

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

**Der Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf den
¹²⁵I-Iod- und ³H-Thymidinstoffwechsel von
kultivierten Thyreozyten**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
ADAM LIHS
aus Knurow/Schlesien**

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wahl

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. E. Fröhlich

Die Zeit kommt aus der Zukunft, die nicht existiert, in die Gegenwart, die keine Dauer hat, und geht in die Vergangenheit, die aufgehört hat zu bestehen.

Aurelius Augustinus

Meiner Familie in Liebe gewidmet.

Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-------------|--|
| Abb. | - Abbildung |
| AP | - Alkalische Phosphatase |
| Bq | - Becquerel, 1 Zerfall pro Sekunde |
| BRD | - Bundesrepublik Deutschland |
| C | - Celsius |
| cAMP | - zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat |
| c-myc | - Oncoprotein c-myc (Gen auf Chromosom 8q24) |
| DPM | - disintegrations per minute |
| CPM | - counts per minute |
| EGF | - epidermal growth factor |
| HMBA | - Hexamethylenbisacetamid |
| IGF I | - insuline-like growth factor |
| TGF β | - transforming growth factor β |
| G | - Gravitation, Erdbeschleunigung |
| g | - Gramm, 10^{-3} Kilogramm |
| mg | - Milligramm, 10^{-6} Kilogramm |
| μ g | - Mikrogramm, 10^{-9} Kilogramm |
| h | - Stunde |
| JMP | - Statistikprogramm von SAS |
| kBq | - Kilo-Becquerel |
| l | - Liter |
| M | - molar |
| MELC | - murine Erythroleukämiezellen |
| min | - Minute |
| ml | - Milliliter, 10^{-3} Liter |
| mM | - millimolar, 10^{-3} molar |
| mmol | - Millimol, 10^{-3} Mol |
| mRNA | - messenger Ribonukleinsäure |
| mU | - Milliunit |
| μ l | - Mikroliter, 10^{-6} Liter |

| | |
|-----------|--|
| μM | - mikromolar |
| n | - Anzahl der Proben |
| NADPH | - Nicotinamidadenindinucleotidphosphat |
| NIS | - Natrium-/Iodid-Symporter |
| p | - statistische Wahrscheinlichkeit |
| PPARgamma | - peroxisome proliferator activated receptor gamma |
| PS | - Phosphatidylserin |
| s | - Sekunde |
| SD | - Standardabweichung |
| SEM | - Standard Error of the Mean, Mittlerer Fehler des Mittelwerts |
| Tab. | - Tabelle |
| TGF β | - Transforming growth factor β |
| TSH | - Thyreoidea-stimulierendes Hormon, Thyreotropin |
| U | - Unit |
| mU | - Milliunit, 10 ⁻³ Unit |
| Vit. A | - Vitamin A |
| Vol.% | - Volumen-Prozent |

Inhaltsverzeichnis

| | Seite |
|--|-----------|
| Einleitung | 9 |
| 1. Material | 17 |
| 1.1 Geräte für die Zellkulturen | 17 |
| 1.2 Geräte zur Messung der Radioaktivität | 17 |
| 1.3 Medien und Reagenzien | 18 |
| 1.4 Annexin V-Test / Facsanalyse | 19 |
| 2. Methoden | 20 |
| 2.1 Präparation der Schweineschilddrüsen | 20 |
| 2.2 Zellauszählung | 21 |
| 2.3 Herstellung der Thyreozytenkulturen und deren Stimulation mit TSH und Hexamethylenbisacetamid | 22 |
| 2.4 Kulturbedingungen | 23 |
| 2.5 Zell-Ernte | 23 |
| 2.6 Annexin V-Test und Facsanalyse | 24 |
| 2.6.1 Prinzip des Annexin V-Tests | 24 |
| 2.6.2 Herstellung der Zellkulturen für den Annexin V-Test | 24 |
| 2.6.3 Kulturen, die mit Annexin V untersucht wurden | 24 |
| 2.6.4 Zellaufbereitung / Zellernte für die Facsanalyse | 25 |
| 2.7 Statistische Auswertung | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3. Ergebnisse | 27 |
| 3.1 Radioiodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, kultiviert in retinolhaltigem und retinolfreiem NCTC-135 Medium | 27 |
| 3.1.1 Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen und der Inkubationsdauer | 27 |
| 3.1.2 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Thiamazol und HMBA | 35 |
| 3.1.3 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Perchlorat und in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen | 44 |
| 3.1.4 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von HMBA (2 mM) und unterschiedlicher TSH-Konzentrationen | 52 |
| 3.1.5 ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von HMBA (6 mM) und unterschiedlicher TSH-Konzentrationen | 57 |
| 3.2 ³ H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, kultiviert in retinolhaltigem und retinolfreiem NCTC-135 Medium | 61 |
| 3.2.1 ³ H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von der HMBA-Konzentration und dem Stimulationszeitpunkt | 61 |
| 3.2.2 ³ H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Thiamazol (2 mM) und von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen | 69 |
| 3.2.3 ³ H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Perchlorat und unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen | 77 |
| 3.2.4 ³ H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von 2 mM HMBA und unterschiedlichen TSH-Konzentrationen | 85 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 3.2.5 | ³ H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von 6 mM HMBA und von unterschiedlichen TSH-Konzentrationen | 89 |
| 3.3 | Beeinflussung der Apoptose von Thyreozyten | 93 |
| 4. | Diskussion | 97 |
| 4.1 | Methoden | 97 |
| 4.2 | ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Thyreozyten, kultiviert in retinolfreiem oder retinolhaltigem Medium, unter dem Einfluss von HMBA, Thiamazol und Perchlorat in Abhängigkeit von TSH und Retinol | 99 |
| 4.2.1 | ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen | 99 |
| 4.2.2 | ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von HMBA, Thiamazol und Perchlorat | 101 |
| 4.2.3 | ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von HMBA und in Abhängigkeit von TSH | 104 |
| 4.3 | ³ H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten, kultiviert in retinolhaltigem und retinolfreiem NCTC-135 Medium, unter dem Einfluss von HMBA, Perchlorat und Thiamazol in Abhängigkeit von TSH und Retinol | 106 |
| 4.3.1 | ³ H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen | 106 |
| 4.3.2 | ³ H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von HMBA, Thiamazol und Perchlorat | 107 |
| 4.3.3 | ³ H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten in Abhängigkeit von HMBA und von TSH | 109 |
| 4.4 | Beeinflussung der Apoptoserate von Thyreozyten durch HMBA, Staurosposin und TSH | 112 |

| | | |
|-----------|------------------------|------------|
| 5. | Zusammenfassung | 115 |
| 6. | Anhang | 118 |
| 7. | Literatur | 155 |

Einleitung

Für die Steuerung der Schilddrüse ist eine Reglerkaskade, bestehend aus dem Hypothalamus mit seiner Sekretion von Thyreotropin releasing hormone (TRH) und der Hypophyse mit ihrer TSH-Sekretion verantwortlich. Der Sollwert der Euthyreose wird beim Gesunden durch die Schilddrüse eingestellt, die als Stellglied dieser Kaskade fungiert.

Lange Zeit wurde geglaubt, dass allein der feed-back-Mechanismus zwischen Schilddrüse und übergeordneten Zentren für die Strumaentstehung, die mit möglicher maligner Entartung einhergehen kann, verantwortlich ist. Danach sollte als Reaktion auf den Iodmangel die verminderte Schilddrüsenhormonproduktion über eine verstärkte Ausschüttung von TSH zu einer Struma führen. Nach heutigen Ansichten zur Entstehung der Iodmangelstruma und ihren Folgeerkrankungen erscheint es jedoch als offensichtlich, dass TSH eher für die Differenzierung und Steuerung der zellulären Funktion zuständig ist, während für die Proliferation wachstumsfördernde Faktoren, wie der Insulin-like growth factor I (IGF I) und der Epidermal growth factor (EGF), der überwiegend von Malignomzellen gebildet wird, verantwortlich gemacht werden (Jockenhövel, 1993; Gärtner, 1992). Diese in der Schilddrüse gebildeten Faktoren sind in der Lage parakrin auf das Stromagewebe einzuwirken. Iodid kann die autokrine IGF I-Bildung der Schilddrüsenzellen verringern oder sogar vollständig blockieren (Hofbauer et al., 1995). In isolierten intakten Schilddrüsenfollikeln mit normalem Iodgehalt ist ex vivo ein TSH induziertes Wachstum nicht möglich (Greil et al., 1985). Im Gegensatz dazu können isolierte Schilddrüsenzellen mit TSH zu einem Wachstum angeregt werden (Roger et al., 1982, 1983, 1988; Smith et al., 1987). EGF ist ein entdifferenzierender Wachstumsfaktor, der in vitro die gesamten spezifischen Funktionen der Thyreozyten hemmt (Arai et al. 1995; Bechtner et al., 1996; Dumont et al., 1991; Kraiem et al., 1995). Da EGF in vivo nur von maligne transformierten Schilddrüsenzellen exprimiert wird, spielt es bei der benignen Iodmangelstruma keine oder nur eine untergeordnete Rolle (Roger und Dumont, 1995).

Iodid, welches nicht nur in Schilddrüsenhormone, sondern auch in intrathyreoidale Steuersubstanzen, die sich von Membranlipiden ableiten, eingebaut wird, scheint heute im Mittelpunkt all dieser Regulationsmechanismen zu stehen. Zu diesen iodhaltigen Steuersubstanzen gehören das δ -Iodolacton und α -Iodohexadecanal. Die Hemmung der Schilddrüsenhormonsynthese erfolgt vor allem durch das α -Iodohexadecanal, welches die Adenylatzyklase, die Thyreoperoxidase und die NADPH-oxidase hemmt. Diese Inhibition kommt erst bei sehr hohen Iodkonzentrationen zum Tragen (Gärtner, 1993). δ -Iodolacton inhibiert die Proteinkinase C und das Wachstum, indem es die Synthese des wachstumsinhibierenden Transforming growth factor β (TGF β) fördert. Die inverse Korrelation des TGF β zum intrathyreodalen Iodgehalt wurde von Grubeck-Loebenstein (1989) beschrieben. In Iodmangelgebieten wie der BRD liegt die Strumainzidenz weitaus höher als in Gebieten, in denen eine adequate Iodversorgung herrscht. Neben der Struma kann im Gefolge eines alimentären Iodmangels eine Anzahl weiterer Schilddrüsenerkrankungen auftreten, zu denen auch das Malignom der Schilddrüse gerechnet wird.

Die Aufnahme von Iodid und sein Einbau in Schilddrüsenhormone ist bei maligne transformierten Schilddrüsenzellen meist nicht mehr möglich. Es wäre somit von grosser therapeutischer Bedeutung, wenn maligne Zellen durch eine Wiederherstellung der Iodidaufnahme einer Strahlentherapie mit Radioiodid zugänglich gemacht werden könnten. Deshalb haben zahlreiche Forschungsprojekte zum Ziel, Differenzierungssubstanzen zu finden, die die Iodaufnahme in maligne transformierte Schilddrüsenzellen wieder ermöglichen. Eine Stoffgruppe solcher Substanzen sind die Retinoide. Sie sind in der Lage, die Radioiodaufnahme insbesondere bei follikulären Schilddrüsenmalignomen, wiederherzustellen und diese somit einer Strahlentherapie zugänglich zu machen (Simon et al., 1996).

Eine vielversprechende Differenzierungssubstanz ist das Hexamethylenbisacetamid (HMBA). Abb. 1 zeigt seine Struktur. Diese Substanz stellt einen terminalen Differenzierungsfaktor in murinen Erythroleukämiezellen (MELC) dar (Breslow et al., 1991; Marks und Rifkind, 1984; Marks et al., 1989; Reuben et

al., 1976, 1978). In diesem MELC-System supprimiert HMBA das Tumorwachstum (Friend et al., 1971; Marks et al., 1987; Reuben et al., 1976) und führt zur Expression von bestimmten Genen, wie dem Hämoglobingen (Fibach et al., 1977).

Die exakte Funktionsweise von HMBA ist jedoch immer noch unbekannt, sowohl bei der Behandlung der murinen Erythroleukämiezellen (MELC) als auch bei der der HAT-29- und HL-60-Zelllinien (Friend et al., 1971; Reuben et al., 1976; Egorin et al., 1988; Breslow et al., 1991). Es wurden viele mögliche Wirkungsweisen von HMBA angenommen, so zum Beispiel über eine Modulation von c-AMP (Gazitt et al., 1978), von DAG (Michaeli et al., 1992), von PKC (Pessino et al., 1995) oder über eine Modifikation der Zellzyklusproteine wie der Cyclin-abhängigen Kinase (Cdks) (Kiyokawa et al., 1994), der Tumorsuppressor-Gene (Richon et al., 1992) oder der ATPase (Kennedy et al., 1985). Es wird angenommen, dass keine HMBA-spezifischen Rezeptoren an der Zellmembran existieren (Reuben et al., 1985). Ausschlaggebend für die Wirkung dürfte der hydrophobe Kern des Moleküls, der aus 6 Methylengruppen besteht, sein. HMBA könnte die Organisation zwischen DNA und seinen Transkriptionsproteinen im Nucleus modifizieren. Die Wirkung von HMBA würde sich somit nicht an der äusseren Zellmembran, sondern in der Zelle selbst entfalten. Da sich 20 Stunden nach Stimulation 2% HMBA im Nucleus befinden (Reuben, 1979), ist anzunehmen, dass die durch HMBA verursachte Abweichung der lokalen DNA- oder Chromatinstruktur eine Aktivierung der Transkription bewirken könnte. Yamashita et al. (1998) beobachteten bei der F5-5-Zelllinie, einer murinen Erythroleukämiezelllinie (MELC), nach 24 Stunden Inkubation mit HMBA einen Anstieg des Phosphotyrosin-Gehalts und der Janus-aktivierten Kinase 2 (JAK2). HMBA induziert somit die Phosphorylierung der JAK2 und aktiviert intrazelluläre Botenstoffe der Transkription 5 (STAT5).

In Schilddrüsenzellkulturen induziert HMBA, ähnlich wie die wichtigste Steuersubstanz der Schilddrüse, nämlich das TSH, die Reorganisation von frisch isolierten Schweineschilddrüsenzellen zu Follikel (Amphoux-Fazekas et al., 1997) und aktiviert deren Zellwachstum (Fayet et al., 1996). So sind

Schweinethyreozyten nach einer Vorbehandlung mit HMBA (Optimum bei 5 mM HMBA) und gleichzeitiger Stimulation mit TSH in der Lage sich wieder zu Follikeln zu formieren. Ohne HMBA-Vorbehandlung bilden sich nur einschichtige Zellverbände.

Die eigenen Untersuchungen mit Hexamethylenbisacetamid werden an nicht-transformierten Thyreozyten vom Schwein durchgeführt. Bei den Primärkulturen von Schweinethyreozyten handelt es sich um ein in vitro-System mit in vivo-Merkmalen (Fröhlich und Wahl, 1999). Unter Zugabe von TSH oder cAMP lagern sich die isolierten Schweinethyreozyten zu dreidimensionalen follikelartigen Strukturen mit einer Polarität wie unter in vivo-Bedingungen zusammen. Ohne dieser Stimulanzen entstehen nur Monolayer. Bei geeigneter Stimulation können sich sogar Basalmembranen ausbilden (Fröhlich et al., 1995). Da ein Schilddrüsenmalignom nicht allein aus transformierten Zellen besteht, ist es zunächst von Interesse zu wissen, welchen Einfluss diese Substanzen auf die nicht transformierten Zellverbände ausüben. Die Wirkung des Hexamethylenbisacetamids und des Retinols auf nicht transformierte Schilddrüsenzellen wurde bisher in der Literatur nicht so ausgiebig untersucht wie deren Wirkung auf Carcinomzellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eine Antwort auf folgende Fragestellungen zu erhalten:

- Welche Rolle spielt die 'physiologische' Retinolkonzentration des Mediums (ca. 0,6 μM) auf die durch HMBA induzierten Stoffwechseleffekte?

Retinol in niedriger Dosierung übt auf Zellen eine permissive Rolle aus. Es kann Differenzierungsvorgänge beeinflussen. TSH scheint auch in gewissem Umfang Retinol zu benötigen, um seine Stoffwechselwirkungen optimal einleiten zu können. Hierzu sollen Kulturen in retinolfreiem Medium mit solchen in retinolhaltigem Medium verglichen werden.

- Beeinflusst HMBA die Sensitivität nicht transformierter Schweinethyreozyten auf TSH?

Zur Bearbeitung dieser Fragestellung werden die TSH-Konzentrationen variiert. Als Differenzierungsmarker dient der ^{125}I -Uptake in die Thyreozyten, als Proliferationsmarker wird die ^3H -Thymidinaufnahme verwendet.

- Welchen Einfluss übt HMBA auf die TSH-Rezeptorregeneration bei den aus dem Gewebsverband abgedauten und in die Primärkultur eingesetzten Thyreozyten aus?

Im einen Fall wird den Zellen 16 Stunden nach der Aussaat TSH zugesetzt und nach verschiedenen langen Inkubationszeiten jeweils die ^{125}I -Iodid- und die ^3H -Thymidinaufnahme gemessen. Im anderen Fall werden die Zellen gleich behandelt nur dass das TSH erst 6 Stunden vor Beendigung der jeweiligen Inkubationsdauer den Kulturen zugesetzt wird.

- Wie ändert sich die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymidinaufnahme unter HMBA, wenn die Hormonsynthese der Thyreozyten mit Thiamazol blockiert wird?

Thiamazol greift über die Blockade der Thyreoperoxydase in den Stoffwechsel der Schilddrüse ein. Thiamazol übt aber auch einen Einfluss auf das Wachstum aus. Taniguchi et al. beobachteten 1989 sowohl einen stimulierenden als auch einen inhibierenden Effekt von Thiamazol auf das Wachstum von FRTL-5 Zellen. Erfolgte die Stimulation der Rattenthreozyten mit Thiamazol und TSH oder cAMP, so liess sich die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten steigern. In Gegensatz dazu führte eine Stimulation der Kulturen mit Thiamazol und IGF-I oder Kälberserum zu einem Rückgang in der ^3H -Thymidinaufnahme. Die Autoren schlussfolgerten, dass Thiamazol unterschiedliche Effekte auf den cAMP-abhängigen und cAMP-unabhängigen Wachstumspfad hat.

- Kann HMBA die Wirkung von Perchlorat auf die ^{125}I -Iodidaufnahme beeinflussen? Übt es auch einen Einfluss auf die ^3H -Thymidinaufnahme aus?

Perchlorat ist wie Thiamazol ein Thyreostatikum. Im Gegensatz zum Thiamazol liegt sein Angriffspunkt jedoch in der Iodidaufnahme und damit beim Na^+/I^- -Symporter.

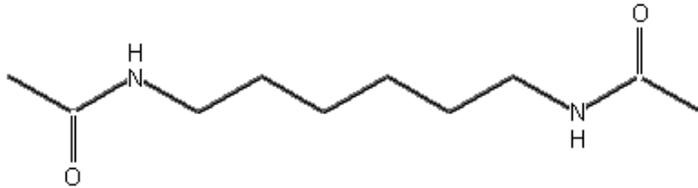
- Kann HMBA bei gesunden Schilddrüsenzellen eine Apoptose induzieren?

Apoptose ist ein physiologischer Zelltod, der genetisch determiniert ist und über Rezeptoren gesteuert wird (Dudel, 1990). In menschlichen Myelomzellen induziert HMBA die Apoptose durch Unterdrückung des bcl-2-Gens, dessen Expression die Zellen vor Apoptose schützt (Siegel et al.,

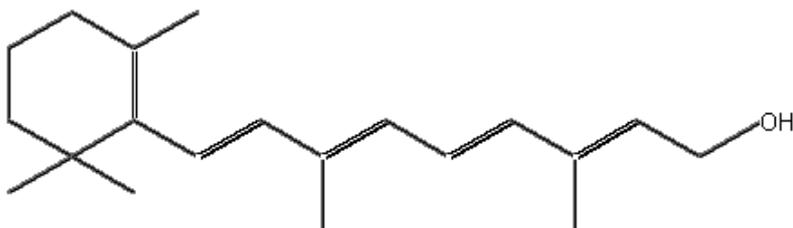
1998). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass HMBA in Verbindung mit anderen Substanzen, wie dem Interferon-alpha ebenfalls die Apoptose in menschlichen Lungencarcinomzellen sowohl in vitro als auch in vivo induzieren kann (Yamamoto-Yamaguchi, 2003).

