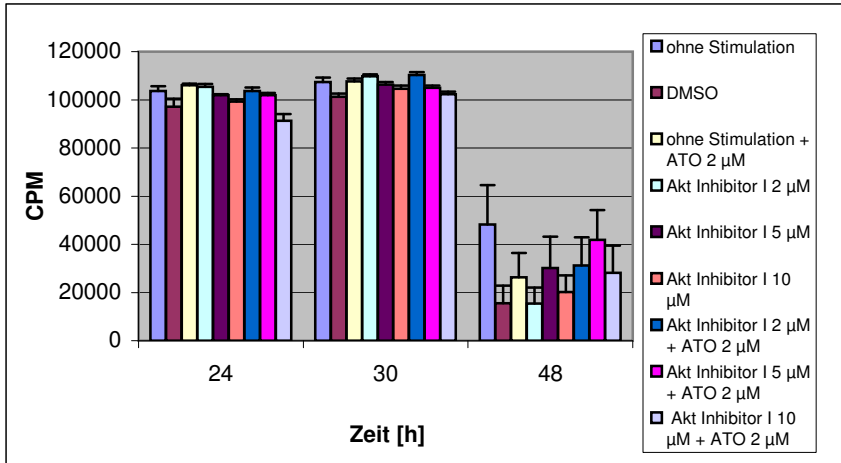


Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	34319,5	54321,3	42234,0
STABW	7223,0	1871,1	9607,1
SEM	2553,7	661,5	3396,6
signifikant	o/□		

Tabelle 8.2

	24 h	30 h	48 h
ohne Stimulation			
Mittelwert	103671,1	107394,3	48185,9
STABW	5504,9	5079,7	46441,2
SEM	1946,3	1795,9	16419,4
signifikant			
DMSO			
Mittelwert	97162,5	101214,5	15510,4
STABW	9315,4	3795,1	20657,3
SEM	3293,5	1341,8	7303,5
signifikant			
ohne Stimulation + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	106003,8	107618,4	26300,3
STABW	2115,0	3613,0	28518,0
SEM	747,8	1277,4	10082,7
signifikant			
Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M			
Mittelwert	105335,8	109703,4	15402,8
STABW	3457,0	2379,4	18907,7
SEM	1222,2	841,2	6684,9
signifikant			o/□
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M			
Mittelwert	101941,4	106308,5	30226,8
STABW	1090,2	3044,1	36699,8
SEM	385,5	1076,3	12975,3
signifikant			o/□
Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M			
Mittelwert	99328,1	104571,1	20254,4
STABW	2626,3	3658,7	19436,4
SEM	928,5	1293,5	6871,8
signifikant			□
Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	103611,4	110321,6	31190,5
STABW	4374,0	3467,8	33217,4
SEM	1546,4	1226,1	11744,1
signifikant			o/□
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M			
Mittelwert	101865,8	105021,0	41808,6
STABW	2934,0	2534,7	34948,3
SEM	1037,3	896,1	12356,1
signifikant			o/□

Akt Inhibitor I 10 $\mu\text{M}$ + ATO 2 $\mu\text{M}$			
Mittelwert	91232,1	102312,3	28161,4
STABW	7897,8	3059,5	31850,8
SEM	2792,3	1081,7	11261,0
signifikant			○/□



**Abb. 8.1:** Diagramm zu Tabelle 8.2.

**Tabelle 9**

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

**Tabelle 9.1 zu Abb. 14, 15 u. 16**

	24 h	48 h
ohne Stimulation	2,6	2,4
	3,5	1,6
	3,5	1,3
Mittelwert	3,2	1,7
STABW	0,5	0,6
SEM	0,3	0,3
Methanol	2,9	1,3
	2,8	1,6
	6,5	2,1
Mittelwert	4,1	1,7
STABW	2,1	0,4
SEM	1,2	0,2
Ethanol	8,9	1,6
	3,4	1,7
	4,6	1,8
Mittelwert	5,6	1,7
STABW	2,9	0,1
SEM	1,7	0,1