Abb. 1 Strukturformeln der verwendeten Substanzen

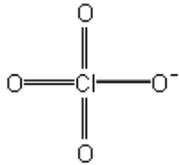
Hexamethylenbisacetamid (HMBA) $C_{10}H_{20}N_2O_2$



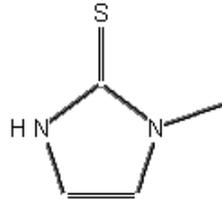
Retinol (Vit. A) $C_{20}H_{30}O$



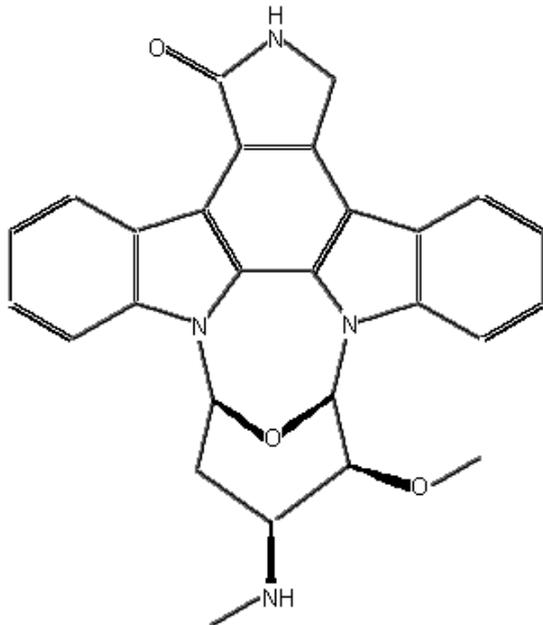
Perchlorat ClO_4^-



Thiamazol (Favistan[®]) $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{S}$



Staurosporine $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$



1. Material

1.1 Geräte für die Zellkulturen

- Sterile Werkbank, Ceag Shirp, Typ C 636 H (Selm, Borg)
- Invertmikroskop D, mit Memo C 35 Kamera, Belichtungsautomatik mittels Prontor CS-matic, (Zeiss, Oberkochen)
- CO₂-water jacketed incubator, Modell 3111, Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA
- Inotech Cell-Harvester, IH280, Inotech AG, Schweiz
- Filtermatten 11731 (1,5 µm) Skatron Instruments AS, Norwegen
- Sterile Einwegfilter, SM 17598 K, 0,45 µm und SM 17597 K, 0,20 µm, (Sartorius, Göttingen)
- DNA Test Kit-Nucleo Spin[®] Blood, Cat. No. 740951250
- Zentrifugenröhrchen (50 ml) (Falcon Blue Max, Becton Dickinson, USA)
- Kulturgefäße: Cell Cultur Cluster:
 - 48 wells (Costar 3548)
 - 24 wells (Costar 3524)
 - 6 wells (Costar 3506)

1.2 Geräte zur Messung der Radioaktivität

Zur Messung der Radioaktivität des ¹²⁵I: LKB Rackbeta 1219, Pharmacia-LKB, Freiburg

Zur Messung der Radioaktivität des [6-³H] Thymidine: Liquid Scintillation Counter Wallac[®] 410, Pharmacia-LKB, Freiburg

1.3 Medien und Reagenzien

- Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (Roche, Mannheim): 50 000 U Penicillin, 0,05 g Streptomycin, aufgelöst in 20 ml Aqua dest.. Konzentration pro Liter NCTC-Medium: 10 000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin
- Ciprobay[®] 200 (Ciproflaxin), Bayer, Leverkusen: 30 ml/l NCTC-Medium
- Amphotericin, SQUIBB, München, 25 mg/l Spinner-Lösung
- Ultrosor G als Serumersatz, BIOSEPRA, Frankreich
- Hydrocortison 100 Pharmacia, Upjohn
- Natriumbicarbonat, 7,5 %, Gibco, Schottland, Lot. 30 111 24
- Protease, neutrale, (Dispase II), aus *Bazillus polymyxa* grade II, 5 g/l, Roche, Mannheim
- Salzlösung nach Earle, Kat. Nr. 14050-041, Life Technologies
- Lösung nach Spinner als Transportlösung für die im Schlachthof entnommenen Schilddrüsen: Zu 900 ml sterilem H₂O wurden 100 ml Salzlösung nach Earle gegeben und mit 7,5 % iger NaHCO₃ (ca. 6 ml) der pH auf 7,2 eingestellt
- Medium NCTC-135 without Vit. A, Lot. No. 3049316 (Sonderanfertigung von Gibco, Paisley, Schottland)
- Medium NCTC-135 with L-Glutamine, Lot. No. 3039793 (Sonderanfertigung von Gibco, Paisley, Schottland)
- TSH vom Schwein, Lot. 129H0971, Sigma, USA
- Radioaktive Chemikalien: Na¹²⁵I (Code IMS 30), Lot. 0046, Amersham Pharmacia Biotec, England; [6-³H] Thymidine (Code TRK61), Batch 417, Amersham Pharmacia Biotec, England
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Lot. 80k3644, Sigma, USA
- Retinol (Vitamin A), Lot. 14H5015, Sigma, USA
- Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard, Groningen)
- Erythrosin B, Indikator für Mikroskopie (Merck, Darmstadt)
- Mycoplasma Detection Kit 1296744, Enzyme Immunoassay (Roche, Mannheim)

- N, N'-Hexamethylenbisacetamid, 98%, Lot. 01907JR (Sigma-Aldrich, Lyon, Frankreich)
- Thiamazol, Favistan[®], 1 ml Ampulle, 40 mg (Temmler Pharma, Marburg/Lahr)
- Natriumperchlorat Lösung, 99,9% (VWR International GmbH, Darmstadt)
- Staurosporin 500 µg, Lot. 85438725 (Roche, Mannheim)

1.4 Annexin V-Test / Facsanalyse

- Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 80-4638-00 (R&D Systems, Minneapolis USA)
- Propidiumiodid, im Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit enthalten
- Facsröhrchen, Becton Dickinson, USA
- Zentrifuge Hettich Roto Silenta/K, Hettich, Tuttlingen
- Facs-Gerät: Modell "Calibur", Becton Dickinson, USA

2. Methoden

2.1 Präparation der Schweineschilddrüsen

Die verwendeten Schilddrüsen wurden von ca. 9 Monate alten, frisch geschlachteten Hausschweinen in toto entnommen. Anschließend wurden diese auf Eis in antibiotika- (Penicillin-Streptomycin) und antimycotikahaltiger (Amphotericin) Lösung nach Spinner ins Labor gebracht und dort unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet.

Nach mehrmaligem Spülen der Schilddrüsen in Lösung nach Spinner wurde mittels steriler Pinzette und Schere das umgebende Fett- und Bindegewebe entfernt. Um die Schilddrüsenkapsel und das septale Bindegewebe besser lösen zu können, wurden die Schilddrüsen zunächst für drei Minuten in eine 80 %ige Ethylalkohollösung gelegt. Nach dem Freilegen des Schilddrüsenparenchyms mittels zweier Pinzetten, wurde dieses mit einem Skalpell in Würfel mit einer Kantenlänge von ca. 2-3 mm geschnitten und in ein Trypsiniergefäß überführt. Dort wurde das interstitielle Bindegewebe mit einer auf 35°C vorgewärmten Dispaselösung (1l) unter ständigem Rühren (heizbarer Magnetührer) abgedaut. Die Thyreozyten gingen dabei in Suspension.

Etwa zwei Stunden nach Beginn des Abdauprozesses wurden erstmals 150 ml der zellhaltigen Enzymlösung über ein Teesieb abgegossen, um größere Zell- und Bindegewebsanteile zurückzuhalten. Das nun fehlende Volumen wurde zunächst durch frische, vorgewärmte Proteaselösung ersetzt. Danach wurde solange zellhaltige Enzymlösung entnommen, bis das Gefäß bis auf ein zurückbleibendes Bindegewebskonglomerat leer war.

Jeweils 150 ml dieser Zellsuspension wurden auf 6 Zentrifugenröhrchen (50 ml, Flacon 2070) gleichmäßig verteilt und diese mit Spinnerlösung aufgefüllt. Anschließend wurden die Röhrchen 7 Minuten bei 4 °C und 180 g zentrifugiert. Nun wurde der Überstand abdekantiert. Die am Gefäßboden liegenden Zellen wurden erneut in ca. 20 ml Lösung nach Spinner resuspendiert und gewaschen. Daraufhin wurde die Zellsuspension auf drei Zentrifugenröhrchen verteilt und diese wieder mit Lösung nach Spinner auf 50 ml aufgefüllt. Erneutes

Zentrifugieren bei 4 °C, 7 min und 180 g. Der Überstand über den Zellpellets wurde abdekantiert, die Zellen resuspendiert und in einem Zentrifugenröhrchen vereint. Dieses wurde mit Medium auf 50 ml aufgefüllt und anschließend 7 min bei 4 °C und nur 120 g zentrifugiert. Die Erythrozyten blieben im Überstand. Das Zellsediment mit den Thyreozyten wurde auf Eis zwischengelagert. Dieses Verfahren wurde so oft wiederholt, bis die zellhaltige Enzymlyösung aufgebraucht war. Abschließend wurden die so gesammelten Zellsedimente in einem Zentrifugenröhrchen vereint, die Zellen mehrmals in 50 ml Medium suspendiert und zentrifugiert, bis die Sedimente frei von einem aus Erythrozyten bestehendem roten Saum waren. Zuletzt wurden die Zellen in 50 ml Kulturmedium aufgeschwemmt und ihre Zellzahl ermittelt.

2.2 Zellauszählung

Die Zellzahl wurde durch Auszählung der Zellen in den Leukozytenquadranten der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Um die vitalen Zellen dabei zu erfassen, erfolgte eine Ausschlussfärbung mit Erythrosin B (45 µl Zellsuspension, 145 µl Kulturmedium und 10 µl 1 %iges Erythrosin B). Dadurch war es möglich, rot angefärbte tote Zellen von vitalen Zellen zu unterscheiden.

Der Anteil der vitalen Zellen betrug in Schnitt 90 %.

Bei der Zellzählung wurden jeweils 4 Eckquadrate rasch ausgezählt (=n). Ein Eckquadrat hat ein Volumen von 0,1 µl. Die Zellzahl in 50 ml Medium (siehe 2.1) ermittelt sich somit aus $n \times 0,1 \mu\text{l} \times 1000 \times 50 \times 4,4$. Der Faktor 4,4 ist der Verdünnungsfaktor infolge der Vitalfärbung.

2.3 Herstellung der Thyreozytenkulturen und deren Stimulation mit TSH und Hexamethylenbisacetamid

Für die Versuche wurde eine Sonderanfertigung des Mediums NCTC-135 ohne Vit. A (Gibco, Lot. Nr. 3049316) verwendet. So war es möglich alle Versuchsansätze mit und ohne den Einfluß von Vitamin A parallel an der gleichen Charge des Mediums durchzuführen. Bei den verschiedenen Versuchen wurde die Konzentration der Zusätze variiert.

Als Zusätze zu den Zellkulturen dienten:

1. Ultrosor G (3 Vol. %)
2. Penicillin-Streptomycin (0,4 Vol. %)
3. Hydrocortison (0,0002 Vol. %)
4. Ciprobay[®] 200 (3 Vol. %)

Um die Zellen gleichmäßig auf die Kulturplatten aussähen zu können, wurden sie während der Aussaat mittels Magnetrührer in Suspension gehalten und mit einer Multipipette (Multipipette, Eppendorf, Hamburg) in die Kulturlöcher verteilt. Die übrigen Zusätze zu den Kulturmedien wurden wegen der Variabilität innerhalb eines Versuches direkt den einzelnen Kulturen zupipettiert.

Um einen möglichst genauen Mittelwert bei den einzelnen Versuchsansätzen zu bekommen, wurde jeder Ansatz in der Regel vierfach angelegt. Hierzu wurden 48-Loch-Platten von Costar verwendet. Jedes Loch einer solchen Platte stellte eine Kultur dar. Diese enthielt im typischen Fall 750 µl Medium mit $1,3 \times 10^5$ Zellen und 4 kBq Na ¹²⁵I oder 12 kBq [6-³H] Thymidin. In der Reihenfolge wurden zunächst die aufgeführten Stimulanzen zusammen mit dem Nuklid in die Kulturlöcher pipettiert und anschließend wurden die Thyreozyten dazugegeben.

Die Kulturen enthielten wahlweise folgende Stimulanzen:

1. Hexamethylenbisacetamid in den Konzentrationen: 2 mM; 4 mM; 6 mM; 8 mM
2. TSH in den Konzentrationen: 0,01 mU; 0,1 mU; 0,5 mU; 1 mU; 1,3 mU
3. Thiamazol 2 mM
4. Perchlorat 1 mM
5. Staurosporin 2,5 μ M

Bei allen Versuchen wurde ein Kontrollansatz mitgeführt. Es wurde hier ohne die Zugabe einer stimulierenden Substanz die Aufnahme des Nuklids verfolgt und zum Vergleich herangezogen.

2.4 Kulturbedingungen

Die angelegten Kulturen wurden unter Lichtabschluss in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 35 °C mit 95 % Luft und 5 % CO₂ begast. Die vitalen Zellen haben sich mit zunehmender Inkubationsdauer am Plattenboden verankert. Die Inkubationszeiten variierten zwischen 1 h und 144 h.

2.5 Zell-Ernte

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Zellen mittels eines Zell-Harvesters auf Glasfasermatten abgesaugt und gewaschen. Der mit Zellen beladene Filter wurde in Reagenzröhrchen überführt. Zuerst erfolgte im Gamma-Counter die Radioaktivitätsmessung von Na ¹²⁵I. Der mit Zellen beladene Filter wurde anschliessend mittels einer Pinzette aus dem Reagenzröhrchen in ein Szintillationsröhrchen überführt, in das Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold®) eingefüllt wurde. Anschliessend erfolgte im β -Counter dann die Radioaktivitätsmessung von [6-³H] Thymidin.

2.6 Annexin V-Test und Facsanalyse

2.6.1 Prinzip des Annexin V-Tests

Die Reaktion der Zellen mit Annexin V basiert auf Veränderungen der Zelloberfläche während des frühen apoptotischen Prozesses. Das mit Fluorescein-Isothiocyanid (FITC) markierte Annexin ermöglicht eine fluorimetrische Erkennung der apoptotischen Zellen.

Das Annexin V ist ein anticoagulierendes Protein, das an negativ geladene Phospholipide bindet. Schon im frühen apoptotischen Prozess tritt ein Wechsel der Phospholipidverteilung der Cytoplasmamembran auf, indem sich das Phosphatidylserin (PS) zum Teil in die äussere Membranschicht verlagert. Vermutlich ist diese Umverteilung wichtig, so dass Makrophagen die bei der Apoptose untergehenden Zellen erkennen.

Die Annexin V-Bindung an PS ist calciumabhängig und reversibel. Man schätzt, dass etwa 50 nach aussen verlagerte Phospholipidmonomere an ein Annexinmolekül binden.

Die Kombination von Annexin V-FITC und Propidiumiodid (PI) ermöglicht eine Differenzierung zwischen frühen apoptotischen Zellen und späten apoptotischen und/oder nekrotischen Zellen.

2.6.2 Herstellung der Zellkulturen für den Annexin V-Test

Die Herstellung der Zellkulturen für den Annexin V-Test erfolgt nach oben beschriebener Methode.

2.6.3 Kulturen, die mit Annexin V untersucht wurden

Der Einfluss folgender Wirksubstanzen auf die Apoptose-Induktion wurde untersucht:

1. Staurosporin 2,5 μ M (zur Apoptose-Kontrolle)
2. TSH (1 mU / Kultur)
3. Hexamethylenbisacetamid 2 mM
4. Hexamethylenbisacetamid 6 mM

ferner Hexamethylenbisacetamid in Kombination mit TSH:

5. Hexamethylenbisacetamid 2 mM + TSH (1 mU / Kultur)
6. Hexamethylenbisacetamid 6 mM + TSH (1 mU / Kultur)

Die mit den Wirksubstanzen versehenen Kulturen wurden 24 und 144 Stunden unter Lichtabschluss in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 35 °C mit 95 % Luft und 5 % CO₂ inkubiert. Als Kontrolle dienten Kulturen ohne spezifische Wirksubstanz.

2.6.4 Zellaufbereitung / Zellernte für die Facsanalyse

Nach Inkubation über 24 und 144 Stunden wurden die Zellen aus den Kulturschalen in Rundbodenröhrchen pipettiert. Die Kulturlöcher wurden hierzu mit eisgekühltem PBS-Puffer (ohne Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) gut ausgespült und die Spüllösung den Rundbodenröhrchen zugegeben.

Zentrifugieren der Rundbodenröhrchen bei 1000 U/min (170 g/min) für 5 Minuten bei 2 °C.

Anschliessend wurden die Überstände abdekantiert und die Zellen in 500 μ l PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun durch Teflonfilter (50 μ m Porengröße) der Firma Dako in die sogenannten „Facs“-Röhrchen überführt. Anschliessend kurzes Zentrifugieren, nochmaliges Abdekantieren und Resuspendieren der Zellen durch leichtes Schütteln.

Nun wurde das Propidiumiodid mit dem Annexin im abgedunkelten Raum den eisgekühlten Zellaufbereitungen zupipettiert. Während der Zellaufbereitung wurden die Zellen ständig auf Eis gekühlt.

Nach der Zellaufbereitung erfolgte die Messung der Proben im Facs-Gerät. Für die Auswertung der Facsanalyse danken wir Herrn PD Dr. med. Brossart und Herrn Nencioni, Abt. 2, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen.

2.7 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit dem Dunnett-Test. Dieser Test ermöglicht multiple Vergleiche mit den Durchschnittswerten einer Kontrollgruppe. Die Wahrscheinlichkeit einer falschen Interpretation liegt nach Dunnett bei diesem Verfahren unter 5 %. Der herkömmliche t-Test ist folglich nicht annähernd so signifikant. Im Dunnett's Test werden alle Ergebnisse als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung $P < 0,05$ ist und die Werte positiv sind.

Um nicht nur einen Eindruck von der Wirkung der Substanzen zu den einzelnen Inkubationszeiten zu erhalten, wurden auch Mittelwertskurven über den ganzen Inkubationszeitraum hinweg erstellt. Dadurch ergibt sich ein Gesamteindruck vom Wirkprofil der Substanz. Die entsprechenden Kurven finden sich im Anhang. Die entsprechenden Ergebnisse wurden bei der Diskussion berücksichtigt.

Für die Durchführung wurde das Statistikprogramm JMP von SAS, installiert für Windows, Version 3.2.6 eingesetzt.

Für die statistische Beratung danken wir Herrn PD Dr. Eichner, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

3. Ergebnisse

3.1 Radioiodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, kultiviert in retinolhaltigem und retinolfreiem NCTC-135 Medium

3.1.1 Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen und der Inkubationsdauer

Kultivierte Schweinethyreozyten in 750 µl Medium wurden mit 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in einem retinolfreien NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in einem NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die stimulierenden Agenzien HMBA und 1,3 mU TSH wurden den Thyreozytenkulturen 16h nach Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA stimuliert wurden. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 24; 48; 72; 96 und 120 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte der Vergleich der Radioiodaufnahme in Thyreozyten, die zwar mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch in retinolfreiem NCTC-135 Medium oder in NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 2 und 3 dargestellt.

Wie Abb. 2 zeigt, konnte nach 24 Stunden Inkubationsdauer bei der Konzentration von 2 mM HMBA ein tendenziell leichter Anstieg der Radioiodaufnahme im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Bei den restlichen Konzentrationen zeigte sich zu diesem Zeitpunkt ein tendenziell leichter Rückgang der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten. Nur unter der Stimulation mit 8 mM HMBA war der Rückgang der Radioiodaufnahme gegenüber der Kontrolle signifikant. Nach einer Inkubationsdauer von 48; 72

und 96 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Ein signifikanter Rückgang der Radioiodaufnahme zeigte sich nach 120 Stunden Inkubationsdauer unter 8 mM HMBA.

Die Kultivierung der Thyreozyten in retinolhaltigem Medium (Abb. 3) erbrachte nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden einen tendenziell leichten Anstieg des Radioiod-Uptakes gegenüber der Kontrolle unter 2 und 4 mM HMBA. Bei höheren Konzentrationen an HMBA zeigte sich jedoch ein leichter Rückgang der Radioiodaufnahme. Nach 48; 72 und 96 Stunden Inkubationszeit konnte bei allen HMBA Konzentrationen kein signifikanter Unterschied in der Radioiodaufnahme in Vergleich zur Kontrolle gezeigt werden.

Vergleicht man die Ergebnisse aus Abb. 2 (retinolfreies Medium) mit den Ergebnissen der Thyreozytenkultur, die in retinolhaltigem Medium inkubiert wurde (Abb. 3), so zeigt sich, dass die Kontrollkultur in retinolhaltigem Medium nach 24 Stunden doppelt so viel Radioiod aufnimmt wie die Kontrollkultur in retinolfreiem Medium. Ein derartiger signifikanter Unterschied bei den Kontrollen zeigt sich auch nach 96 Stunden Inkubationszeit. Für die Konzentrationen 2; 4; 6 und 8 mM HMBA ergibt sich zwischen den Kulturen in retinolfreiem und retinolhaltigem Medium ein signifikanter Unterschied in der Radioiodaufnahme nach 24; 72; 96 und 120 Stunden. In retinolhaltigem Medium nehmen die Thyreozyten mehr Iodid auf als in retinolfreiem Medium. Unter 8 mM HMBA reichte der Unterschied bis zum 3,3fachen. Wie der Vergleich der Abb. 2 und 3 zeigt, wird das Maximum der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten in retinolhaltigem Medium schon nach 24 Stunden, in retinolfreiem dagegen erst nach 48 Stunden, erreicht.

Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte (Abb. 2a und 3a im Anhang), so zeigt sich in retinolfreiem Medium unter 6 und 8 mM HMBA ein Rückgang (87 % bzw. 77%) der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten. 4 mM HMBA führte in retinolhaltigem Medium zum leichten Anstieg (117%) der Radioiodaufnahme (Abb. 3a im Anhang).

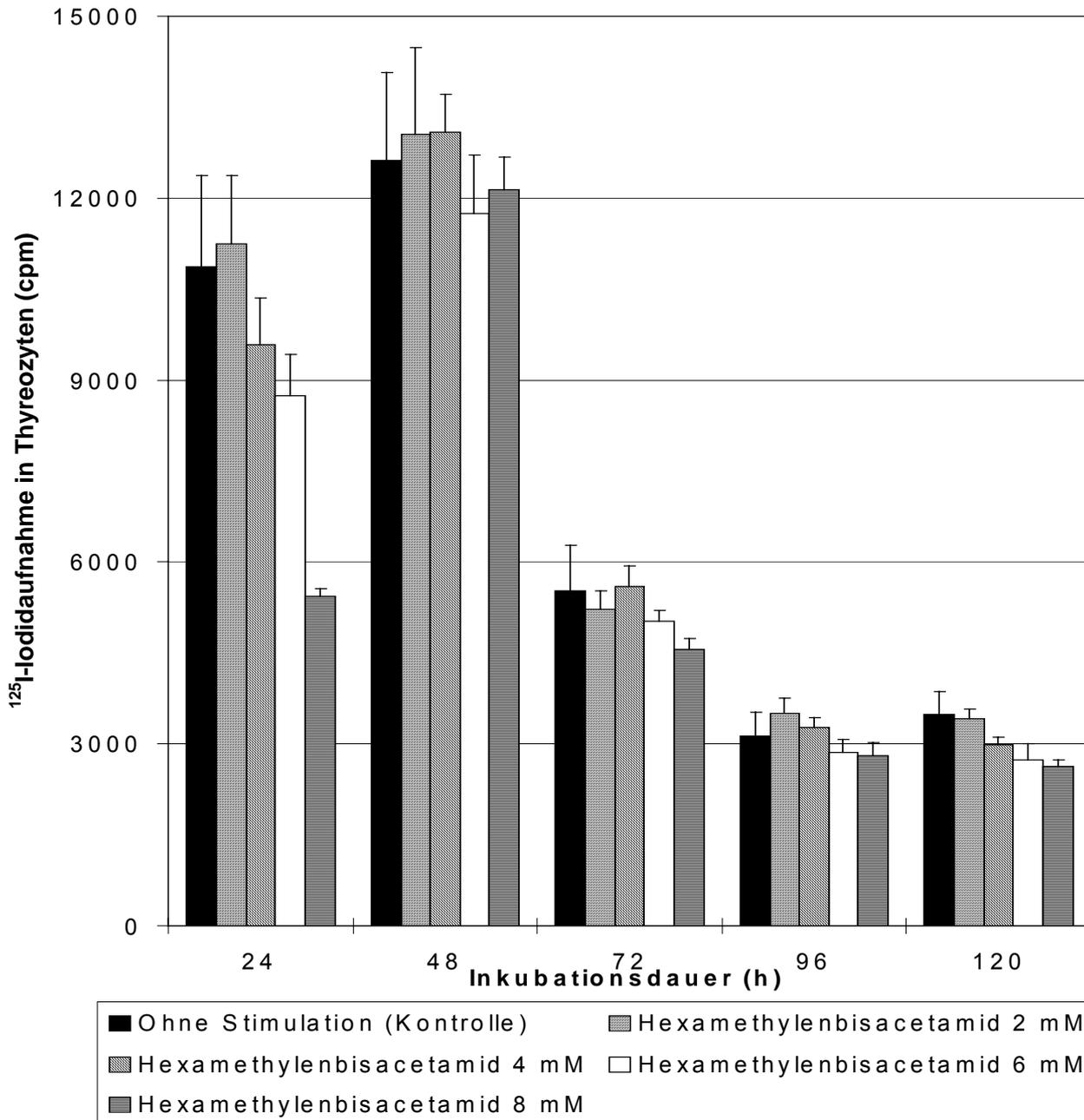


Abb.2. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Stimulation der Thyrozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 1 im Anhang)

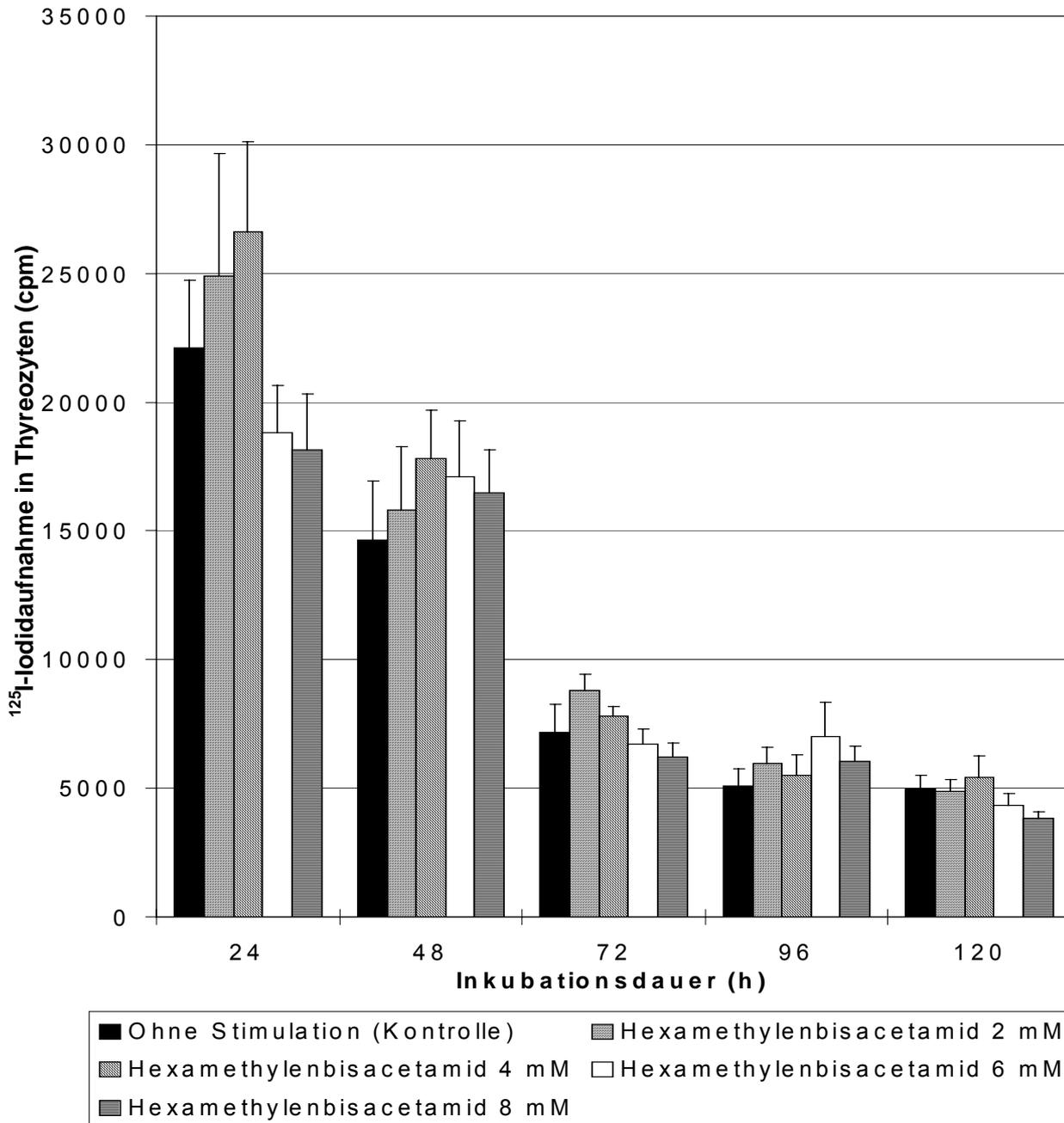


Abb.3. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 1 im Anhang)

Im folgenden wird der vorrausgegangene Versuch an derselben Zellpräparation modifiziert. Kultivierte Schweinethyreozyten in 750 µl Medium wurden hierzu mit 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Als Kulturmedium diente wiederum retinolfreies NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die Stimulation der Thyreozytenkulturen mit HMBA erfolgte 16 Stunden nach Aussaat. ¹²⁵I-Iodid und TSH wurden jedoch jeweils erst 6 Stunden vor der Ernte hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA stimuliert wurden. 30; 54; 78; 102 und 126 Stunden nach Inkubationsbeginn wurden die Zellen geerntet und die ¹²⁵I-Iodaufnahme gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Radioiodaufnahme zwischen den Thyreozyten, die mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch in retinolfreiem NCTC-135 Medium oder in NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.

In retinolfreiem Medium (Abb. 4) zeigt die Stimulation der Schilddrüsenzellen mit 2 mM HMBA nach 30 Stunden im Vergleich zu den unstimulierten Thyreozyten der Kontrollgruppe einen leichten Rückgang in der ¹²⁵I-Iodidaufnahme. Für die restlichen Zeitpunkte konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Nach 30 Stunden Inkubationszeit konnte für die Konzentration von 4 mM HMBA ein leichter Anstieg gezeigt werden, der jedoch nicht signifikant war. Eine Konzentration von 6 und 8 mM HMBA bewirkte nach 30 Stunden einen nicht signifikanten Rückgang des Radioiod-Uptakes gegenüber der Kontrolle. Für die Zeitpunkte 54; 78; 102 und 126 Stunden ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den unstimulierten Thyreozytenkulturen.

Wie Abb. 5 zeigt, bewirkte 2; 6 und 8 mM HMBA in retinolhaltigem NCTC-135 Medium nach 30 Stunden Inkubationszeit einen teilweise signifikanten Rückgang in der ^{125}I -Iodidaufnahme bewirken. Der Radioiod-Uptake nahm bei 2 mM HMBA um 14%, bei 6 mM HMBA um 37% und bei 8 mM HMBA um 40% in Vergleich zur unstimulierten Kontrollkultur ab. Zu späteren Zeitpunkten konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Vergleicht man die Abb. 4 und 5 miteinander, so ist die Radioiodaufnahme bei den Thyreozyten der Kontrolle in retinolhaltigem Medium 2fach höher als bei jenen in retinolfreiem Medium. Nach 78 Stunden Inkubationszeit fiel die Radioiodinkorporation der unstimulierten und in retinolhaltigem Medium kultivierten Thyreozyten signifikant auf die Hälfte jener Zellen in retinolfreiem Medium zurück. Die mit 2 und 4 mM HMBA stimulierten Schilddrüsenkulturen zeigten nach 30; 54 und 102 Stunden einen signifikanten Anstieg in der ^{125}I -Iodidaufnahme gegenüber den in retinolfreiem NCTC-135 Medium kultivierten Schilddrüsenkulturen. Nach 30 und 78 Stunden zeigte sich unter 8 mM HMBA bei den Zellen in retinolhaltigem Medium ein signifikanter Anstieg in der Radioiodaufnahme gegenüber den in retinolfreiem Medium kultivierten Zellen.

Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte (Abb. 4a und 5a im Anhang), so zeigt sich in retinolfreiem Medium unter 8 mM HMBA ein Rückgang (87 % der Kontrolle) der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten. In retinolhaltigem Medium fiel der Rückgang der Radioiodaufnahme noch ausgeprägter aus. 6 mM HMBA führte zur einer Abnahme von 74 % der Kontrolle. Unter 8 mM HMBA fiel der Rückgang der Radioiodinkorporation auf 69 % ab (Abb. 5a im Anhang).

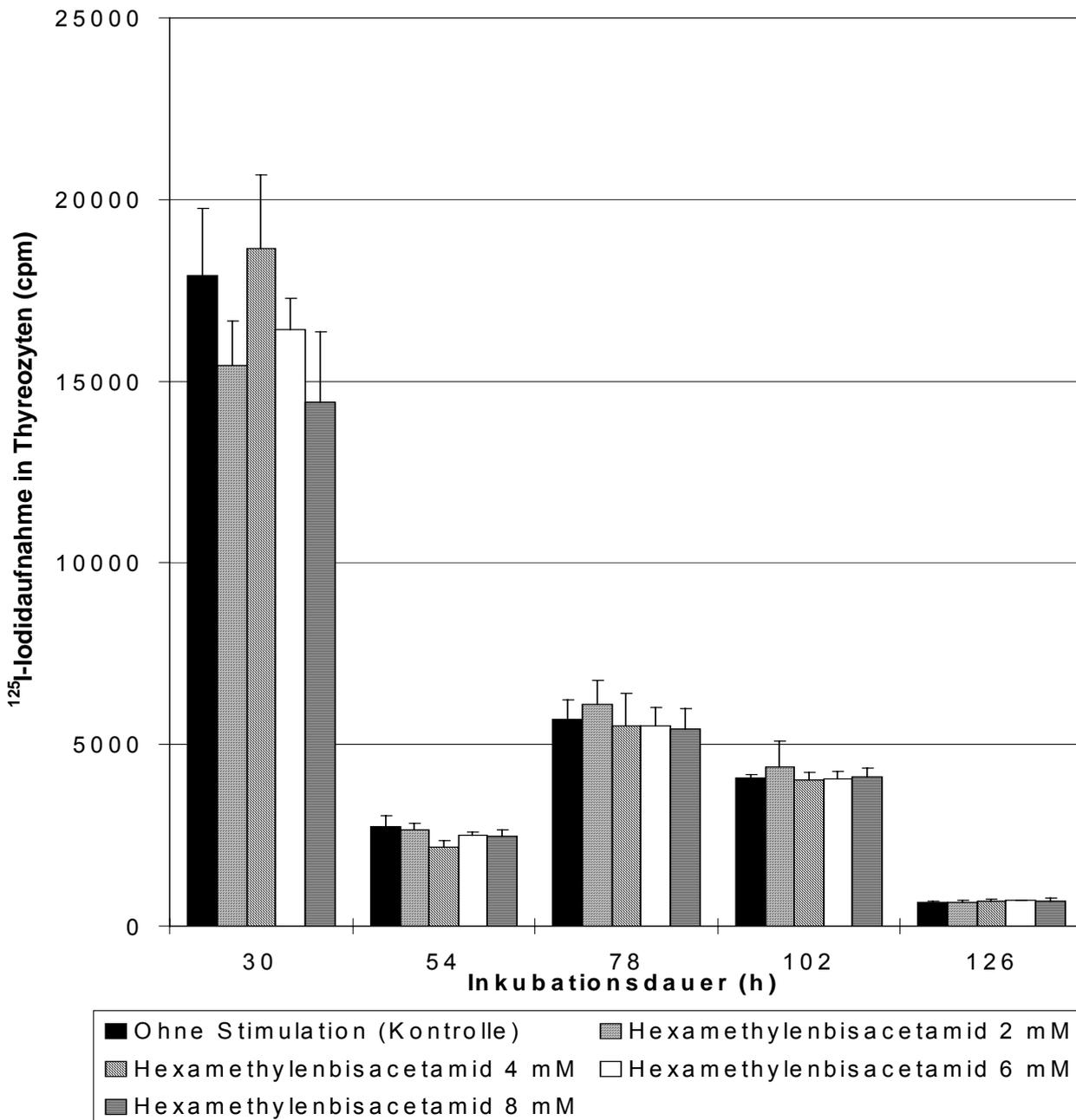


Abb.4. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 2 im Anhang)

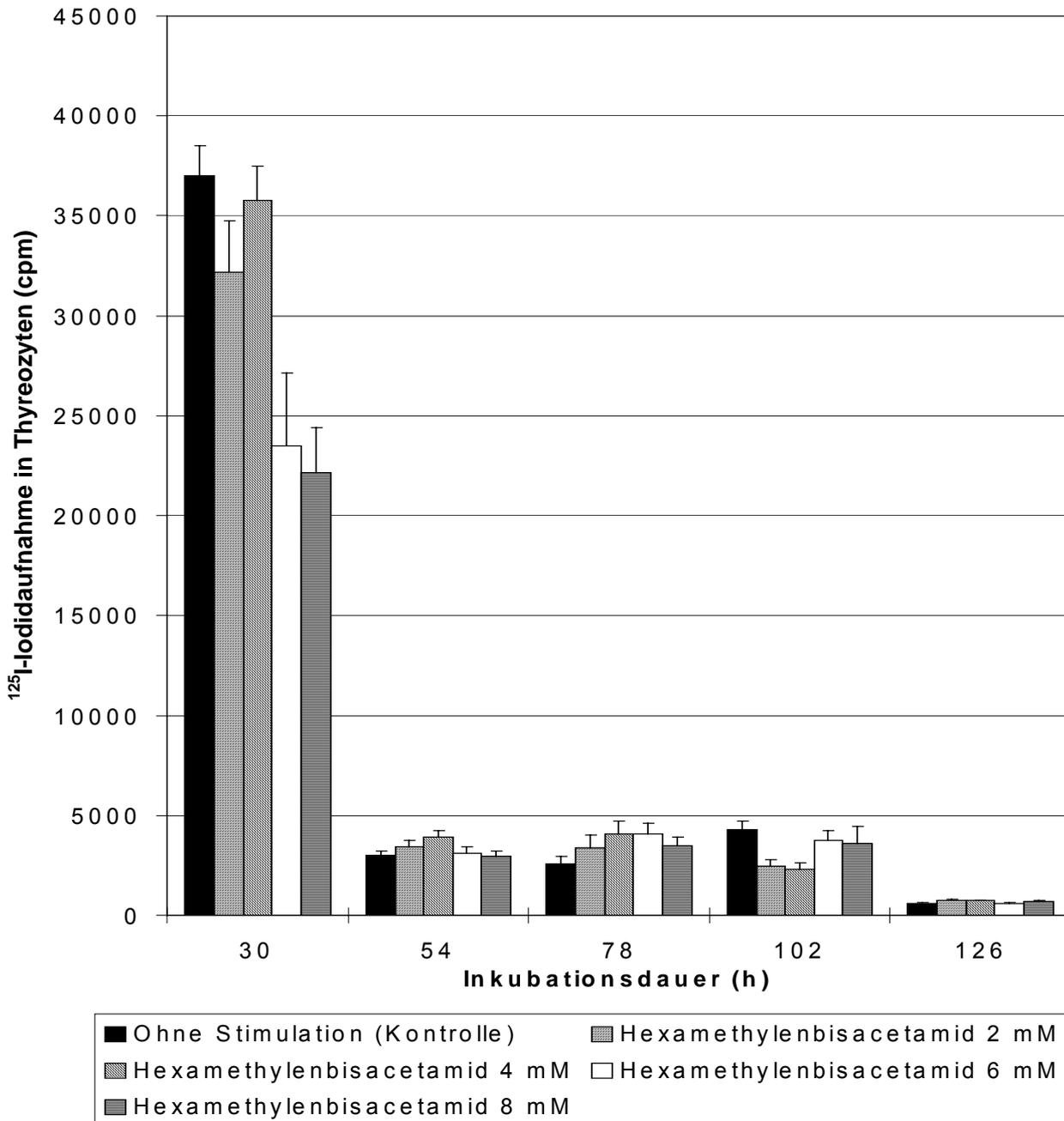


Abb.5. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 2 im Anhang)

3.1.2 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Thiamazol und HMBA

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 2 mM Thiamazol und 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Thiamazol wurde deswegen zugegeben, um die Aufnahme des Radioiods in Schilddrüsenhormone zu blockieren. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in retinolfreiem NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die stimulierenden Agenzien HMBA und TSH wurden den Thyreozytenkulturen 16h nach Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die mit 2 mM Thiamazol behandelt wurden. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 24; 48; 72; 96 und 120 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch entweder in retinolfreiem NCTC-135 Medium oder in NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 6 und 7 dargestellt.

Wie Abb. 6 zeigt, wiesen nach 24 Stunden die nur mit 2 mM Thiamazol behandelten Thyreozyten die höchste Rate in der ¹²⁵I-Iodidaufnahme auf. Durch zusätzliche Stimulation mit HMBA konnte eine tendenzielle Abnahme im Radioiod-Uptake erreicht werden. Nach 48 Stunden Inkubationszeit änderten sich die Verhältnisse, so dass die mit HMBA stimulierten Thyreozytenkulturen eine tendenzielle Zunahme in der ¹²⁵I-Iodidaufnahme zeigten im Vergleich zur nur mit 2 mM Thiamazol stimulierten Kontrolle. Unter 8 mM HMBA zeigte sich nach 72 Stunden ein signifikanter Rückgang in der Radioiodaufnahme. Dieser ging auf das 0,8fache der nur mit Thiamazol (2 mM) stimulierten Kontrolle zurück. Nach 96 und 120 Stunden Inkubationszeit konnte ein nicht signifikanter,

von der HMBA-Konzentration abhängiger Rückgang in der ¹²⁵I-Iodidaufnahme gezeigt werden. Die Maximalwerte der Radioiodaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten fanden sich 48 Stunden. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch unter allen HMBA-Konzentrationen die maximalen Raten der Radioiodaufnahme erreicht.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 7) kam es nach 24 Stunden unter 4 mM HMBA zu einem signifikanten Anstieg der Radioiodaufnahme auf das 2fache der unstimulierten Schweinethyreozytenkontrolle. Bei noch höheren HMBA-Konzentrationen lagen die Raten der Radioiodaufnahme unter jener von 4 mM HMBA, jedoch tendenziell über der Radioiodaufnahme der unstimulierten Kontrolle. Nach 48 Stunden war die Radioiodaufnahme unter allen HMBA-Konzentrationen nicht signifikant von der Kontrolle verschieden. Diese Tendenz setzte sich bis zum Zeitpunkt 96 Stunden fort. HMBA bewirkte in 6 mM Konzentration eine signifikante Steigerung der Radioiodaufnahme nach 120 Stunden. Unter allen anderen HMBA-Konzentrationen waren die Radioiodaufnahmeraten in die Thyreozyten gegenüber der nur mit 2 mM Thiamazol stimulierten Kontrolle nicht signifikant verschieden.

Vergleicht man die Abb. 6 und 7 unter dem Aspekt des Vitamin A-Gehaltes des Mediums, so ist festzustellen, dass sich bei der nur mit Thiamazol behandelten Kontrolle in retinolhaltigem Medium ein signifikanter Rückgang in der Radioiodaufnahme nach 72 und 120 Stunden zeigt. Ein signifikanter Rückgang der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten ist auch unter 2 mM HMBA nach 48 und 120 Stunden Inkubation in retinolhaltigem NCTC-135 Medium zu beobachten. Nach 48 Stunden erreicht die Radioiodaufnahme den 0,6fachen und nach 120 Stunden den 0,7fachen Wert der Radioiodaufnahme in Thyreozyten, die in retinolfreiem Medium mit 2 mM HMBA stimuliert wurden. Eine signifikante Abnahme in der Radioiodaufnahme ist auch unter 4 mM HMBA nach 72 und 96 Stunden erkennbar. Unter 8 mM HMBA konnte nach 48 und 96 Stunden Inkubation eine signifikante Abnahme der Radioiodspeicherung in Schweinethyreozyten, die in retinolhaltigem Medium kultiviert wurden, beobachtet werden. Diese erreichte nach 48 und 96 Stunden das 0,6fache der

mit 8 mM HMBA stimulierten und in retinolfreiem Medium kultivierten Vergleichsthyreozyten.

Die im Anhang in Abb. 6a (retinolfreies Medium) dargestellten auf die Kontrolle normierten Mittelwerte machen die oben beschriebene von der HMBA-Konzentration abhängige Abnahme der Radioiodaufnahme bei Fehlen von Retinol im Medium deutlich. In retinolhaltigem Medium (Abb. 7a im Anhang) zeigt sich hingegen die Zunahme des Radioiod-Uptakes unter 4 mM und 6 mM HMBA (128 % bzw. 118 % der Kontrolle).