DMSO	2,7	1,6
	3,3	1,2
	3,4	2,1
Mittelwert	3,1	1,6
STABW	0,4	0,4
SEM	0,2	0,2
Troglitazon 5 $\mu$ M	3,3	1,7
	3,5	1,6
	3,3	1,4
Mittelwert	3,3	1,6
STABW	0,1	0,1
SEM	0,1	0,1
APHA 1 $\mu$ M	3,6	2,0
	3,8	1,1
	4,2	1,8
Mittelwert	3,9	1,6
STABW	0,3	0,5
SEM	0,2	0,3
Apicidin 200 nM	3,3	2,4
	3,5	2,4
	4,6	2,0
Mittelwert	3,8	2,2
STABW	0,7	0,2
SEM	0,4	0,1
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 $\mu$ M	4,1	1,9
	4,1	1,6
	3,3	1,7
Mittelwert	3,8	1,7
STABW	0,5	0,2
SEM	0,3	0,1
Mevinolin 100 $\mu$ M	19,2	15,4
	18,4	8,5
	18,1	9,7
Mittelwert	18,6	11,2
STABW	0,6	3,7
SEM	0,3	2,1
Arsentrioxid 2 $\mu$ M	6,9	1,7
	4,8	1,9
	5,9	1,7
Mittelwert	5,9	1,8
STABW	1,0	0,1
SEM	0,6	0,1

all-trans-Retinsäure 1 µM	4,1	1,9
	4,1	1,9
	4,4	1,9
Mittelwert	4,2	1,9
STABW	0,2	0,0
SEM	0,1	0,0
13-cis-Retinsäure 1 µM	29,7	21,1
	14,7	28,1
	19,7	27,7
Mittelwert	21,4	25,6
STABW	7,7	3,9
SEM	4,4	2,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 M	69,8	68,3
	85,0	66,9
	87,2	64,8
Mittelwert	80,7	66,6
STABW	9,5	1,7
SEM	5,5	1,0
Staurosporin 2,5 µM	11,0	21,1
	11,7	24,3
	18,0	25,0
Mittelwert	13,6	23,5
STABW	3,8	2,1
SEM	2,2	1,2

Tabelle 9.2

	24 h	48 h
ohne Stimulation	7,7	4,2
	5,3	5,7
	6,0	6,2
Mittelwert	6,3	5,4
STABW	1,2	1,1
SEM	0,7	0,6
Methanol	5,2	8,5
	4,7	7,3
	11,6	7,4
Mittelwert	7,2	7,8
STABW	3,9	0,7
SEM	2,2	0,4

Ethanol	5,1	8,2
	4,1	4,8
	8,3	5,9
Mittelwert	5,8	6,3
STABW	2,2	1,7
SEM	1,3	1,0
DMSO	4,3	6,2
	3,5	5,8
	4,7	6,5
Mittelwert	4,2	6,2
STABW	0,6	0,4
SEM	0,4	0,2
Troglitazon 5 µM	4,6	8,9
	3,6	10,5
	7,9	9,7
Mittelwert	5,3	9,7
STABW	2,2	0,8
SEM	1,3	0,5
APHA 1 µM	4,3	10,5
	4,9	11,2
	7,0	9,9
Mittelwert	5,4	10,5
STABW	1,4	0,6
SEM	0,8	0,4
Apicidin 200 nM	6,2	7,4
	5,5	8,7
	7,9	6,7
Mittelwert	6,5	7,6
STABW	1,2	1,0
SEM	0,7	0,6
5-Aza-2'-deoxycytidin 0,5 µM	4,3	7,5
	4,4	8,5
	5,4	8,8
Mittelwert	4,7	8,2
STABW	0,6	0,7
SEM	0,3	0,4
Mevinolin 100 µM	9,3	18,5
	11,5	17,5
	10,6	17,5
Mittelwert	10,4	17,8
STABW	1,1	0,5
SEM	0,6	0,3