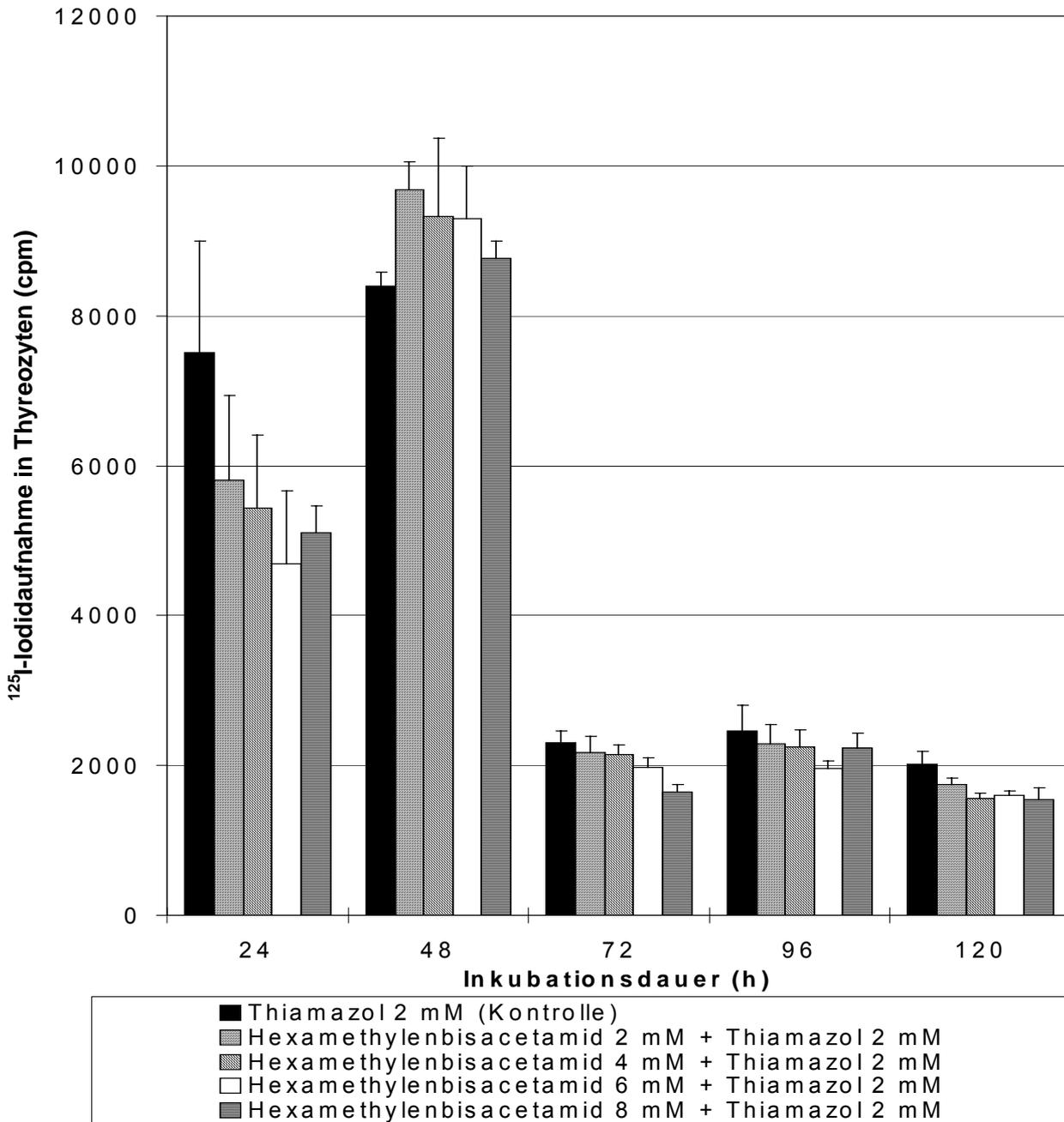


Abb.6. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Stimulation der Thyrozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 3 im Anhang)

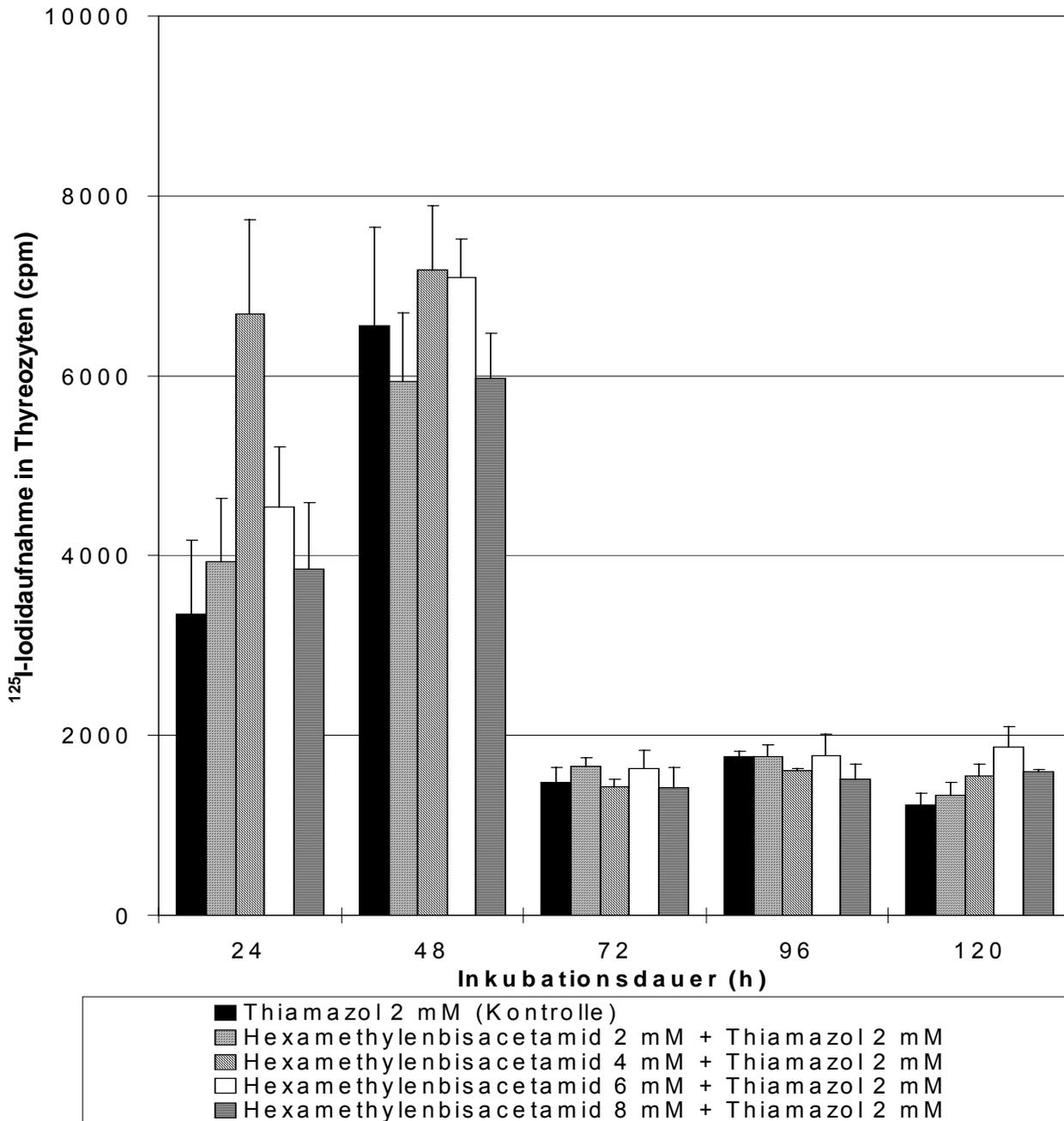


Abb.7. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 3 im Anhang)

In einem weiteren Ansatz wurden kultivierte Schweinethyreozyten mit 2 mM Thiamazol und 2; 4; 6 oder 8 mM HMBA stimuliert. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in einem retinolfreien NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in einem NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die Stimulation der Thyreozytenkulturen mit HMBA erfolgte 16 Stunden nach Aussaat. Thiamazol (2 mM), ¹²⁵I-Iodid und 1,3 mU TSH / Kultur wurden jedoch jeweils erst 6 Stunden vor der Ernte hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht mit HMBA, jedoch mit 2 mM Thiamazol stimuliert wurden. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 30; 54; 78; 102 und 126 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Thyreozytenkulturen, die mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch in retinolfreiem oder retinolhaltigem NCTC-135 Medium inkubiert wurden.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 8 und 9 dargestellt.

Wie Abb. 8 zeigt, ist nach 30 Stunden Inkubation in retinolfreiem NCTC-135 Medium eine nicht signifikante Abnahme in der Radioiodinkorporation bei allen mit HMBA stimulierten Thyreozyten gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Diese Abnahme erscheint konzentrationsabhängig zu sein. Die stärkste Abnahme findet sich unter 8 mM HMBA. Auch nach 54 Stunden sind keine signifikanten Unterschiede in der ¹²⁵I-Iodidaufnahme gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Nach einer Stimulationszeit von 78 Stunden scheinen alle HMBA-Konzentrationen eine tendenzielle Zunahme in der Radioiodaufnahme zu bewirken, wobei diese unter 4 mM HMBA am höchsten ausfällt. Diese Tendenz setzt sich bis zu 102 Stunden nach Stimulation fort. Verglichen mit den vorausgegangenen Messzeiten fand sich nach 126 Stunden Inkubation unter allen HMBA-Konzentrationen, aber auch unter der Kontrolle eine signifikante Abnahme des Radioiod-Uptakes in die kultivierten Schweinethyreozyten.

Zwischen den mit HMBA stimulierten Zellen und der Kontrolle bestand kein Unterschied in der Radioiodinkorporation. Das Maximum der Radioiodaufnahme fand sich sowohl bei der unstimulierten Kontrolle als auch unter allen HMBA-Konzentrationen in diesem Ansatz 30 Stunden nach Stimulation mit HMBA.

Wie Abbildung 9 zeigt, bewirkte die Stimulation mit 4 mM und 6 mM HMBA nach 30 Stunden eine leichte Erhöhung der Radioiodinkorporation gegenüber der Thyreozytenkontrolle, welche ausschließlich mit 2 mM Thiamazol behandelt wurde. Nach 54 Stunden fiel die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten unter allen HMBA-Konzentrationen einschließlich der Kontrolle stark ab. Zwischen Kontrolle und mit HMBA behandelten Proben bestand kein signifikanter Unterschied. Nach 78 Stunden zeigte sich unter der 4; 6 und 8 mM HMBA-Konzentration eine Erhöhung in der Aufnahme von Radioiod im Vergleich zur Kontrollkultur. Nach 102 Stunden bestand dieser Unterschied nicht mehr. Nach 126 Stunden war die Radioiodaufnahme insgesamt niedrig. Es fand sich aber unter der 6 und 8 mM HMBA-Konzentration eine signifikante Abnahme in der Radioiodaufnahme. Die Radioiodaufnahme ging um ein Drittel gegenüber der unstimulierten Kontrolle zurück.

Stellt man Abb. 8 und 9 gegenüber, so kann man nach 30 Stunden Inkubation keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kulturen, die in retinolfreiem oder in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden, erkennen. Nach 54 Stunden unterscheiden sich die ^{125}I -Iodidinkorporationen der Thyreozytenkontrollen, welche in retinolhaltigem oder retinolfreiem Medium kultiviert wurden, signifikant. In retinolhaltigem Medium war die Radioiodaufnahme um das 0,8fache niedriger als bei der Kontrollkultur in retinolfreiem Medium. In retinolhaltigem Medium konnte gegenüber retinolfreiem Medium bei der Thyreozytenkontrolle und unter den 2 und 4 mM HMBA-Konzentrationen ein signifikanter Rückgang in der Radioiodaufnahme nach 78 Stunden festgestellt werden. Diese Tendenz ist auch nach 102 Stunden noch zu beobachten, wobei unter 6 mM HMBA die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten in retinolhaltigem Medium gegenüber jenen in retinolfreiem Medium signifikant vermindert war. Nach 126 Stunden waren keine

signifikanten Unterschiede in der Radioiodaufnahme zwischen den Kulturen, die in retinolhaltigem oder retinolfreiem Medien inkubiert wurden, erkennbar.

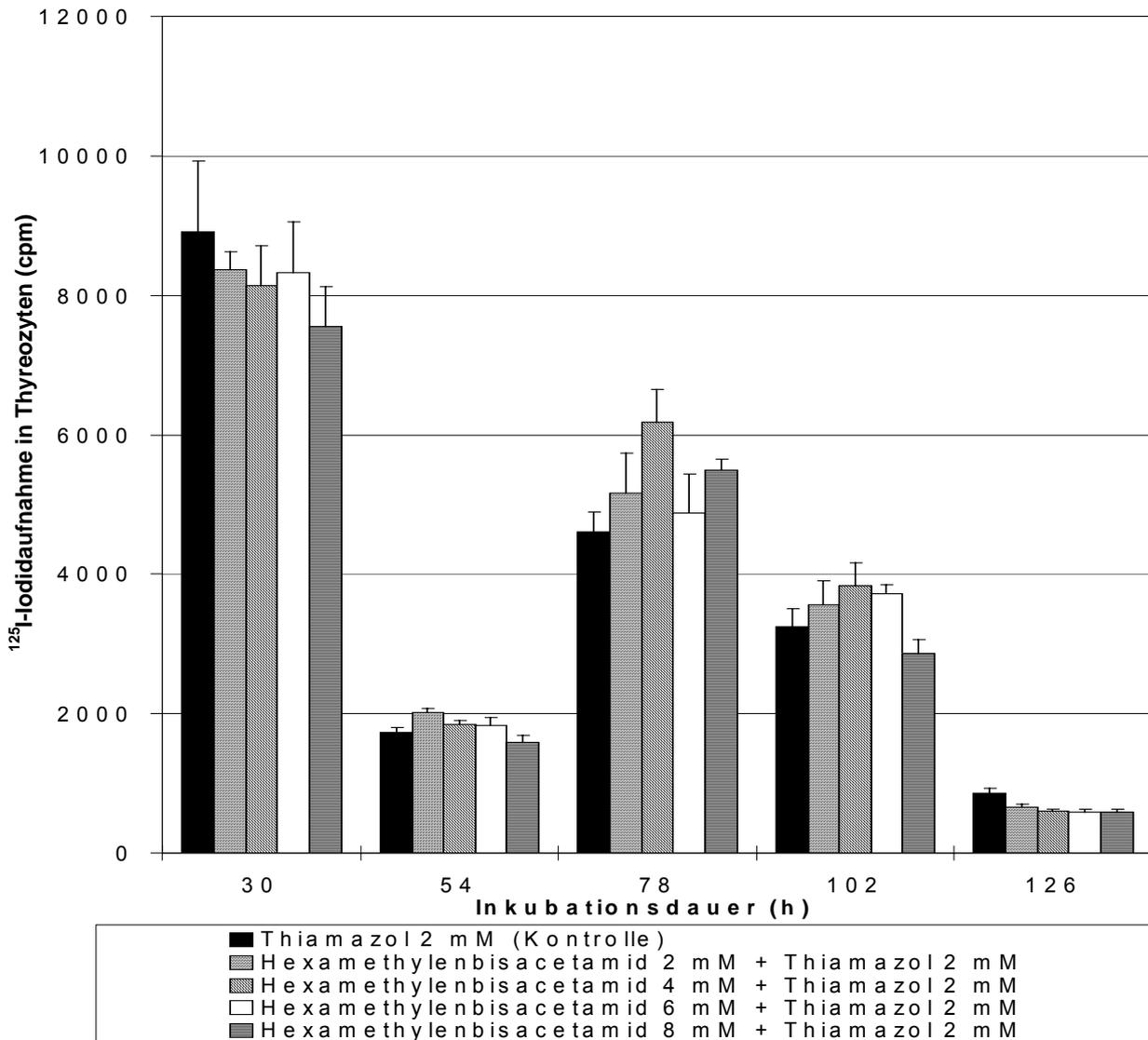


Abb.8. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Zugabe von Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 4 im Anhang)

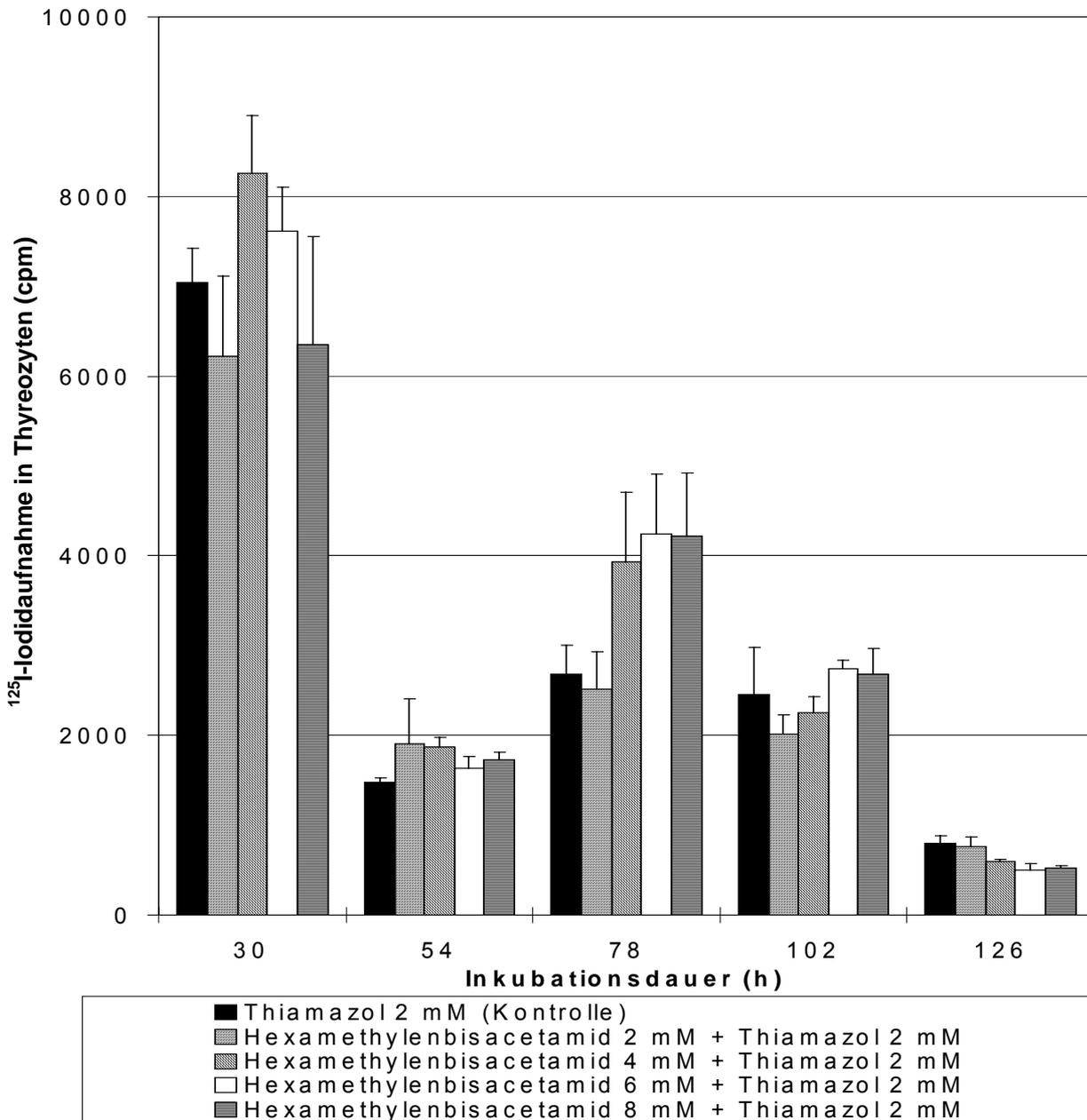


Abb.9. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Stimulation der Thyrozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Zugabe von Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 4 im Anhang)

3.1.3 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Perchlorat und in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 1 mM Perchlorat und 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Ziel ist es zu prüfen, ob und wie Perchlorat und HMBA miteinander interagieren. Versuchsaufbau und Auswertung ist ansonsten ganz analog der Beschreibung unter 3.1.2. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die mit 1 mM Perchlorat und 1,3 mU TSH / Kultur behandelt wurden.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt.

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, zeigen nach 24 Stunden die nur mit 1 mM Perchlorat behandelten Thyreozyten die höchste Rate in der Radioiodaufnahme. Durch zusätzliche Stimulation mit HMBA konnte eine Abnahme im Radioiod-Uptake erreicht werden. Diese war unter 2 mM HMBA gegenüber der Kontrolle sogar signifikant erniedrigt. Nach 48 Stunden Inkubationszeit änderten sich die Verhältnisse. Die mit HMBA stimulierten Thyreozytenkulturen zeigten nun eine tendenzielle konzentrationsabhängige Zunahme in der ¹²⁵I-Iodidaufnahme. Nach 72 Inkubation Stunden liessen sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachweisen. Nach 96 und 120 Stunden Stimulationszeit konnte ein von der HMBA-Konzentration abhängiger Rückgang in der Radioiodaufnahme gezeigt werden, der nach 96 Stunden nur zwischen den mit 8 mM HMBA stimulierten Kulturen und der Kontrolle signifikant war. Nach 120 Stunden Inkubationszeit war der von der HMBA-Konzentration abhängige Rückgang in der Radioiodaufnahme unter 4; 6 und 8 mM HMBA signifikant von der Kontrolle verschieden. Die Maximalwerte der Radioiodaufnahme bei den Kontrollkulturen wurden nach 96 Stunden Inkubation gemessen.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 11) zeigten sich nach 24 Stunden unter allen mit HMBA behandelten Thyreozyten keine signifikanten Unterschiede in der Radioiodaufnahme im Vergleich zur nur mit Perchlorat behandelten Kontrolle. Nach 48 Stunden Inkubation liess sich unter HMBA ein tendenzieller Anstieg im Radioiod-Uptake beobachten, der jedoch zur Kontrolle nicht signifikant verschieden war. Zum Zeitpunkt 72 und 96 Stunden liess sich die Radioiodaufnahme durch zusätzliche Stimulation der Thyreozyten mit HMBA nicht signifikant gegenüber der Kontrolle beeinflussen. Nach 120 Stunden konnte nur unter 4 mM HMBA ein tendenzieller Anstieg in der Radioiodaufnahme beobachtet werden. Alle anderen Thyreozytenkulturen verhielten sich ähnlich wie die nur mit 1 mM Perchlorat stimulierte Kontrolle.

Werden die in retinolfreiem Medium kultivierten Thyreozyten mit den in retinolhaltigem Medium kultivierten verglichen, so stellt man fest, dass die Radioiodaufnahme bei den mit Perchlorat behandelten Kontrollthyreozyten, die in retinolhaltigem Medium kultiviert wurden, nach 24 und 96 Stunden deutlich niedriger ist als bei jenen in retinolfreiem Medium. Nach 72 Stunden Inkubation unterscheiden sich die mit 2; 4; 6 und 8 mM HMBA behandelten Kulturen in der Radioiodinkorporation in Abhängigkeit vom verwendeten Medium signifikant. In retinolhaltigem Medium sind die Speicherwerte hier höher.

Die Betrachtung der normierten Mittelwerte (Abb. 10a im Anhang) zeigt in retinolfreiem Medium eine von der HMBA-Konzentration abhängige Abnahme der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten.

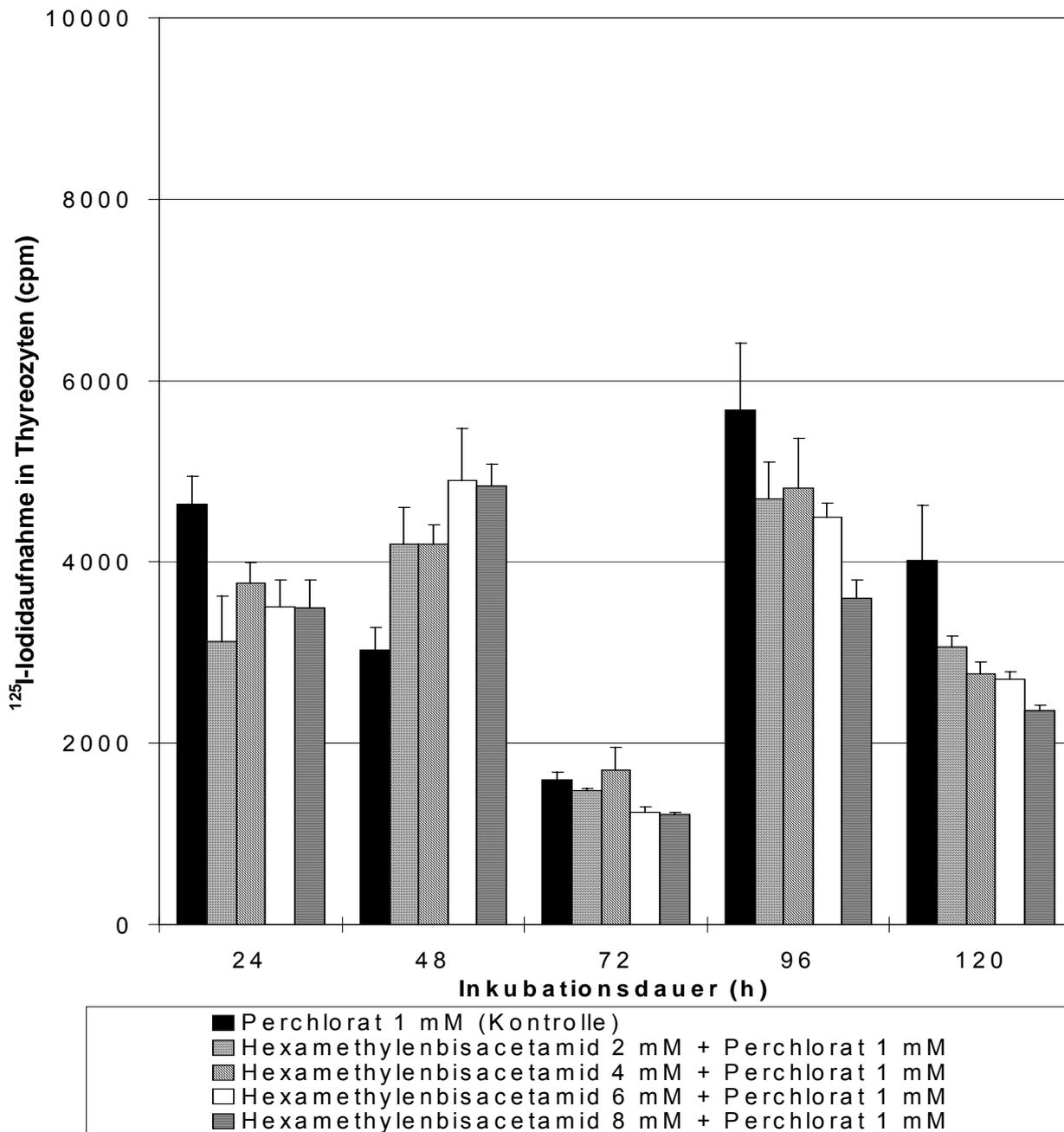


Abb.10. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Stimulation der Thyrozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 5 im Anhang)

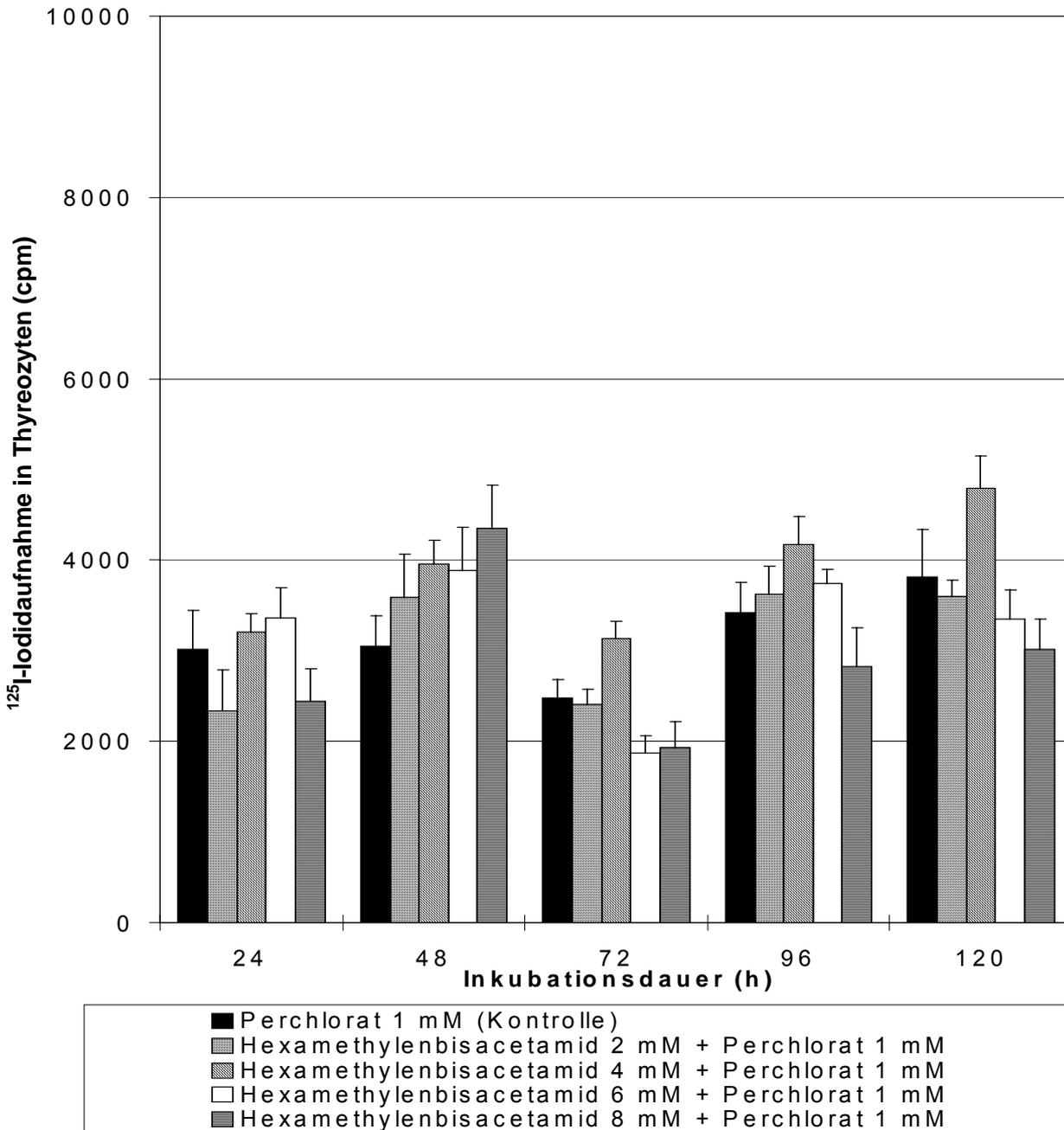


Abb.11. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 5 im Anhang)

In einem weiteren Ansatz wurden kultivierte Schweinethyreozyten mit 1 mM Perchlorat und 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte entweder in retinolfreiem oder in retinolhaltigem (0,6µM) NCTC-135 Medium. Die Stimulation der Thyreozytenkulturen mit HMBA erfolgte 16 Stunden nach Aussaat. Perchlorat (1 mM), ¹²⁵I-Radioiod und 1,3 mU TSH / Kultur wurden jedoch jeweils erst 6 Stunden vor der Ernte hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht mit HMBA, jedoch mit 1 mM Perchlorat und 1,3 mU TSH / Kultur behandelt wurden. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 30; 54; 78; 102 und 126 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch entweder in retinolfreiem oder retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

Nach 30 Stunden Inkubation in retinolfreiem NCTC-135 Medium (Abb. 12) kann eine signifikante Zunahme in der Radioiodinkorporation unter der 4 mM HMBA-Konzentration beobachtet werden. Diese nahm den 1,3fachen Wert der unstimulierten Kontrolle an. HMBA (6 und 8 mM) bewirkte nach 54 Stunden Inkubation einen signifikanten Rückgang in der Radioiodaufnahme. Diese lag deutlich unterhalb von jener der nur mit 1 mM Perchlorat behandelten Kontrolle. Zu den Zeitpunkten 78, 102 und 126 Stunden liessen sich in der Radioiodaufnahme keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle beobachten. Das Maximum der Radioiodinkorporation lag sowohl bei der Kontrolle, als auch bei allen mit HMBA stimulierten Kulturen, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurden, bei 78 Stunden.

Wie Abbildung 13 (Kulturen in retinolhaltigem Medium) zeigt, bewirkte die Stimulation mit 4; 6 und 8 mM HMBA nach 30 Stunden eine leichte Erhöhung

der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrolle. Nach 54 Stunden fiel die Radioiodaufnahme unter allen HMBA-Konzentrationen einschliesslich der Kontrolle auf ein tiefes Niveau. Der Unterschied in der Radioiodaufnahme zwischen Kontrolle und den mit 8 mM HMBA behandelten Kulturen war signifikant. Unter der 6 mM HMBA-Konzentration zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle nach einer Inkubationszeit von 78 Stunden eine Erhöhung der Aufnahmerate von Radioiod. Diese war signifikant verschieden zur unstimulierten Kontrolle. Nach 102 und 126 Stunden bestanden keine Unterschiede in der Radioiodaufnahme mehr zwischen der Kontrolle und den mit HMBA stimulierten Schweinethyreozyten.

Stellt man die Abbildungen 12 und 13 gegenüber, so beobachtet man nach 30 Stunden Inkubation in retinolhaltigem NCTC-135 Medium einen signifikanten Rückgang der Radioiodaufnahme bei den Thyreozyten der Kontrolle und bei den mit 2 und 4 mM HMBA behandelten Zellen, verglichen mit jenen, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurden. Dieser Rückgang betrug bei den drei Kulturen den 0,7fachen Wert der in retinolfreiem Medium kultivierten Vergleichsthyreozyten. Nach 54 Stunden unterschieden sich die in retinolfreiem und in retinolhaltigem Medium kultivierten Thyreozyten in ihrer Radioiodaufnahme nicht. Dies änderte sich nach 78 und 102 Stunden Inkubation. Alle in retinolhaltigem Medium kultivierten Thyreozyten einschliesslich der Kontrolle zeigten gegenüber den Kulturen in retinolfreiem Medium einen signifikanten Rückgang im Radioiod-Uptake. Dieser betrug bei allen Kulturen in retinolhaltigem Medium annähernd die Hälfte der Radioiodaufnahme der Vergleichskulturen in retinolfreiem Medium. Nach 126 Stunden liess sich der signifikante Rückgang der Radioiodinkorporation gegenüber den Vergleichskulturen in retinolfreiem Medium nur noch für die Kontrollkulturen und die mit 2 mM HMBA stimulierten Kulturen belegen.

Wie der Vergleich über die gesamte Inkubationsdauer auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Radioiodaufnahmeraten zeigt (Abb. 12a und 13a), steigt unter HMBA die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten leicht an.

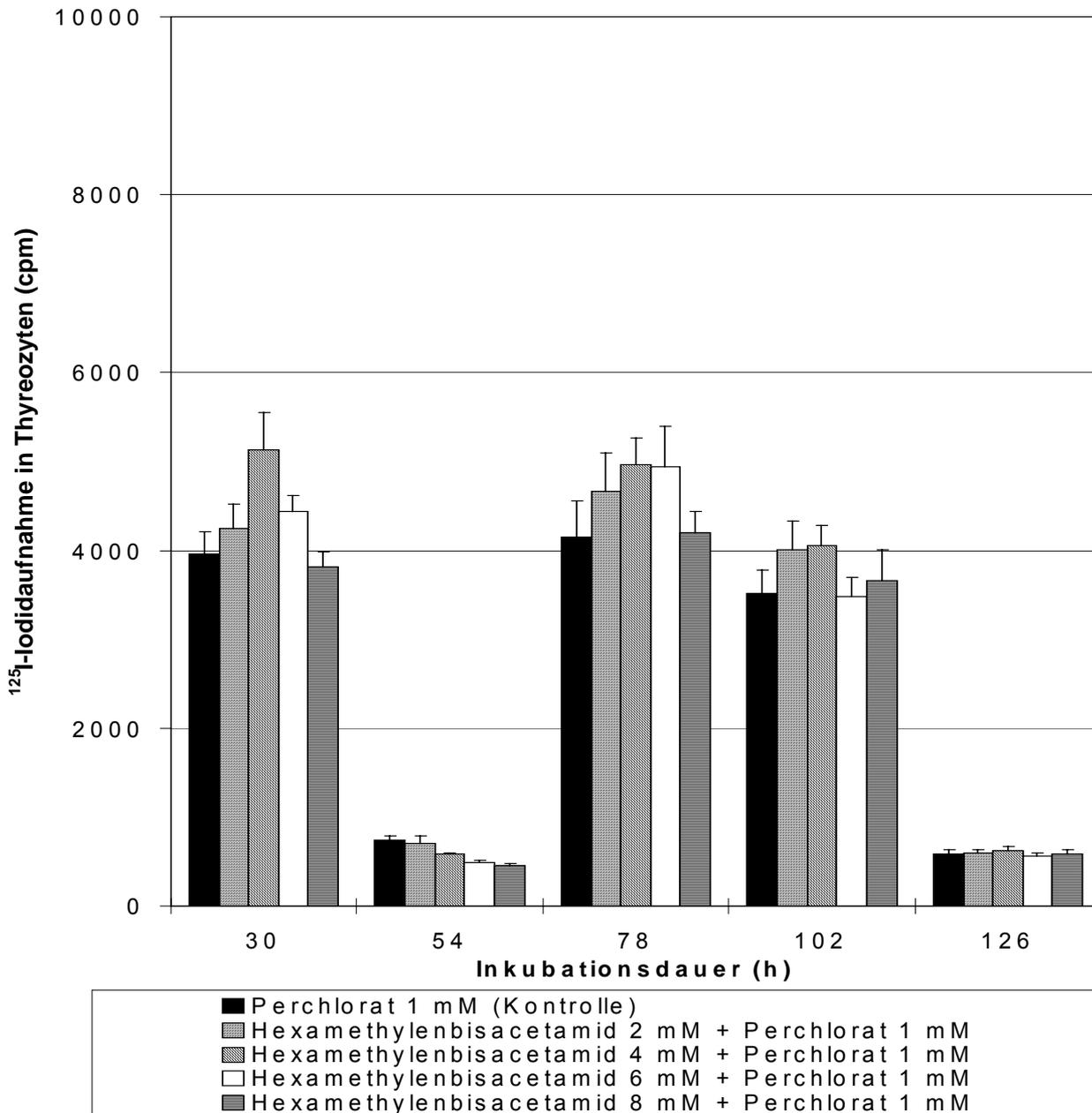


Abb.12. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Stimulation der Thyrozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 6 im Anhang)

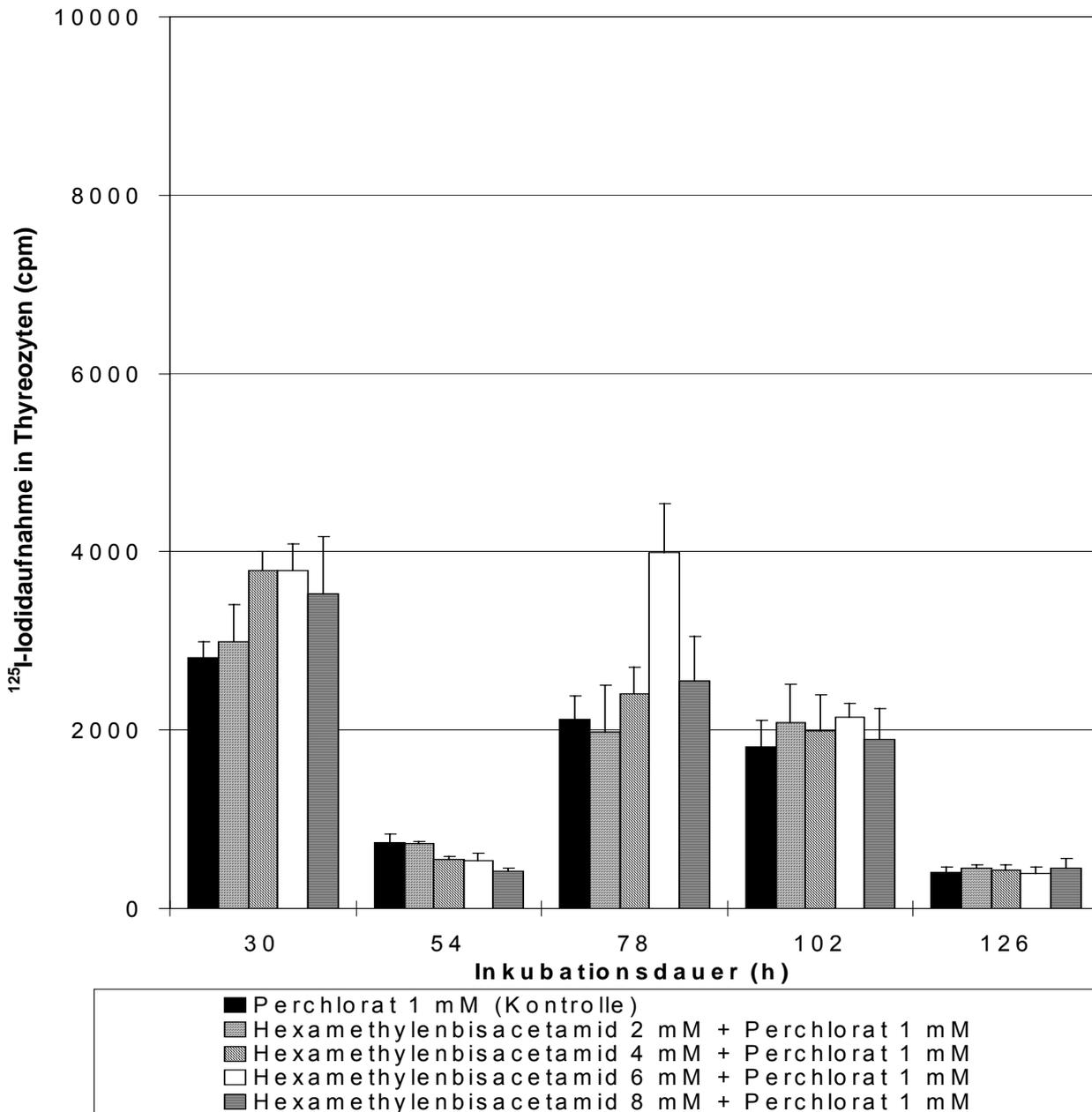


Abb.13. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Stimulation der Thyrozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^{125}I -Iodid jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 6 im Anhang)

3.1.4 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von HMBA (2 mM) und unterschiedlicher TSH-Konzentrationen

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 2 mM HMBA stimuliert. Gleichzeitig erfolgte die Stimulation mit unterschiedlichen TSH-Konzentrationen (0,01; 0,1; 0,5 und 1 mU / Kultur). Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in einem retinolfreien NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in einem NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen bei der Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA stimuliert wurden. Die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 16; 40; 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden TSH-Konzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Radioiodinkorporation in Thyreozyten, die zwar mit gleichen TSH-Konzentrationen stimuliert, jedoch entweder in retinolfreiem oder in retinolhaltigem Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

Wie Abb. 14 zeigt, bewirkt 2 mM HMBA bei den Thyreozyten in retinolfreiem Medium gegenüber der Kontrollgruppe zu jeder gemessenen Zeit einen tendenziell verstärkenden, zum Teil sogar signifikanten Einfluss auf die Radioiodinkorporation. Die Unterschiede zur Kontrolle waren nach 16, 40 und 64 Stunden signifikant. Bei der TSH-Konzentration von 0,01 mU / 750 µl Medium konnte nach einer Stimulationszeit von 40 Stunden eine leichte aber signifikante Erhöhung der Radioiodaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Die TSH-Konzentration von 0,1 mU / 750 µl Medium bewirkte 16, 40 und 64 Stunden nach Stimulationsbeginn eine nicht signifikante Verstärkung der Aufnahme von Radioiod im Vergleich zur Kontrolle. Unter den TSH-Konzentrationen 0,5 und 1 mU / 750 µl Medium war die

Radioiodaufnahme in die Thyreozyten nach 16 und 88 Stunden Inkubation annähernd gleich wie bei der unstimulierten Kontrollgruppe. Nach 40 und 64 Stunden konnte ein tendenziell leichter Anstieg in der Radioiodaufnahme beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant von der Kontrolle verschieden war. Die Maximalwerte der Radioiodaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten (Kontrolle) wurden nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden gemessen. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die Maximalwerte der Radioiodaufnahme unter den TSH-Konzentrationen 0,01 und 0,1 mU / Kultur erreicht.

Wie Abb. 15 zeigt, konnte in retinolhaltigem NCTC-135 Medium unter 2 mM HMBA nach 40 und 64 Stunden ein leichter Anstieg in der Radioiodaufnahme nachgewiesen werden. Nach 88 Stunden sank die Radioiodaufnahme wieder bis auf das Niveau des Kontrollwertes ab. 0,01 mU TSH / Kultur verstärkte nach 16 Stunden Inkubationsdauer die Radioiodaufnahme unter 2 mM HMBA. Unter den TSH-Konzentrationen 0,1; 0,5 und 1 mU / Kultur lag die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten annähernd auf dem Niveau der Kontrollgruppe. Nach 40 Stunden Inkubation zeigte sich unter 0,5 und 1 mU TSH / Kultur ein leichter tendenzieller Abfall der Radioiodaufnahme unter das Niveau der Kontrolle. Die Konzentration von 0,5 mU TSH / Kultur bewirkte nach 64 und 88 Stunden einen Anstieg der Radioiodaufnahme gegenüber der Kontrolle. TSH (1 mU / Kultur) hatte zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf den Radioiod-Uptake. Die Maximalwerte der Radioiodaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten wurden nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden gemessen.

Werden Abbildung 14 und 15 einander gegenübergestellt, so ist die Radioiodaufnahme bei der in retinolhaltigem Medium inkubierten unstimulierten Kontrolle nach 16 und 40 Stunden Inkubation signifikant höher als bei der entsprechenden Kultur in retinolfreiem NCTC-135 Medium. Unter dem Einfluss von 0,5 und 1 mU TSH / Kultur zeigte sich bei Verwendung von retinolfreiem Medium nach 16 Stunden ein signifikanter Anstieg im Radioiod-Uptake gegenüber den entsprechenden Kulturen in retinolfreiem Medium. Für 0,5 und 1 mU TSH / Kultur betrug der Anstieg das 1,4fache des in retinolfreiem Medium erzielten Wertes. Nach 40 Stunden Inkubation liess sich unter der TSH-

Konzentration von 0,1 mU / Kultur ein signifikanter Anstieg in der Radioiodaufnahme gegenüber den in retinolfreiem Medium kultivierten Thyreozyten erreichen. Zu späteren Zeitpunkten hatten die unterschiedlichen Medien keinen signifikanten Einfluss auf die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten.

Bei der Betrachtung der auf die Kontrolle normierten Mittelwerte (Abb. 14a im Anhang) kann in retinolfreiem Medium für 2 mM HMBA eine 134%-ige Zunahme der Radioiodinkorporation im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. TSH-Zusätze verringern die Radioiodaufnahme Konzentrationsabhängig. In retinolhaltigem Medium sind diese Effekte deutlich schwächer ausgeprägt.