Arsentrioxid 2 $\mu\text{M}$	16,4	30,0
	16,5	19,1
	10,6	40,9
Mittelwert	14,5	30,0
STABW	3,4	10,9
SEM	2,0	6,3
all-trans-Retinsäure 1 $\mu\text{M}$	6,9	10,6
	5,8	16,4
	6,5	15,5
Mittelwert	6,4	14,2
STABW	0,5	3,2
SEM	0,3	1,8
$\text{H}_2\text{O}_2$ 1 M	84,7	53,6
	91,8	62,6
	86,7	50,6
Mittelwert	87,7	55,6
STABW	3,6	6,2
SEM	2,1	3,6
Staurosporin 2,5 $\mu\text{M}$	24,5	40,8
	28,1	48,5
	27,7	40,7
Mittelwert	26,8	43,3
STABW	2,0	4,4
SEM	1,1	2,6

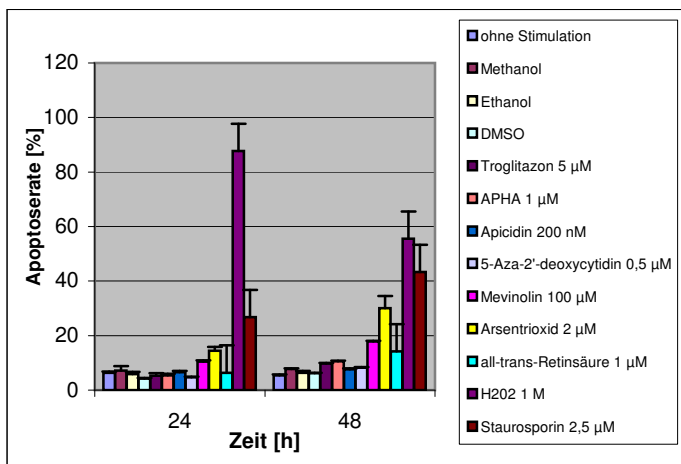


Abb. 9.1: Diagramm zu Tabelle 9.2.

Tabelle 9.3 zu Abb. 17, 18 u. 19

	24 h	48 h
ohne Stimulation	2,8	2,4
	2,5	4,5
	2,1	3,4
Mittelwert	2,5	3,4
STABW	0,4	1,1
SEM	0,2	0,6
DMSO	2,1	2,4
	2,2	3,3
	2,1	2,9
Mittelwert	2,1	2,9
STABW	0,1	0,5
SEM	0,0	0,3
ohne Stimulation + ATO 2 $\mu$ M	2,6	2,2
	2,1	2,1
	2,2	1,7
Mittelwert	2,3	2,0
STABW	0,2	0,2
SEM	0,1	0,1
Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M	2,5	1,9
	2,1	2,7
	2,6	2,0
Mittelwert	2,4	2,2
STABW	0,3	0,5
SEM	0,2	0,3
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M	2,3	3,5
	2,7	2,2
	2,5	2,4
Mittelwert	2,5	2,7
STABW	0,2	0,7
SEM	0,1	0,4
Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M	4,4	3,6
	4,4	2,7
	3,5	4,0
Mittelwert	4,1	3,4
STABW	0,5	0,7
SEM	0,3	0,4

Akt Inhibitor I 2 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M	2,6	2,3
	2,9	2,6
	2,5	2,1
Mittelwert	2,7	2,3
STABW	0,2	0,2
SEM	0,1	0,1
Akt Inhibitor I 5 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M	2,5	2,9
	3,2	2,3
	3,0	3,3
Mittelwert	2,9	2,8
STABW	0,4	0,5
SEM	0,2	0,3
Akt Inhibitor I 10 $\mu$ M + ATO 2 $\mu$ M	10,9	30,9
	13,2	27,1
	12,8	24,9
Mittelwert	12,3	27,6
STABW	1,3	3,0
SEM	0,7	1,7
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 1 M	14,2	41,5
	11,1	64,8
	15,0	50,3
Mittelwert	13,4	52,2
STABW	2,1	11,8
SEM	1,2	6,8
Staurosporin 2,5 $\mu$ M	13,7	39,7
	11,2	33,8
	12,1	38,7
Mittelwert	12,3	37,4
STABW	1,3	3,2
SEM	0,7	1,8