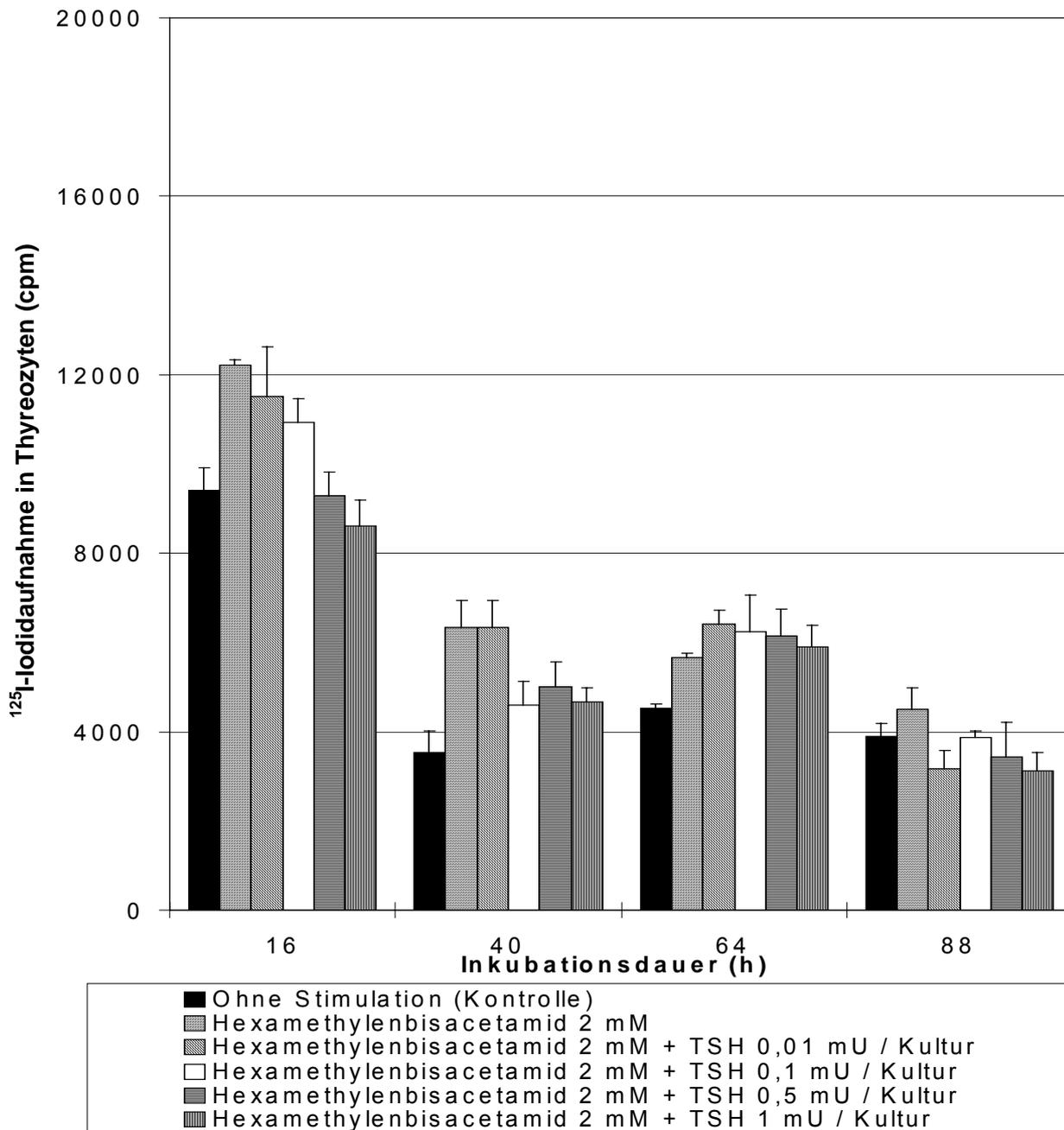


Abb.14. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (2 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Zugabe der Stimulanzen zu den Thyrozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na ^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7 im Anhang)

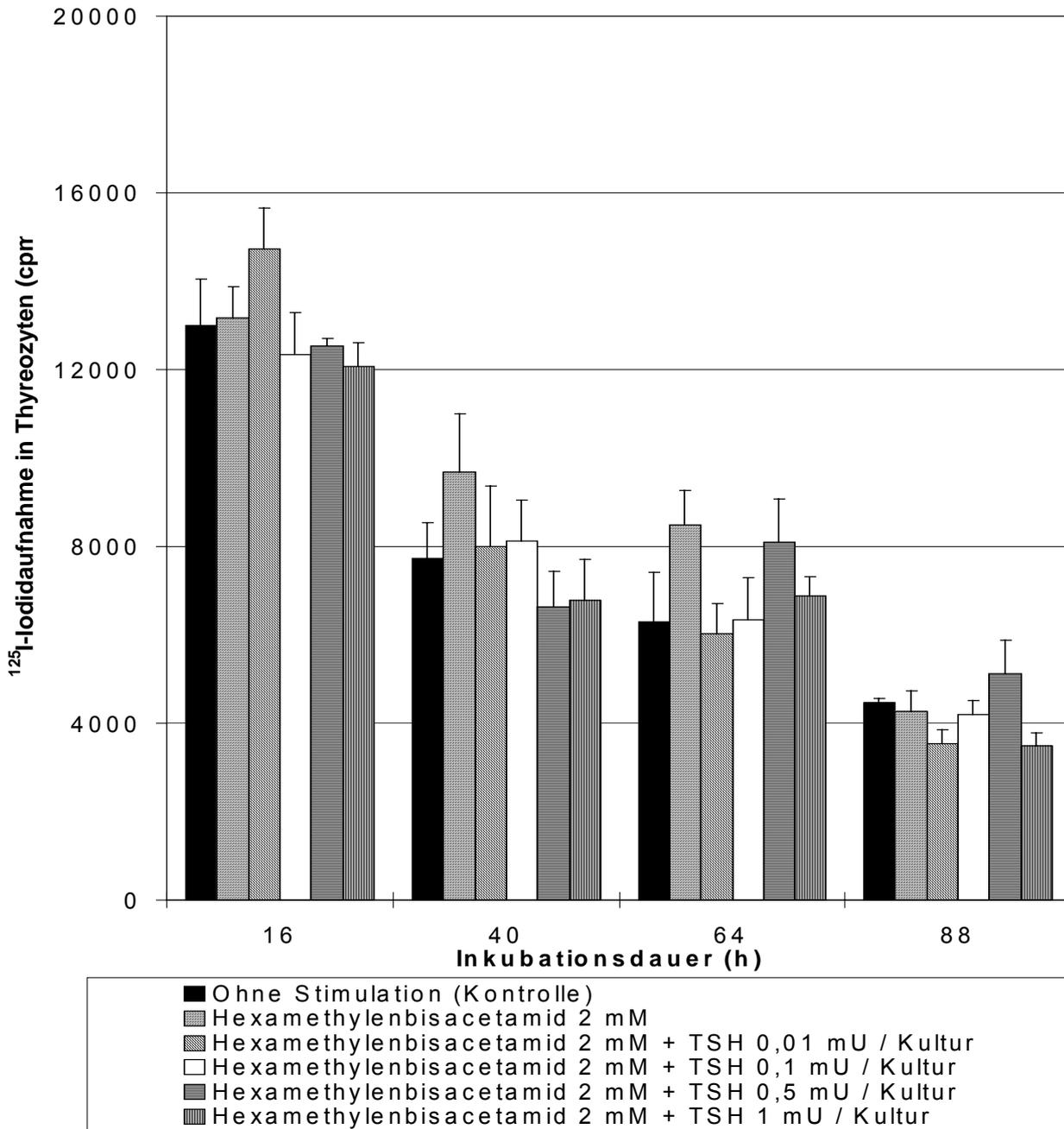


Abb.15. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (2 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Zugabe der Stimulanzien zu den Thyrozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit $0,6 \mu\text{M}$ Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n=4$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: $4\text{ kBq Na}^{125}\text{I}$. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7 im Anhang)

3.1.5 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von HMBA (6 mM) und unterschiedlicher TSH-Konzentrationen

Im Folgenden wird unter 3.1.4 beschriebene Versuch wiederholt. Es wird lediglich die 2 mM HMBA-Konzentration durch 6 mM ersetzt.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 16 und 17 dargestellt.

Wie Abb. 16 zeigt, nahm die Radioiodaufnahme unter 6 mM HMBA nach 16 und 40 Stunden Inkubationsdauer im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe signifikant zu. Im weiteren Verlauf bewirkte HMBA allein keine Steigerung des Radioiod-Uptakes gegenüber der Kontrolle. Durch zusätzliche Stimulation mit 0,01 mU TSH / Kultur konnte nach 16 Stunden Inkubation die Radioiodaufnahme signifikant gegenüber der unstimulierten Kontrolle gesteigert werden. Sie erreichte den 1,3fachen Wert der unstimulierten Kontrolle. Nach 40 Stunden Inkubationsdauer konnten nur die höheren TSH-Konzentrationen (0,1; 0,5 und 1 mU / Kultur) die Radioiodaufnahme gegenüber der unstimulierten Kontrollkultur steigern. Zu den späteren Zeitpunkten 64 und 88 Stunden konnten keine signifikanten Unterschiede in der ¹²⁵I-Iodidaufnahme beobachtet werden. Die Maximalwerte der Radioiodaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten wurden nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden gemessen. Zu dieser Zeit wurden auch die Maximalwerte unter allen TSH-Konzentrationen erreicht.

Wie Abb. 17 zeigt, konnte in retinolhaltigem NCTC-135 Medium unter 6 mM HMBA nach 16 und 40 Stunden ein leichter, nicht signifikanter Anstieg in der Radioiodaufnahme nachgewiesen werden. Nach 88 Stunden sank die Radioiodaufnahme signifikant unter das Niveau des Kontrollwertes ab. 0,01 mU TSH / Kultur hatte nach 16 Stunden Inkubationsdauer einen additiven Effekt auf die Radioiodaufnahme gegenüber der alleinigen Stimulation mit 6 mM HMBA. Ähnlich verhielt sich TSH in den Konzentrationen 0,1 und 0,5 mU / Kultur. Nach 40 Stunden Inkubation konnte ein tendenzieller Anstieg in der

Radioiodaufnahme unter 6 mM HMBA + TSH 1 mU / Kultur beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant verschieden zur unstimulierten Kontrolle war. Mit HMBA und TSH stimulierte Schweinethyreozyten zeigten nach 64 Stunden einen Rückgang im Radioiod-Uptake, der nach 88 Stunden signifikant verschieden zur Kontrolle war.

Betrachtet man Abb. 16 und 17 unter dem Aspekt des Vitamin A Gehaltes des Mediums, so fällt auf, dass die Radioiodaufnahme in die in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultivierten unstimulierten Schweinethyreozyten nach 16, 40 und 88 Stunden signifikant höher war als in den entsprechenden Vergleichskulturen in retinolfreiem Medium. Unter alleiniger Stimulation mit 6 mM HMBA war die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten in retinolhaltigem Medium nach 64 Stunden signifikant höher als jener in retinolfreiem Medium. 0,5 mU TSH / Kultur in retinolhaltigem Medium konnte nur nach 16 Stunden die Radioiodaufnahme in Thyreozyten signifikant gegenüber der entsprechenden Vergleichskultur in retinolfreiem Medium steigern. Der Anstieg betrug das 1,2fache. Weiter signifikante Unterschiede ergaben sich nicht.

Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte in Abb. 16a und 17a, so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in der Radioiodaufnahme zwischen den Kontrollkulturen und den mit unterschiedlichen TSH-Konzentrationen stimulierten Thyreozyten.

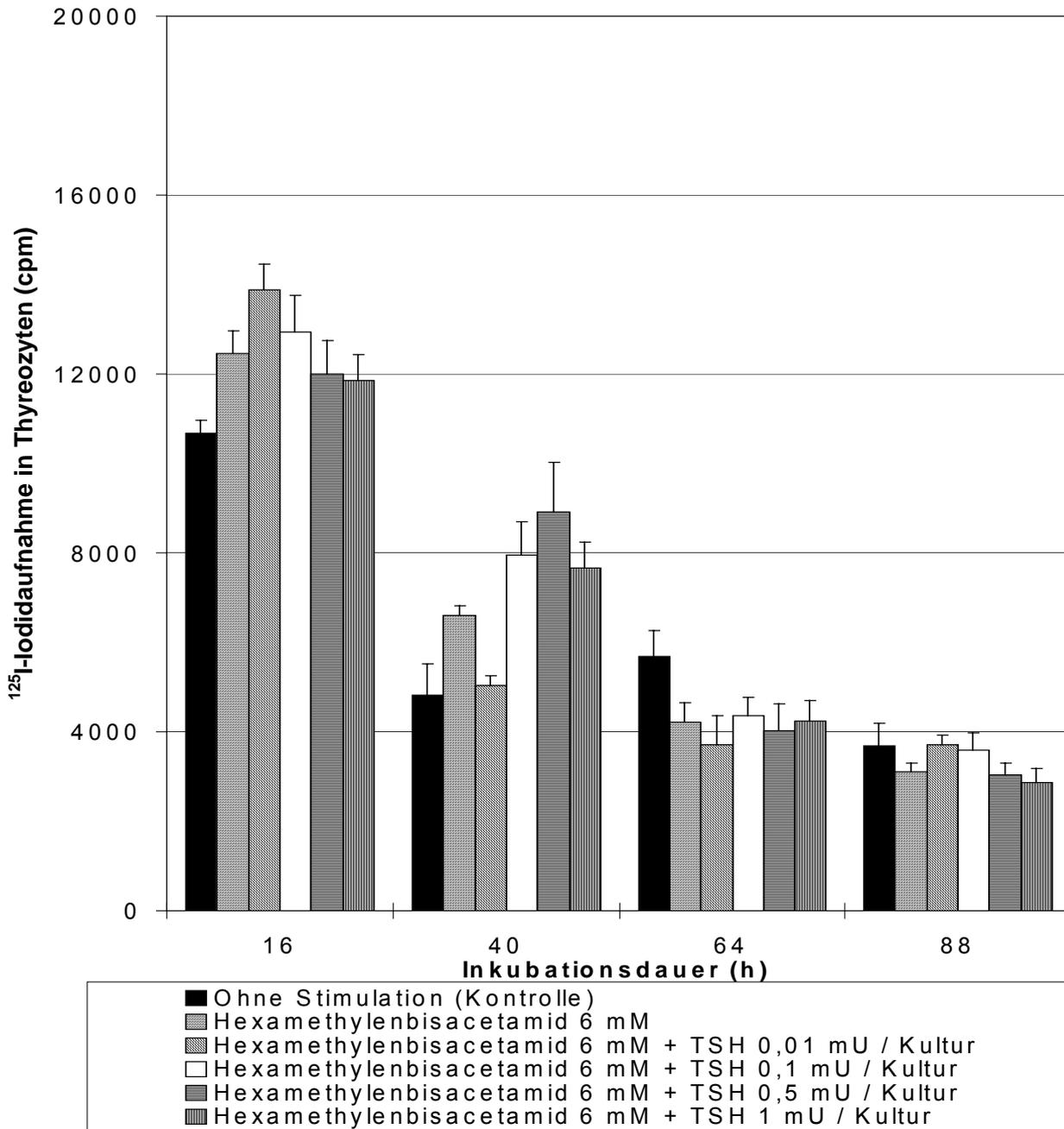


Abb.16. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (6 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Zugabe der Stimulanzen zu den Thyrozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n=4$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: 4kBq Na^{125}I . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 8 im Anhang)

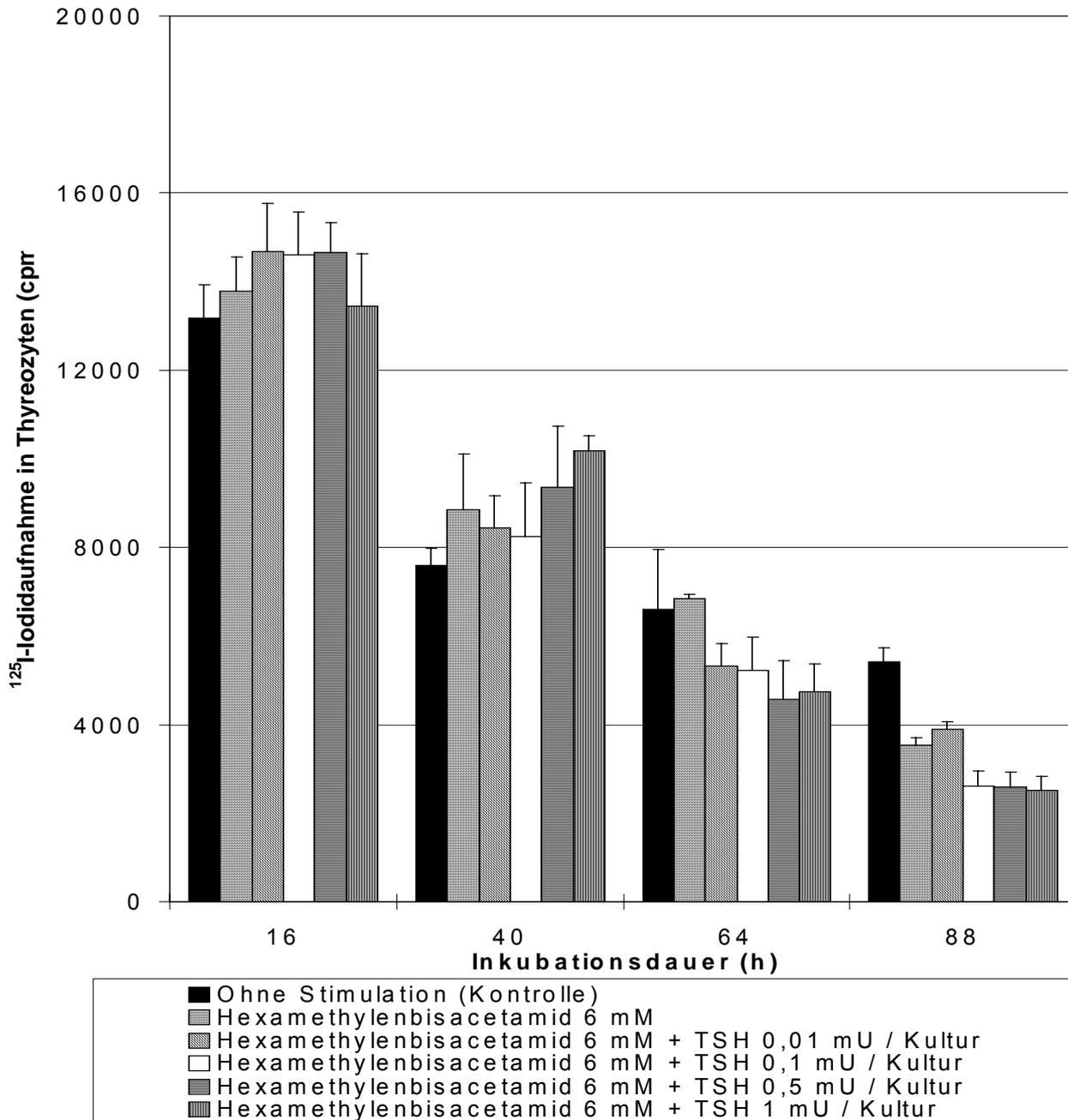


Abb.17. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (6 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Zugabe der Stimulanzen zu den Thyrozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit $0,6 \mu\text{M}$ Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, $n=4$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodid-Zugabe: $4\text{ kBq Na}^{125}\text{I}$. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 8 im Anhang)

3.2 ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, kultiviert in retinolhaltigem und retinolfreiem NCTC-135 Medium

3.2.1 ³H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von der HMBA-Konzentration und dem Stimulationszeitpunkt

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in retinolfreiem NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die stimulierenden Agenzien HMBA und 1,3 mU TSH / Kultur wurden den Thyreozytenkulturen 16h nach Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA stimuliert wurden. Die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 24; 48; 72; 96 und 120 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Thymidinaufnahme in Thyreozyten, die zwar mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch entweder in retinolfreiem NCTC-135 Medium oder in NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 18 und 19 dargestellt.

Wie Abb. 18 zeigt, konnte bei allen verwendeten HMBA-Konzentrationen nach 24 Stunden Inkubationsdauer ein tendenziell leichter Rückgang der Thymidinaufnahme im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Der Rückgang war unter 4 mM HMBA am stärksten ausgeprägt. Nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden konnten unter 6 und 8 mM HMBA eine signifikante Abschwächung der Thymidinaufnahme im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden. Nach 72 und 96 Stunden war die Thymidinaufnahme unter HMBA im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht signifikant verändert. Bei den 4; 6 und 8 mM HMBA-Konzentrationen liess sich nach einer Inkubationszeit

von 96 und 120 Stunden ein tendenzieller Rückgang der Thymidinaufnahme gegenüber der unstimulierten Kontrolle erkennen.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 19) unterschieden sich nach 24 Stunden Inkubation die kultivierten Thyreozyten in ihrer Thymidinaufnahme bei allen HMBA-Konzentrationen nicht signifikant von der unstimulierten Kontrolle. Diese Verhältnisse änderten sich nach 48 Stunden dramatisch. Bei allen HMBA-Konzentrationen konnte eine erhöhte Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten verzeichnet werden. Dieser betrug unter 6 mM HMBA das 2,8fache und unter 8 mM HMBA das 2,9fache der unstimulierten Kontrolle. Nach 72 Stunden Inkubation lagen die Thymidinaufnahmeraten unter 4; 6 und 8 mM HMBA leicht unterhalb jener der unstimulierten Kontrolle. Auch zu späteren Zeitpunkten liessen sich keine signifikanten Unterschiede im Thymidin-Uptake gegenüber der Kontrolle der Schweinethyreozyten erkennen.

Betrachtet man die Abbildungen 18 und 19 unter dem Gesichtspunkt des Retinolgehaltes des NCTC-135 Mediums, so ist für die in retinolfreiem Medium kultivierten nicht stimulierten Kontrollthyreozyten die Thymidinaufnahme nach 48 Stunden Inkubation gegenüber jenen in retinolhaltigem Medium signifikant um das 3,7fache erhöht. Für spätere Zeitpunkte konnten keine signifikanten Einflüsse der Retinols auf die Kontrollkulturen nachgewiesen werden. Nach 48 Stunden war die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten in retinolhaltigem Medium unter 2 und 4 mM HMBA gegenüber der Kultur in retinolfreiem Medium signifikant vermindert. HMBA in 2; 6 und 8 mM Konzentration erhöhte in retinolhaltigem Medium nach 96 Stunden die Aufnahme von Thymidin in die Schweinethyreozyten signifikant im Vergleich zu den Messergebnissen der Zellen in retinolfreiem NCTC-135 Medium.

Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Thymidinaufnahme in retinolfreiem Medium (Abb. 18a im Anhang), so zeigt das Wirkprofil eine von der HMBA-Konzentration abhängige Abnahme des Thymidin-Uptakes in die Thyreozyten, während es in retinolhaltigem Medium (Abb.19a) unter 2 mM, insbesondere aber unter 6 und 8 mM HMBA zu einer Zunahme des Thymidin-Uptakes kam. Diese Zunahme ist ganz offensichtlich

auf die ausgeprägte Zunahme des Thymidin-Einbaus nach 48 Stunden zurückzuführen.

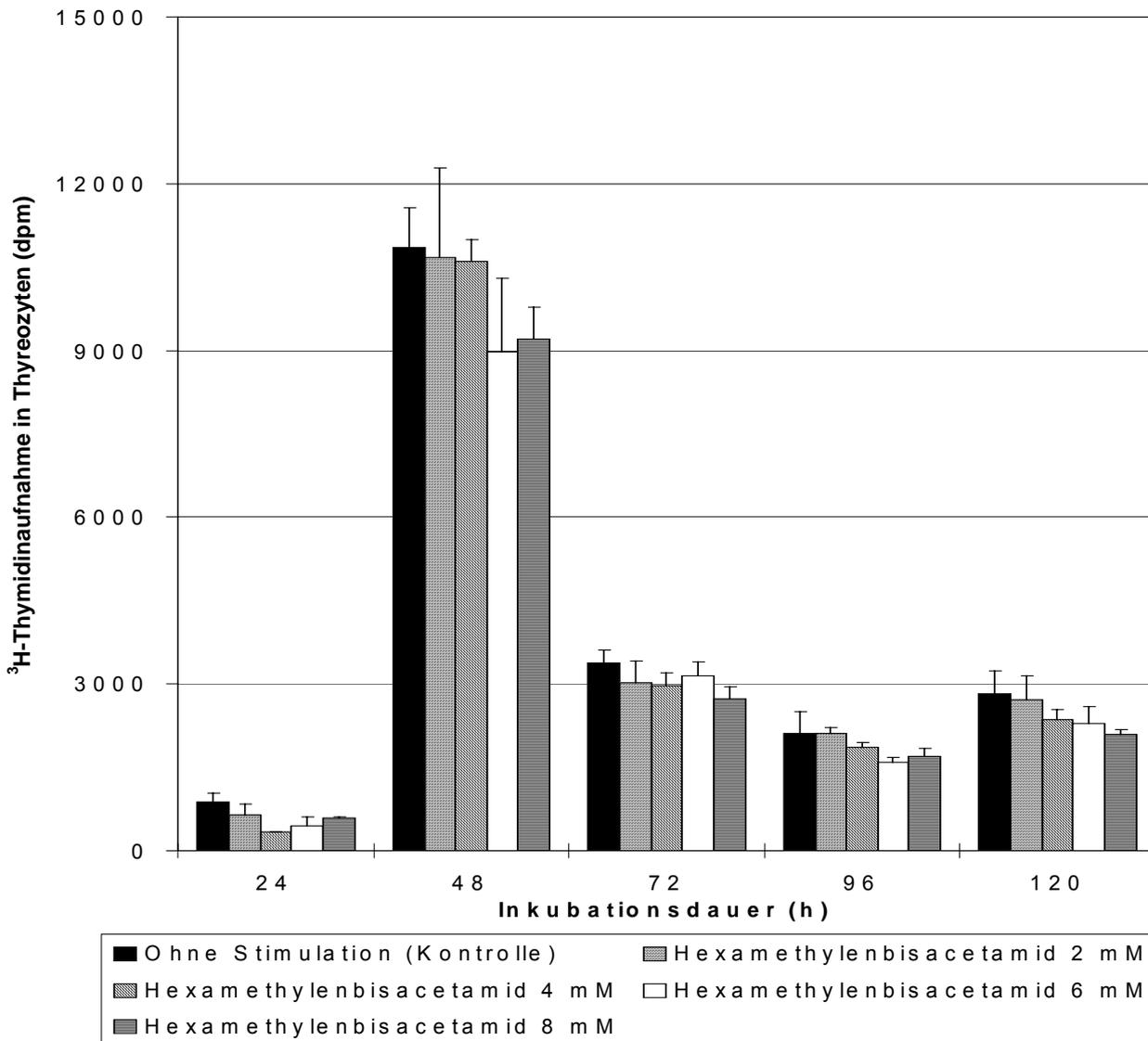


Abb.18. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 9 im Anhang)

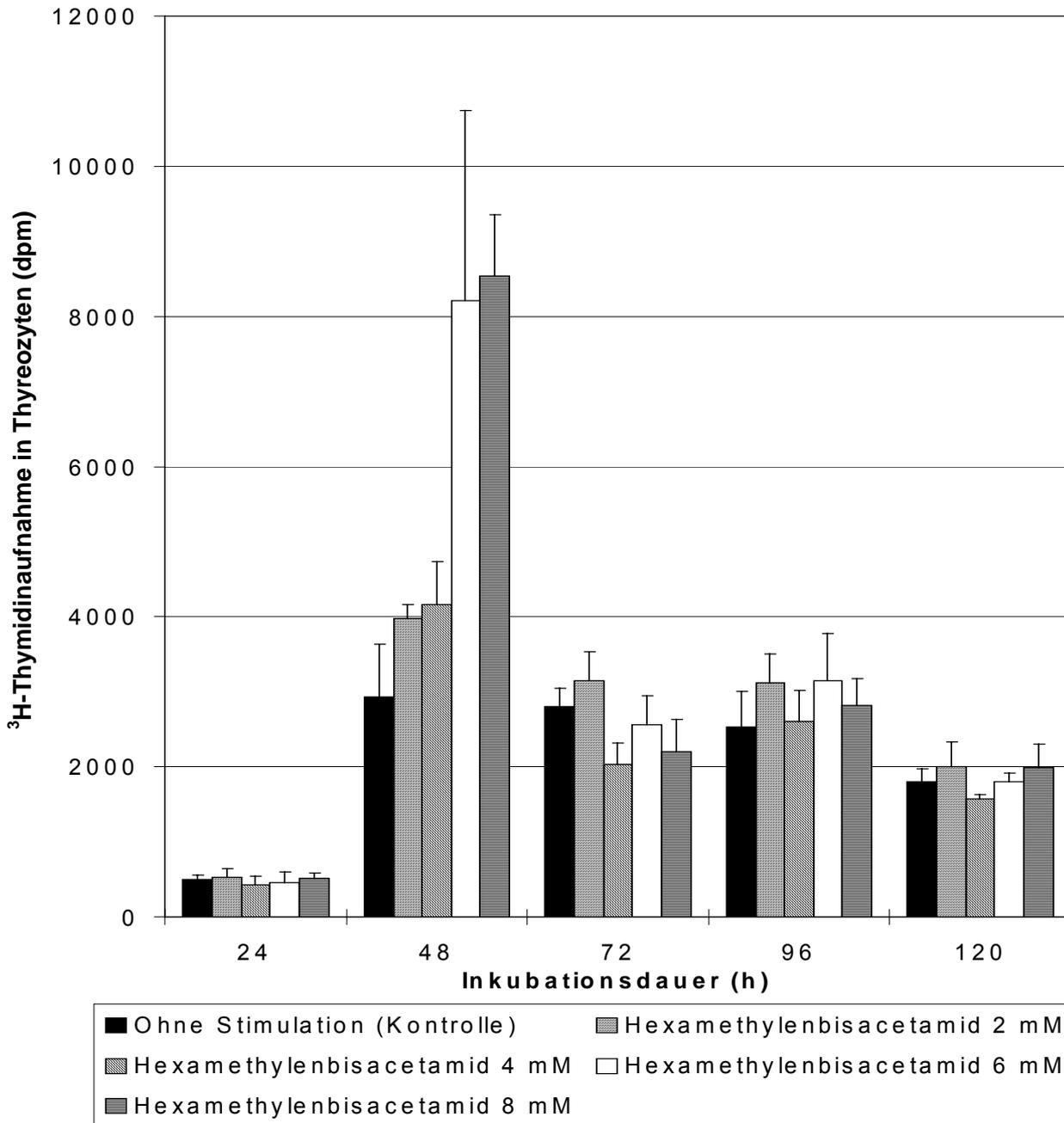


Abb.19. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 9 im Anhang)

In einem weiteren Ansatz wurden kultivierte Schweinethyreozyten mit 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in einem retinolfreien NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in einem NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die Stimulation der Thyreozytenkulturen mit HMBA erfolgte 16 Stunden nach Aussaat. Thymidin und 1,3 mU TSH / Kultur wurden in diesem Ansatz jeweils 6 Stunden vor der Ernte hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA stimuliert wurden. Die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 30; 54; 78; 102 und 126 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Thymidinaufnahme in Thyreozytenkulturen, die zwar mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch in retinolfreiem oder retinolhaltigem Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt.

Wie Abb. 20 zeigt, hatten keine der HMBA-Konzentrationen nach 30 Stunden Inkubation keinen signifikanten Effekt auf die ³H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten. HMBA in 2; 4 und 6 mM Konzentration erhöhte bei den Kulturen in retinolfreiem Medium nach 54 Stunden tendenziell die Aufnahme von Thymidin in die Schweinethyreozyten. Nach 78 Stunden liessen sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber der unstimulierten Kontrolle feststellen. Thyreozyten, die mit HMBA inkubiert wurden, zeigten nach 102 Stunden im Vergleich zu den unstimulierten Zellen eine Abnahme der Thymidininkorporation. Der Unterschied zur Kontrolle war hier für alle HMBA-Konzentrationen signifikant. Nach 126 Stunden lagen alle Werte auf dem Niveau der unstimulierten Schweinethyreozyten.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 21) zeigten die Thyreozyten nach 30 Stunden Inkubation gegenüber der Kontrolle einen signifikanten Anstieg in der Thymidinaufnahme unter 6 und 8 mM HMBA. Dieser erreichte bei 6 mM

HMBA den 1,3fachen und bei 8 mM HMBA den 1,5fachen Wert der unstimulierten Thyreozyten. Eine tendenzielle Zunahme im Thymidin-Uptake konnte nach 54 Stunden für alle HMBA-Konzentrationen festgestellt werden. Nach 78 Stunden Inkubationszeit zeigte sich eine Abnahme in der Thymidinaufnahme bei allen HMBA-Konzentrationen, wobei diese Abnahme unter 2 und 4 mM HMBA signifikant auf die Hälfte zurückging. Die ^3H -Thymidinaufnahme unter 4; 6 und 8 mM HMBA lag nach 102 Stunden tendenziell unterhalb der unstimulierten Kontrolle. Zum späteren Zeitpunkt liessen sich keine signifikanten Unterschiede ermitteln.

Aus dem Vergleich der Abbildungen 20 und 21 kann man erkennen, dass die Thymidinaufnahme bei den unstimulierten Thyreozyten in retinolhaltigem Medium gegenüber jenen in retinolfreiem Medium nach 30; 54 und 126 Stunden signifikant auf die Hälfte zurückgeht. HMBA-Konzentrationen von 2 und 4 mM reduzierten die Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, die in retinolhaltigem Medium kultiviert wurden, signifikant auf die Hälfte. Eine signifikante Abnahme in der ^3H -Thymidinaufnahme zeigte sich auch bei Thyreozyten, in retinolhaltigem Medium, die mit 8 mM HMBA stimuliert wurden zum Zeitpunkt 78 und 126 Stunden.

Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Thymidinaufnahme, so zeigt das Wirkprofil weder in retinolfreiem noch in retinolhaltigem Medium eine Zunahme der ^3H -Thymidinaufnahme, sondern eher eine Abnahme, die in retinolhaltigem Medium unter 2, 4 und 8 mM HMBA ausgeprägter erscheint als in retinolfreiem Medium (Abb. 20a und 21a).

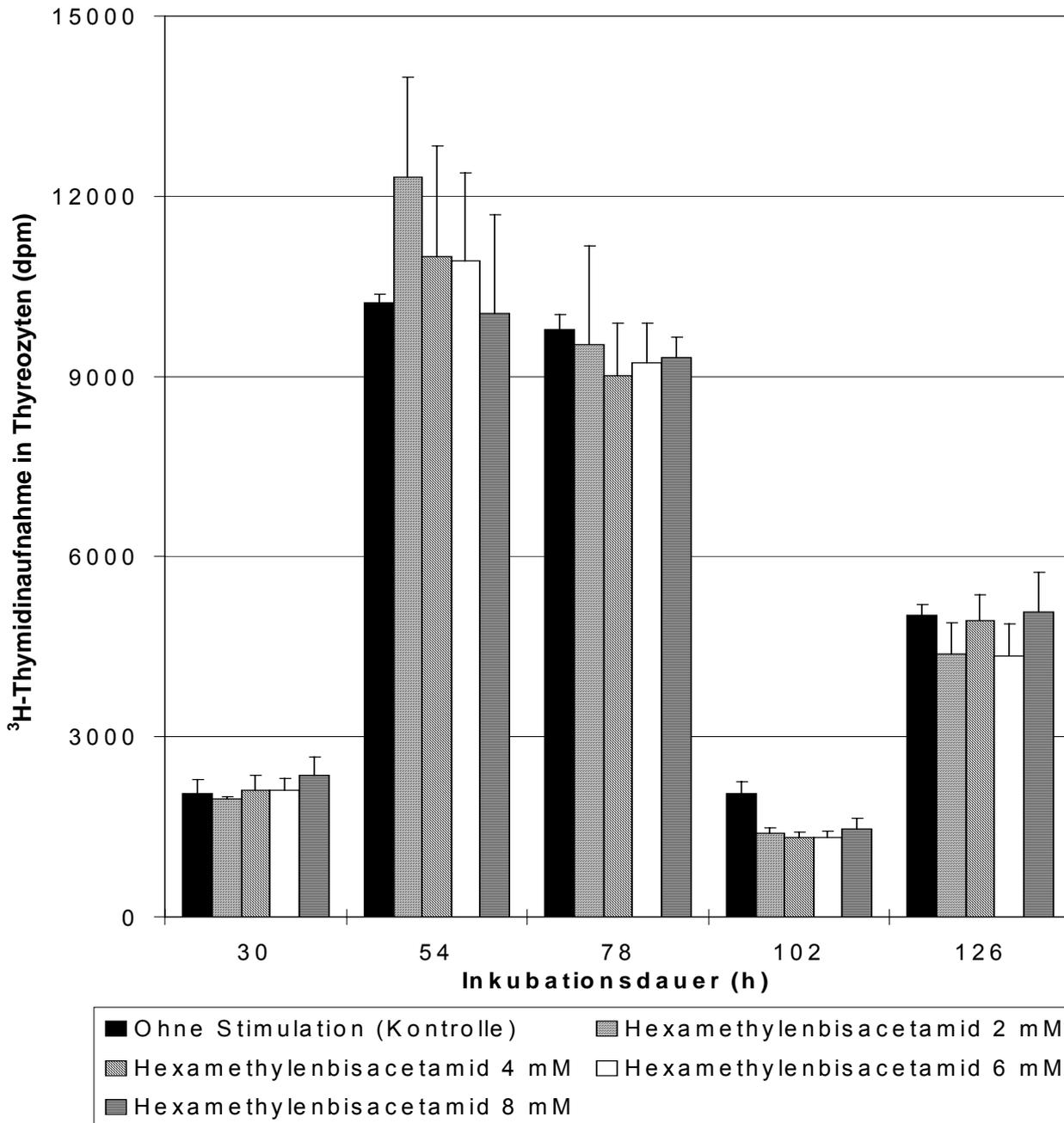


Abb.20. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 10 im Anhang)

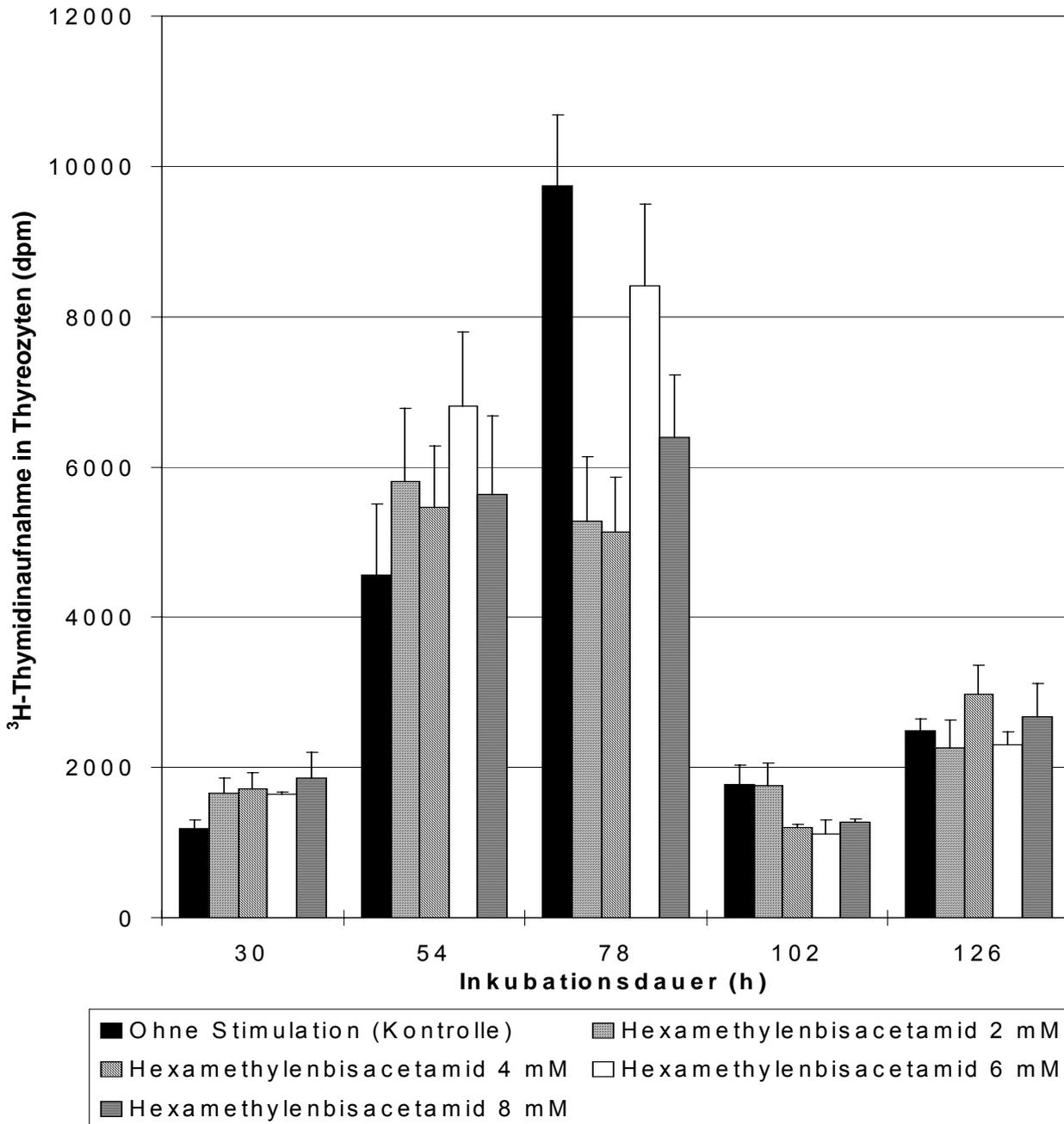


Abb.21. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 10 im Anhang)

3.2.2 ³H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Thiamazol (2 mM) und von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 2 mM Thiamazol und 2; 4; 6 und 8 mM HMBA Medium stimuliert. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in einem retinolfreien NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in einem NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die stimulierenden Agenzien HMBA und 1,3 mU TSH / Kultur wurden den Thyreozytenkulturen 16h nach Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die durch 2 mM Thiamazol stimuliert wurden. Die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 24; 48; 72; 96 und 120 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich von Thyreozytenkulturen, die zwar mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch entweder in retinolfreiem oder retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 22 und 23 dargestellt.

Wie Abb. 22 zeigt, konnte bei allen verwendeten HMBA-Konzentrationen nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gemessen werden. Es zeigte sich lediglich ein tendenzieller Rückgang in der Thymidinaufnahme unter 6 und 8 mM HMBA. Nach 48 Stunden waren alle HMBA-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle erhöht. Dieser Zustand änderte sich nach 72, 96 und 120 Stunden. Bei allen mit HMBA stimulierten Zellen zeigte sich dann ein tendenzieller Rückgang in der Thymidinaufnahme, wobei dieser bei 6 und 8 mM HMBA am stärksten ausgeprägt war. Die Maximalwerte der Thymidinaufnahme in den mit 2 mM Thiamazol stimulierten Schweinethyreozyten wurden nach einer Stimulationszeit von 48 Stunden gemessen. Zu diesem Zeitpunkt waren auch die Maximalwerte unter allen HMBA-Konzentrationen erreicht.

In Abb. 23 zeigt sich nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden in retinolhaltigem NCTC-135 Medium unter allen HMBA-Konzentrationen ein tendenzieller Anstieg der Thymidinaufnahme in die Thyreozyten gegenüber der Kontrolle. Diese Zunahme war unter 4 mM HMBA signifikant erhöht und erreichte den 2,2fachen Wert der Kontrolle. Der tendenzielle Anstieg in der Thymidinaufnahme unter HMBA setzte sich nach 48 Stunden fort, wobei HMBA in einer Konzentration von 6 mM die höchsten Aufnahmeraten aufwies. Zu den späteren Zeitpunkten 72, 96 und 120 Stunden liess sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der nur mit 2 mM Thiamazol stimulierten Kontrolle erkennen.