## **8. Literatur**

Adrián M. Ramos, Carlos Fernández, Donna Amrán, Patricia Sancho, Elena de Blas, Patricio Aller

(2005) Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukaemia cells  
The American Society of Hematology, 105: 4013-4020

Bell E., Grünwald F.

(2000) Radioiodtherapie bei benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen  
Springerverlag, Berlin, Heidelberg, New York

Beyer C.

(2004) Untersuchungen an kultivierten Thyreozyten  
Inaug. Dissertation, Universität Tübingen

Blaheta RA., Michaelis M., Hernáiz Driever P., Cinatl J. Jr.,

(2004) The evolving anticancer drug valproic acid : Insights into the mechanism and clinical studies. Med Res Rev in press

Cao X. X., Mohuiddin I., Ece F., McConkey D. J.,  
Smythe W. R., Respir Am. J.

(2001)  
Cell Mol. Biol., 25, 562 – 568

Cinatl J. Jr., Cinatl J., Hernáiz Driever P., Kotchetkov R., Pouckova P., Kornhuber B., Schwabe D.

(1997) Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells.  
Anticancer Drugs, 8: 958-63

Cinatl J. Jr., Cinatl J., Scholz M., Hernáiz Driever P., Henrich D., Kabickova H., Vogel JU., Doerr HW., Kornhuber B.

(1996) Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. Anticancer Drugs, 7: 766-73

Clement JJ.

(2002) Immunhistochemischer Apoptosenachweis von Regulatorproteinen beim Ulcus cruris venosum  
Inaug. Dissertation, Universität Freiburg

Crisby M., Nordin-Fredriksson G., Shah PK., Yano J., Zhu J., Nilsson J.,

(2001) Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization  
Circulation. 103: 926-933

Dai G., Levy O., Carrasco N.

(1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter  
Nature 379: 458-460

- De la Vieja A., Dohan O., Levy O., Carrasco N.  
(2000) Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology  
Physiological Reviews 80: 1083-1105
- Di Matola T., D'Ascoli F., Luongo C., Bifulco M., Rossi G., Fenzi G., Vitale M.  
(2001) Lovastatin-induced apoptosis in thyroid cells: involvement of cytochrome C and lamin B  
Eur J Endocrinol., 145(5):645-50
- Donato LJ., Noy N.  
(2005) Suppression of mammary carcinoma growth by retinoic acid: proapoptotic genes are targets for retinoic acid receptor and cellular retinoic acid-binding protein II signalling  
Cancer Res., 65(18): 8193-9
- Esteller M., Avizienyte E., Corn PG., Lothe RA., Baylin SB., Aaltonen LA., Herman JG.  
(2000) Epigenetic inactivation of LKB 1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome  
Oncogene, 19(1): 164-8
- Eto M., Kozai T., Cosentino F., Joch H., Luscher TF.,  
(2002) Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways  
Circulation, 105: 1756-1759
- Fischer S. M.  
(2005) Untersuchungen an humanen Thyreozyten und nicht transformierten Schweinethyreozyten  
Inaug. Dissertation, Universität Tübingen
- Fröhlich E., Wahl R.  
(1999) Effects of retinol on follicular porcine thyrocytes in culture  
J Mol Med, 77(1): 189-92
- Fujiwara H., Tatsumi K., Miki K., Harada T., Mikai K., Takai S-I und Amino N.  
(1997)  
Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter  
Nature Genetics, 16: 124-125
- Fujiwara H., Tatsumi K., Miki K., Harada T., Okada S., Nose O., Kodama S. und Amino N. (1998)  
Recurrent T354P mutation of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in patient with iodide transport defect  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83, 2940-2943

Funkumoto Y., Libby P., Rabkin E., Hill CC., Enomoto M., Hirouchi Y., Shiomi M., Aikawa M.

(2001) Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits  
Circulation, 103: 993-999

Gerard AC., Daumerie C., Mestdagh C., Gohy S., De Burbure C., Costagliola S., Miot F., Nollevaux MC., Deneff JF., Rahier J., Franc B., De Vijder JJ., Colin IM., Many MC.

(2003) Correlation between the loss of thyroglobulin iodination and the expression of thyroid-specific proteins involved in iodine metabolism in thyroid carcinomas  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 88(10):4977-83

Goldstein JL., Brown MS.

(1990) Regulation of the mevalonate pathway  
Nature, 343: 425-430

Hristov Mihail

(2003) Vergleichende Untersuchung der Wirkung verschiedener HMG-CoA Reduktase Inhibitoren auf die Apoptose normaler und neointimaler Gefäßmuskelzellen  
Inaug. Dissertation, Universität München

Iwata M., Mukai M., Nakai J., Iseki S.

(1992) Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes  
Immunol., 149: 3302-8

Janka H. U.

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

Kouraklis G., Theocharis S.

(2002) Histone deacetylase inhibitors and anticancer therapy  
Curr Med Chem Anticancer Agents, 2(4): 477-84

Kranzfelder M.

(2005) Orale versus intravenöse Radioiodtherapie bei Unifokaler Autonomie und Morbus Basedow  
Inaug. Dissertation, Universität Würzburg

Landenberger C.

(2005) Untersuchungen an humanen Thyrozyten und humanen transformierten Thyrozyten  
Inaug. Dissertation, Universität Tübingen

O. H. Kramer, M. Gottlicher, T. Heinzel

(2001)  
Trends Endocrinol. Metab. 2001, 12, 294 – 300

- Kosugi S., Inoue S., Matsuda A. und Jhang SM. (1998)  
 Novel missense and loss of function mutation in the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect in three Japanese patients  
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 83: 3373-3376
- Kwon S. H., Ahn S. H., Kim Y. K., Bae G.-U., Yoon J. W., Hong S., Lee H. Y., Lee Y.-W., Lee H.-W., Han J.-W.  
 (2001)  
 J. Biol. Chem., 276, 2073 – 2080
- Laufs U., Marra D., Node K., Liao JK.,  
 (1999) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27  
 J Biol Chem., 274: 21926-21931
- Libby P., Aikawa M.  
 (2003) Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability  
 Clin. Cardiol., 26: 11-14
- Lin et al.  
 (1995) In Vitro Cell Dev. Biol. 31A: 819-821
- Lipinski M. M., Jacks T.,  
 (1999) The retinoblastoma gene family in differentiation and development  
 Oncogene, 18, 7873 – 7882
- Marks P. et al.  
 (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies.  
 Nat. Rev. Cancer, 1, 194-202
- May et al.  
 (2002) Mixed hepatocellular-cholestatic liver injury after pioglitazone therapy  
 Ann Intern Med, 136(6): 449-52
- Matsuda A. und Kosugi S. (1997)  
 A homozygous missense mutation of the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect  
 Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 82: 3966-3971
- Michaelis M., Michaelis UR., Fleming I., Suhan T., Cinatl J., Blaheta RA., Hoffmann K., Kotchetkov R., Busse R., Nau H., Cinatl J. Jr.  
 (2004) Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo  
 Mol Pharmacol, 65: 520-7

- Michaelis M., Suhan T., Cinatl J., Hernáiz Driever P., Cinatl J. Jr.  
 (2004) Valproic acid and interferon-alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo  
 Int J Oncol, 25: 1795-9
- Nagy L., Thomazy VA., Shipley GL., Fesus L., Lauph W., Heyman RA., Chandraratna RA., Davies PJ.  
 (1995) Activation of Retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines  
 Mol. Cell. Biol., 15(7): 3540-51
- Nau H.,  
 (1992) Teratogenesis, transplacental pharmacokinetics and metabolism of some retinoids in the mouse, monkey and human.  
 In: Retinoids. Progress in Research and Clinical Applications (Livrea, M.A. & Packer, L., eds), pp. 599-615. Maral Dekker, New York
- Neal Rosen, Qing-Bai She  
 (2006) AKT and cancer-Is it all mTOR  
 Cancer cell, 254-256
- Niu C., Yan H., Sun H. P., Liu J-X., Gu B. W., Su X-Y., Cao Q., Waxmann S., Chen Z., Chen S. J., Shen Z. X., Wang Z. Y.  
 (1998) Treatment of de novo and relapsed acute promyelocytic leukemia patients with arsenic trioxide  
 Blood, 92 (Suppl. 1): 678a
- Niu C., Yan H., Yu T., Sun H-P., Liu J-X., Li X-S., Wu W., Zhang F-Q., Chen Y., Zhou L., Li J-M., Zeng X-Y., Ou Yang R-R., Yuan M-M., Ren M-Y., Gu F-Y., Cao Q., Gu B-W., Su X-Y., Chen G-Q., Xiong S-M., Zhang T-D., Waxman S., Wang Z-Y., Chen Z., Hu J., Shen Z-X., Chen S-J.  
 (1999) Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients  
 Blood, 94: 3315-3324
- Ortego M., Bustos C., Hernandez-Presa MA., Tunon J., Diaz C., Hernandez G., Egado J.  
 (1999) Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells  
 Atherosclerosis, 147: 253-361
- Pession U.  
 (2001) Wachstumshemmende Wirkung von Iodid und Natrium-Iodid-Symporter-Expression in Schilddrüsenknoten mit gesteigerter oder verminderter Jodidspeicherung  
 Inaug. Dissertation, Ruhr-Universität Bochum
- Piel R. A.  
 (2005) Untersuchungen an humanen Thyreozyten und nicht transformierten Schweinethyreozyten  
 Inaug. Dissertation, Universität Tübingen

- Pohlenz J., Medeiros-Neto G., Gross J.L., Silveiro S.P., Knobel M. und Refetoff S. (1997)  
Hypothyroidism in a Brazilian kindred due to iodide trapping defect caused by a homozygous mutation in the sodium/iodide symporter gene  
Biochemical and Biophysical Research Communications 240: 488-491
- Pohlenz J., Rosenthal I., Weiss R.E. und Refetoff S. (1997)  
Hypothyroidism due to iodide trapping defect caused by mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) gene  
Thyroid 7 (Suppl. 1): 108
- Reinwein D., Benker G.  
(1996) Endokrinologie und Stoffwechsel,  
Thieme Verlag, 159
- Riedel C., Levy O., Carrasco N.  
(2001) Post-transcriptional Regulation of the Sodium/Iodide Symporter by Thyrotropin  
J. Biol. Chem., Vol. 276, Issue 24, 21458-21463
- Ringel M.D.; N. Hayre, J. Saito, B. Saunier, F. Schuppert, H. Burch, V. Bernet, K.D. Burman, L.D. Kohn, M. Saji  
(2001) Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma  
Cancer Res 61: 6105-6111
- Roth et al.  
(2006) Antidiabetikum bekämpft Krebszellen-Neuzulassung von Troglitazon zur Krebsbehandlung?  
Neues Leben
- Ruefli A. A., Ausserlechner M. J., Bernhard D., Sutton V. R., Tainton K. M., Kofler R., Smyth M. J., Johnstone R. W.  
(2001)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 10833 – 10838
- Ruff H.  
(2003) Identifizierung von spezifischen Methylierungsmustern in Zelllinie der akuten myeloischen Leukämie  
Inaug. Dissertation, Universität Ulm
- Ruiz-Arguelles G.J., Morales-Toquero A., Gomez-Rangel J.D., Lopez-Martinez B., Ruiz-Delgado G.J., Reyes-Nunez V.  
(2005) Treatment of acute promyelocytic leukemia: a single institution experience  
Rev Invest Clin, 57(3): 415-9
- Schmutzler C.  
(2002) Redifferenzierung von Schilddrüsenkarzinomzellen mit Retinsäure  
Aktuelle Forschungsprojekte

- Schwettmann L.  
(2001) Rekombinantes ADAM 9: Proteolytische Aktivität und Vorkommen in benignen und malignen Geweben  
Inaug. Dissertation, Universität Bielefeld
- Seljeftot I., Tonstad S., Hjerremann I., Arnesen H.  
(2002) Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease  
Thromb Res., 285-290
- Shen Z-X., Chen G-Q., Ni J-H., Li X-S., Xiong S-M., Qiu Q-Y., Zhu J., Tang W., Sun G- L., Yang K-Q., Chen Y., Zhou L., Fang Z-W., Wang Y-T., Ma J., Zhang P., Zhang T-D., Chen Z., Wang Z-Y.  
(1997) Use of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients  
Blood, 89: 3354-3360
- Simon D., Köhrle J., Schmutzler C., Mainz K., Reiners C., Rohrer HD.  
(1996) Redifferentiation therapy of differentiated thyroid carcinoma with Retinoic acid: basics and first clinical results  
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, 104 Suppl. 4: 13-5
- Simon D., Körber C., Krausch M., Segering J., Groth P., Görges R., Grünwald F., Müller M., Gärtner HW., Schmutzler C., Köhrle J., Röher HD., Reiners C.  
(2002) Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study  
European Journal of Nuclear Medicine, 29(6): 775-782
- Sindermann JR., Fan L., Weigel KA., Troyer D., Muller JG., Schmidt A., March KL., Breithardt G.  
(2000) Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture  
Atherosclerosis, 150: 331-341
- Smanik PA., Liu Q., Furminger TL., et al.  
(1996) Cloning of the human sodium iodide symporter  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 226: 339-345
- Smanik PA., Ryu K-Y, Theil KS., Mazzaferri EL., Jhiang SM.  
(1997) Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter  
Endocrinology 138: 3555-3558
- Sorm F., Vesely J.  
(1968) Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice  
Neoplasma, 15(4): 339-43

- Spitzweg C.  
(2007) Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS): Bedeutung für die Bildgebung und therapeutische Optionen  
Der Nuklearmediziner; 30: 19-30
- Strandberg TE., Vanhanen H., Tikkanen MJ.,  
(1999) Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease  
Lancet, 353: 118-119
- Stresemann C., Brueckner B., Musch T., Stopper H., Lyko F.  
(2006) Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines  
Cancer Res., 66(5): 2794-800
- Sun H. D., Ma L., Hu X-C., Zhang T-D.  
(1992) Treatment of 32 cases of acute promyelocytic leukemia  
Chinese Journal of Integrated Chinese and Western Medicine, 12: 170-172
- Suzuki T., Yokozaki H., Kuniyasu H., Hayashi K., Naka K., Ono S., Ishikawa T., Tahara E., Yasui W.  
(2000)  
Int. J. Cancer, 88, 992 – 997
- Van Herle A. J., Agatep M. L., Padua D. N. III, Totanes T. L., Canlapan D. V., Van Herle H. M. L., Juillard G. J. F.  
(1990) Effects of 13 cis-Retinoic Acid on Growth and Differentiation of Human Follicular Carcinoma Cells (UCLA RO 82 W-1) in Vitro  
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 90: 7103-0755
- Verspohl E. J., Weiland F.  
(2002) Insulinsensitizer  
Pharmazie in unserer Zeit, 280-292
- Vrana J. A., Decker R. H., Johnson C. R., Wang Z., Jarvis W. D., Richon V. M., Ehinger M., Fisher P. B., Grant S.  
(1999) Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-xL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53  
Oncogene, 18, 7016 – 7025
- Weidle U. H., Grossmann A.  
(2000) Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment  
Anticancer Res., 20, 1471 –1485
- Wiesbauer F., Kaun C., Zorn G., Maurer G., Huber K., Wojta J.  
(2002) HMG CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins  
Br J Pharmacol, 135: 284-292



- Willhite CC., Wier PJ, Berry DL  
(1989) Dose-response and structure-activity considerations in retinoid-induced dysmorphogenesis  
Crit. Rev. Toxicol. 20: 113-135
- Wilson H. Miller Jr., Hyman M. Schipper, Janet S. Lee, Jack Singer, Samuel Waxman  
(2002) Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide  
Cancer Research 62, 3893-3903
- Wolff J. (1983)  
Congenital goiter with defective iodide transport  
Endocrinology Review 4: 240-254
- Yasunari K., Maeda K., Minami M., Yoshikawa J.  
(2001) HMG-CoA reductase inhibitors prevent migration of human coronary smooth muscle cells through suppression of increase in oxidative stress  
Arterioscler Thromb Vasc Biol., 21: 937-942
- Yu J., Qiao L., Zimmermann L., Ebert MP., Zhang H., Lin W., Rocken C., Malferteiner P., Farrell GC.  
(2006) Troglitazone inhibits tumor growth in hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo  
Hepatology, 43(1): 134-43
- Yun-Jung Choi, Jong-Wook Park, Seong-II Suh, Kyo Cheol Mun, Jae Hoon Bae, Dae-Kyo Song, Sang-Pyo Kim, Taeg Kyu Kwon  
(2002) Arsenic trioxide-induced apoptosis in U397 cells involve generation of reactive oxygen species and inhibition of Akt  
International journal of oncology 21: 603-610
- Zhang O., Mills KJ., Dawson MI., Collins SJ., Jetten AM.  
(1995) Evidence of the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signalling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids  
J. Biol. Chem., 270: 6022-9
- Zhu Chen, Mount Sinai, et al.  
(2004) Arsentrioxid mit ATRA führt bei APL zu hoher Remission und weniger Rezidiven  
Leukämie-online.de

## **9. Danksagung**

Mein besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. R. Wahl und an Frau Prof. Dr. E. Fröhlich für die Überlassung des Themas. Ihnen beiden bin ich sehr dankbar dafür, dass sie mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Frau Inge Fink möchte ich für die nette Betreuung 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, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen.

Auch Frau Dr. Herberts vom Institut für Medizinische Biometrie gebührt mein Dank für die statistische Beratung.

Zuletzt möchte ich mich noch recht herzlich bei meiner Familie, besonders bei meinem Bruder Marc für die Hilfe bei Computerfragen, bedanken.

## Lebenslauf

**Name:** Diana Hilbert

**Geburtsdatum:** 21.09.1977

**Geburtsort:** Hechingen

**Eltern:** Monika Hilbert, Angestellte  
Bruno Hilbert, verstorben

**Geschwister:** Tatjana Miller, Erzieherin  
Marc Hilbert, Dipl. Ingenieur für Fahrzeugtechnik

**Schulbildung:** von September 1984 – Juli 1988 Besuch der Kreuzerfeld  
Grundschule in Rottenburg.  
von September 1988 – Juli 1997 Besuch des Eugen-Bolz-  
Gymnasiums in Rottenburg mit Abschluss der allgemeinen  
Hochschulreife

**Berufsausbildung:** von April 1998 – März 2001 Ausbildung an der staatlich  
anerkannten Lehranstalt für technische Assistenten in der  
Medizin

**Berufsausübung:** von April 2001 – Februar 2002 Arbeit als Medizinisch  
Technische Assistentin am Universitätsklinikum Tübingen

**Studium:** vom SS 2002 – SS 2007 Studium der Zahnmedizin an der  
Universität Tübingen  
Naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 2003  
Zahnärztliche Vorprüfung im September 2004  
Staatsexamen am 23.11.2007