Betrachtet man die Abb. 22 und 23 unter dem Aspekt des Vitamin A Gehaltes des Mediums, so beobachtet man, dass die Thymidinaufnahme in die in retinolhaltigem Medium kultivierten Thyreozyten der unstimulierten Kontrolle nach 24, 48, 72 und 120 Stunden signifikant niedriger war als in den entsprechenden Vergleichskulturen in retinolfreiem Medium. Auch die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten bei Verwendung von retinolhaltigem NCTC-135 Medium unterscheidet sich unter 2 mM HMBA nach 24 und 48 Stunden Inkubationszeit signifikant von jener unter Verwendung von retinolfreiem Medium. Nach 24 und 48 Stunden erreicht die Aufnahme hier lediglich das 0,6fache verglichen mit der Aufnahme bei den Thyreozyten, die in retinolfreiem Medium unter 2 mM HMBA kultiviert wurden. Eine signifikante Abnahme in der Thymidinaufnahme ist unter 4 mM HMBA nach 72 Stunden erkennbar. Unter 8 mM HMBA kam es nach 48 Stunden Inkubation zu einer signifikanten Abnahme der Thymidinaufnahme bei den in retinolhaltigem Medium kultivierten Schweinethyreozyten. Diese erreichte nur das 0,6fache der Thymidinaufnahme der mit 8 mM HMBA stimulierten Vergleichskultur in retinolfreiem Medium

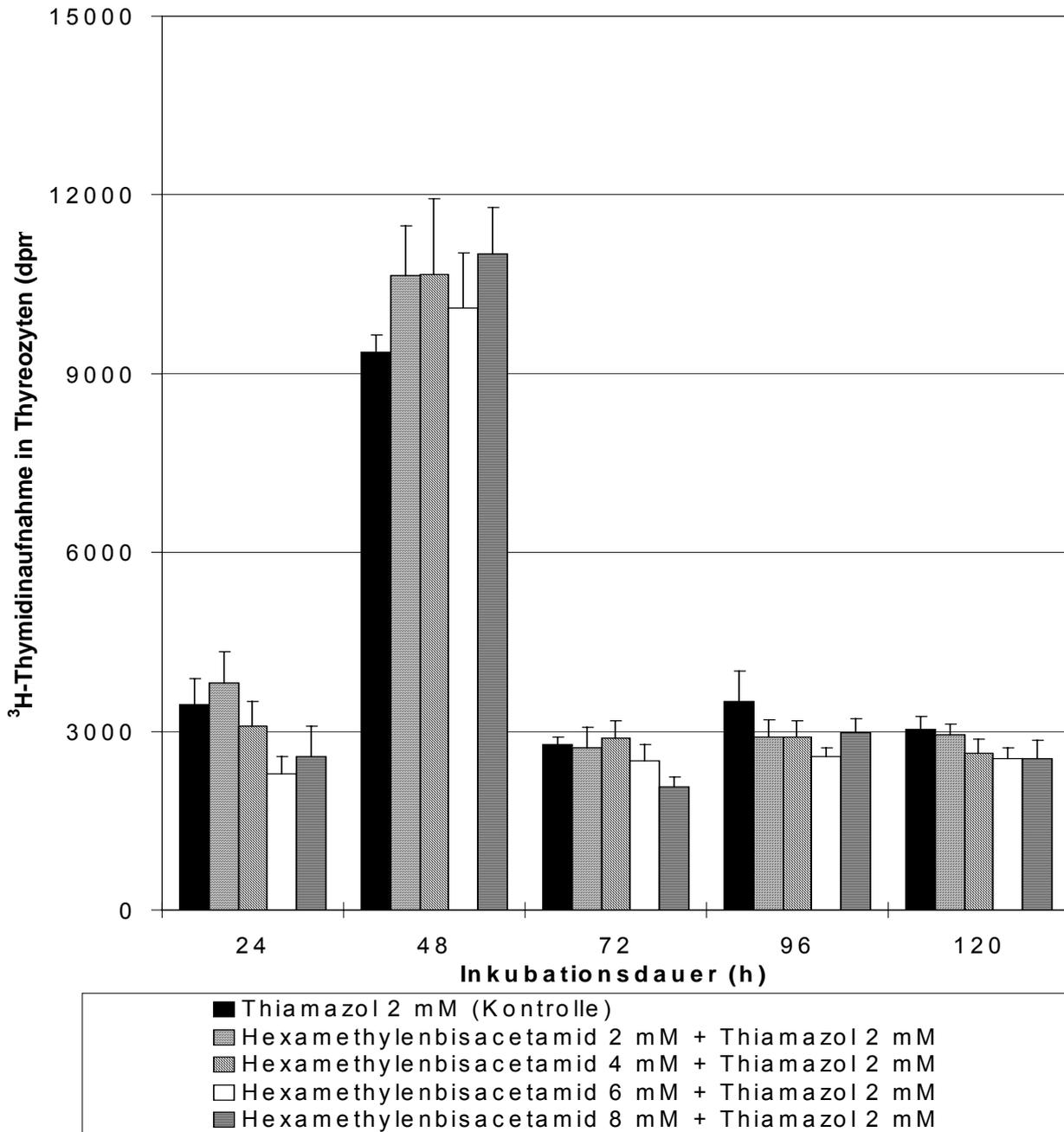


Abb.22 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 11 im Anhang)

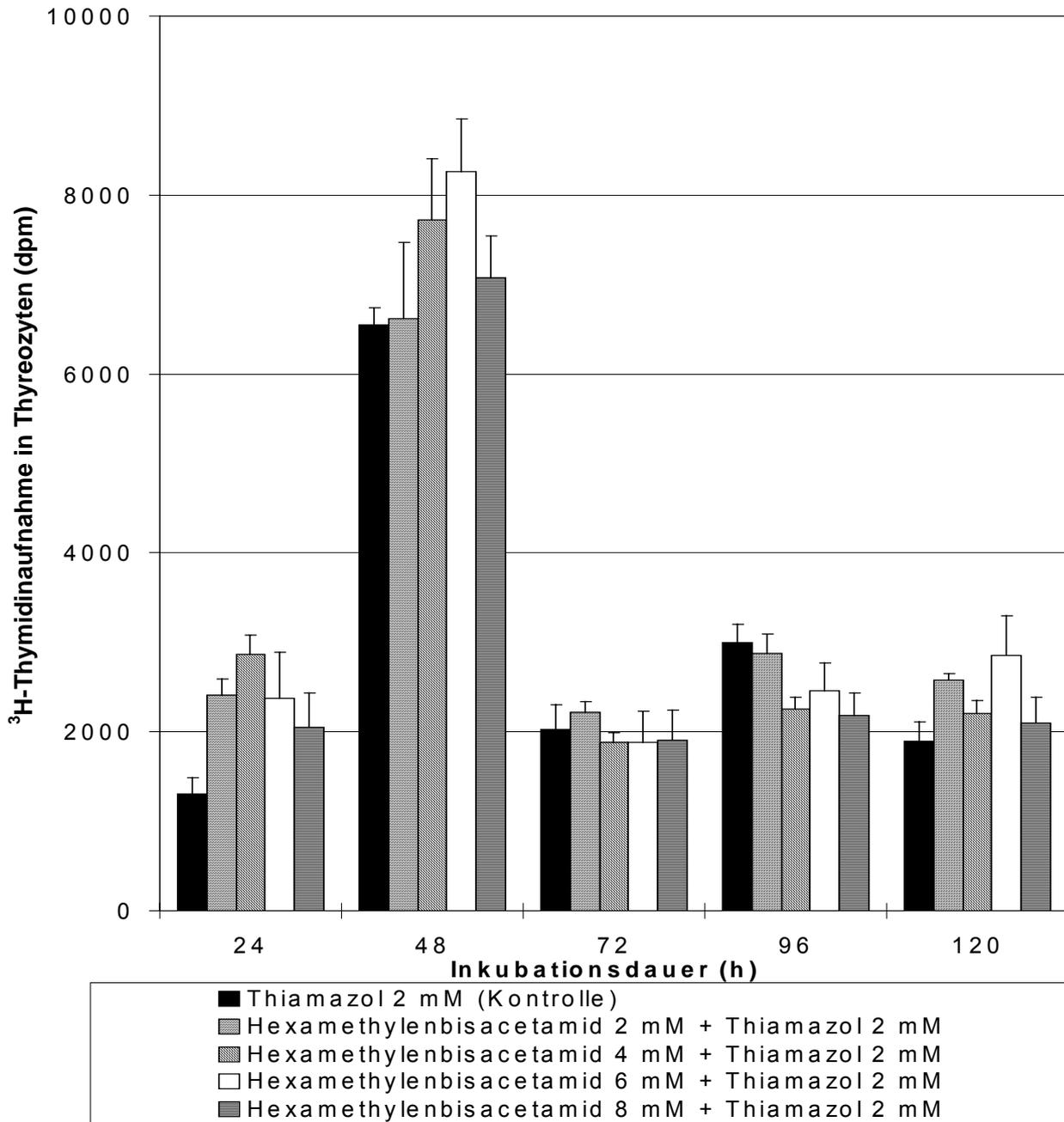


Abb.23 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 11 im Anhang)

Im nachfolgenden Ansatz wurden kultivierte Schweinethyreozyten mit 2 mM Thiamazol und 2; 4; 6 und 8 mM HMBA stimuliert. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in retinolfreiem NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die Stimulation der Thyreozytenkulturen mit HMBA erfolgte 16 Stunden nach Aussaat. Thiamazol (2 mM), ³H-Thymidin und 1,3 mU TSH / Kultur wurden jeweils 6 Stunden vor der Ernte hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA, jedoch mit 2 mM Thiamazol und TSH stimuliert wurden. Die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 30; 54; 78; 102 und 126 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich von Thyreozytenkulturen, die zwar mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch in retinolfreiem oder in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 24 und 25 dargestellt.

Wie sich aus Abb. 24 ergibt, hatten alle HMBA-Konzentrationen nach 30 Stunden Inkubationszeit gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Effekt auf die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten. Nach 54 Stunden erreichte die Aufnahme von Thymidin in Schweinethyreozyten unter 4 mM HMBA den höchsten Wert. Nach 78 Stunden Inkubation liess sich eine konzentrationsabhängige Zunahme in der ³H-Thymidinaufnahme erkennen, wobei die höchste Rate unter 6 mM HMBA erreicht wurde. Unter 8 mM HMBA setzte ein Abfall ein. Nach 102 Stunden waren keine signifikanten Unterschiede gegenüber der unstimulierten Kontrolle feststellbar, ebenso wenig nach 126 Stunden.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 25) zeigte sich nach 30 Stunden Inkubationszeit ein konzentrationsabhängiger Anstieg in der Thymidinaufnahme bei allen HMBA-Konzentrationen. Für 8 mM HMBA war der Unterschied zur

Kontrolle signifikant. Eine Zunahme in der ^3H -Thymidinaufnahme gegenüber der Kontrolle konnte auch nach 54 Stunden bei allen HMBA-Konzentrationen beobachtet werden. Unter 4 mM HMBA fiel diese am höchsten aus. Die Tendenz der von der HMBA-Konzentration abhängigen ^3H -Thymidinaufnahme konnte noch nach 78 Stunden Inkubationszeit beobachtet werden. Die Verhältnisse änderten sich nach 102 Stunden. Die Thymidinaufnahme erreichte dann ihren Tiefpunkt. Es liess sich dabei kein signifikanter Unterschied zu der nur mit Thiamazol stimulierten Kontrolle erkennen. Nach 126 Stunden lag die ^3H -Thymidinaufnahme unter 4; 6 und 8 mM HMBA nicht signifikant oberhalb der unstimulierten Kontrolle.

Aus Abbildungen 24 und 25 kann man erkennen, dass die Thymidinaufnahme bei den unstimulierten Thyreozyten in retinolhaltigem Medium nach 30; 54; 78 und 126 Stunden gegenüber jenen in retinolfreiem Medium signifikant auf die Hälfte zurückging. Ein ähnlicher Rückgang im Thymidin-Uptake der Thyreozyten, die in retinolhaltigem Medium kultiviert wurden, konnte unter 2 mM HMBA nach 30; 54; 78 und 126 Stunden nachgewiesen werden. Auch 4 mM HMBA reduzierte in retinolhaltigem Medium die ^3H -Thymidinaufnahme im Vergleich zur entsprechenden Kultur, die im retinolfreien Medium inkubiert wurde, nach 78 Stunden auf das 0,5fache und nach 126 Stunden auf das 0,4fache. Eine signifikante Abnahme in der Thymidinaufnahme gegenüber den Vergleichskulturen in retinolfreiem Medium zeigte sich bei den in retinolhaltigem Medium inkubierten Thyreozyten für die 6 mM HMBA-Konzentration nach 78 Stunden und für die 8 mM HMBA-Konzentration nach 54 Stunden.

Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Thymidinaufnahme in retinolhaltigem Medium (Abb. 25a im Anhang), so zeigt das Wirkprofil eine von der HMBA-Konzentration abhängige Zunahme des Thymidin-Uptakes in die Thyreozyten. Die höchste Thymidinaufnahmerate konnte für 6 mM und 8 mM HMBA (beide 148% der unstimulierten Kontrolle) beobachtet werden.

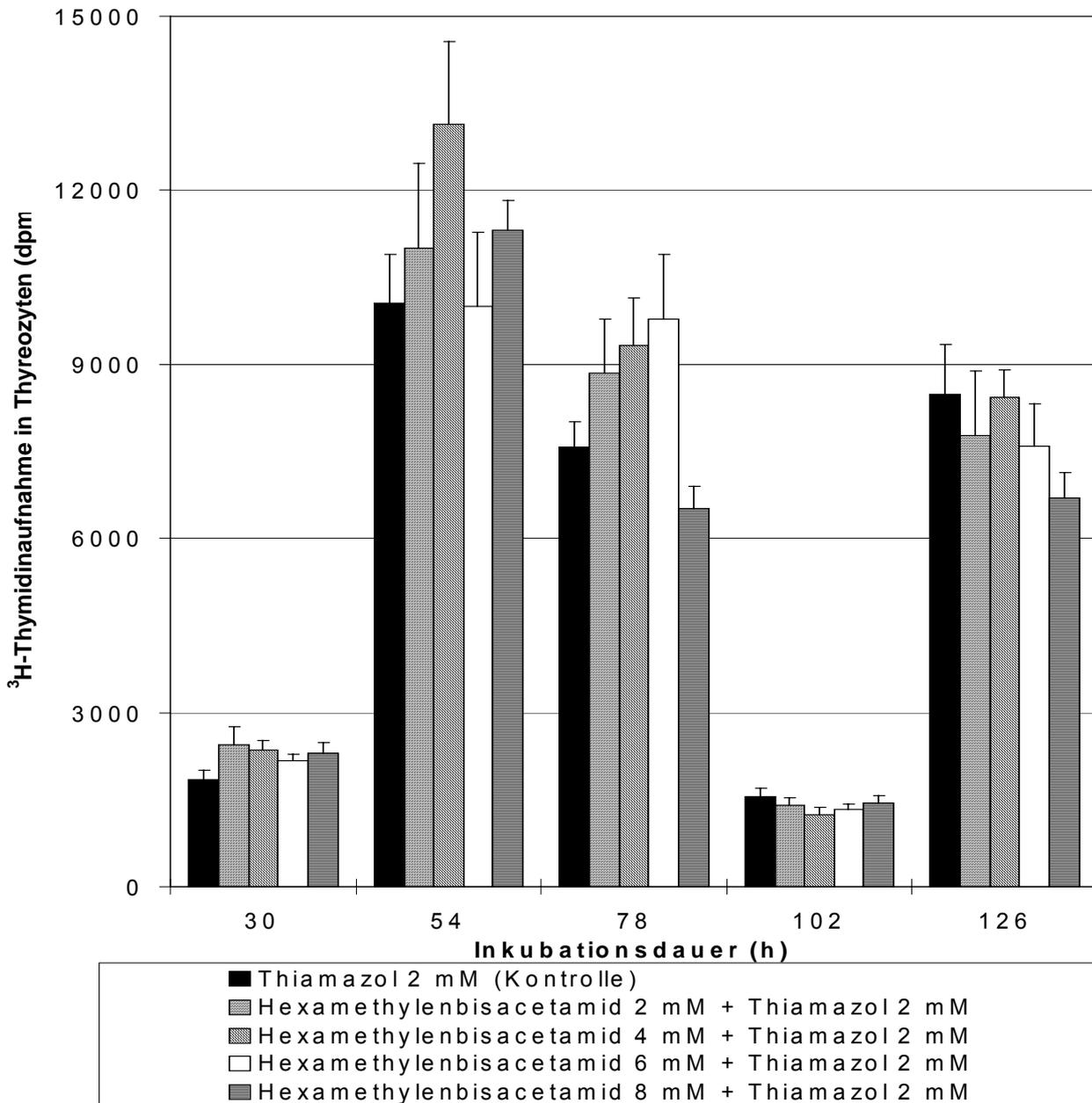


Abb.24. Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 12 im Anhang)

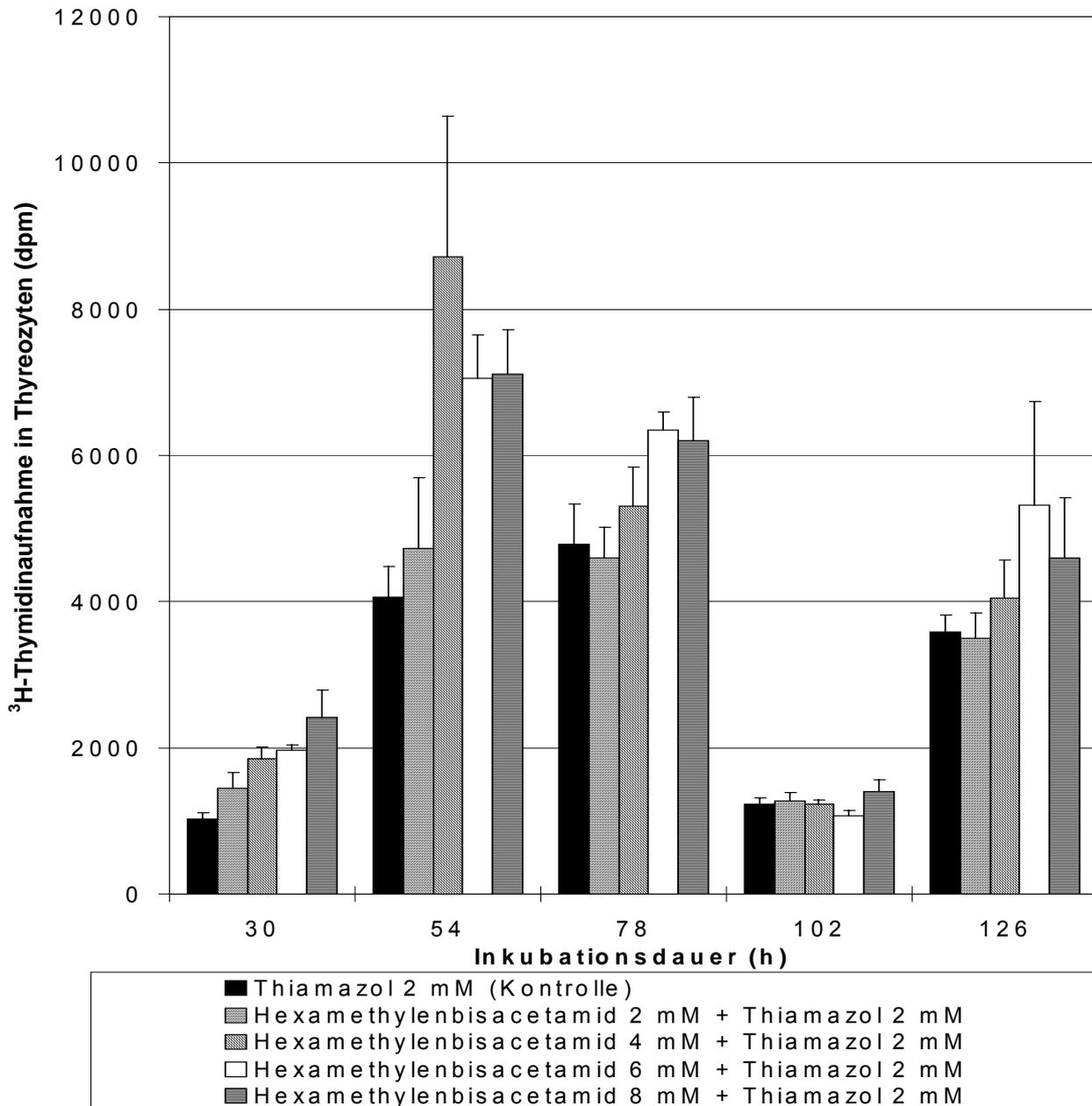


Abb.25 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Thiamazol (2 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit Thiamazol, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 12 im Anhang)

3.2.3 ^3H -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von Perchlorat und unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 1 mM Perchlorat und 2; 4; 6 und 8 mM HMBA behandelt. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in retinolfreiem NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in NCTC-135 Medium mit 0,6 μM Retinol. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen 16h nach Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nur mit 1 mM Perchlorat behandelt wurden. Die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 24; 48; 72; 96 und 120 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Thyreozytenkulturen, die zwar mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch entweder in retinolfreiem oder in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 26 und 27 dargestellt.

Für Abb. 26 ergibt die Statistik, dass bei allen verwendeten HMBA-Konzentrationen nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle gemessen werden konnte. Es zeigte sich lediglich ein tendenzieller Rückgang in der Thymidinaufnahme bei allen HMBA-Konzentrationen. Nach 48 Stunden änderten sich die Verhältnisse, so dass die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten durch HMBA-Zugabe gegenüber der nur mit Perchlorat stimulierten Kontrolle gesteigert werden konnte. Der Unterschied in der Thymidinaufnahme war für 6 mM HMBA signifikant und betrug das 1,7fache der unstimulierten Kontrolle. Nach 72 Stunden Inkubation erreichte die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten ihr Minimum und unterschied sich nicht im Uptake von der Kontrolle. Im weiteren Verlauf zeigte sich nach 96 Stunden ein konzentrationsabhängiger Rückgang in der ^3H -Thymidinaufnahme, der

unter 8 mM HMBA signifikant von der Kontrolle verschieden war. Nach 120 Stunden konnte man einen Rückgang bei den mit HMBA stimulierten Schweinethyreozyten beobachten, der jedoch von der Kontrolle nicht signifikant verschieden war. Das Maximum der Thymidinaufnahme in den nur mit Perchlorat stimulierten Schweinethyreozyten wurden nach einer Stimulationszeit von 96 Stunden gemessen.

Thyreozyten, die in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden (Abb. 27), zeigten unter 8 mM HMBA nach 24 Stunden Inkubation einen Rückgang in der Thymidinaufnahme, der jedoch von der Kontrolle nicht signifikant verschieden war. Nach 48 Stunden konnte dagegen eine von der Kontrolle nicht signifikant verschiedene in der Tendenz von der HMBA-Konzentration abhängige Zunahme im Thymidin-Uptake beobachtet werden. Zugleich wurde das Maximum der Thymidinaufnahme zu diesem Zeitpunkt erreicht. Zu den späteren Zeitpunkten liess sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der nur mit Perchlorat stimulierten Kontrolle erkennen.

Betrachtet man die beiden Abb. 26 und 27 unter dem Aspekt des Vitamin A Gehalts des Mediums, so beobachtet man für die unstimulierte Kontrolle in retinolhaltigem Medium gegenüber der Kontrolle in retinolfreiem Medium einen signifikanten Rückgang in der Thymidinaufnahme nach 24 und 96 Stunden. Zum Zeitpunkt 24 Stunden beträgt dieser das 0,6fache und zum Zeitpunkt 96 Stunden das 0,5fache des Vergleichswerts, der sich durch die Kultur in retinolfreiem Medium ergibt. Ein signifikanter Rückgang in der Thymidinaufnahme in die in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultivierten Zellen war nach 96 Stunden auch unter 2 mM HMBA zu beobachten. HMBA in einer Konzentration von 4 mM führte nach 24; 48 und 96 Stunden bei den in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultivierten Thyreozyten zur einer signifikanten Abnahme im ^3H -Thymidin-Uptake, verglichen mit den entsprechenden Kulturen in retinolfreiem Medium. Unter noch höheren HMBA-Konzentrationen war der Rückgang in der Thymidinaufnahme bei den in retinolhaltigem Medium kultivierten Zellen weniger häufig signifikant verschieden von den entsprechenden Kulturen in retinolfreiem Medium.

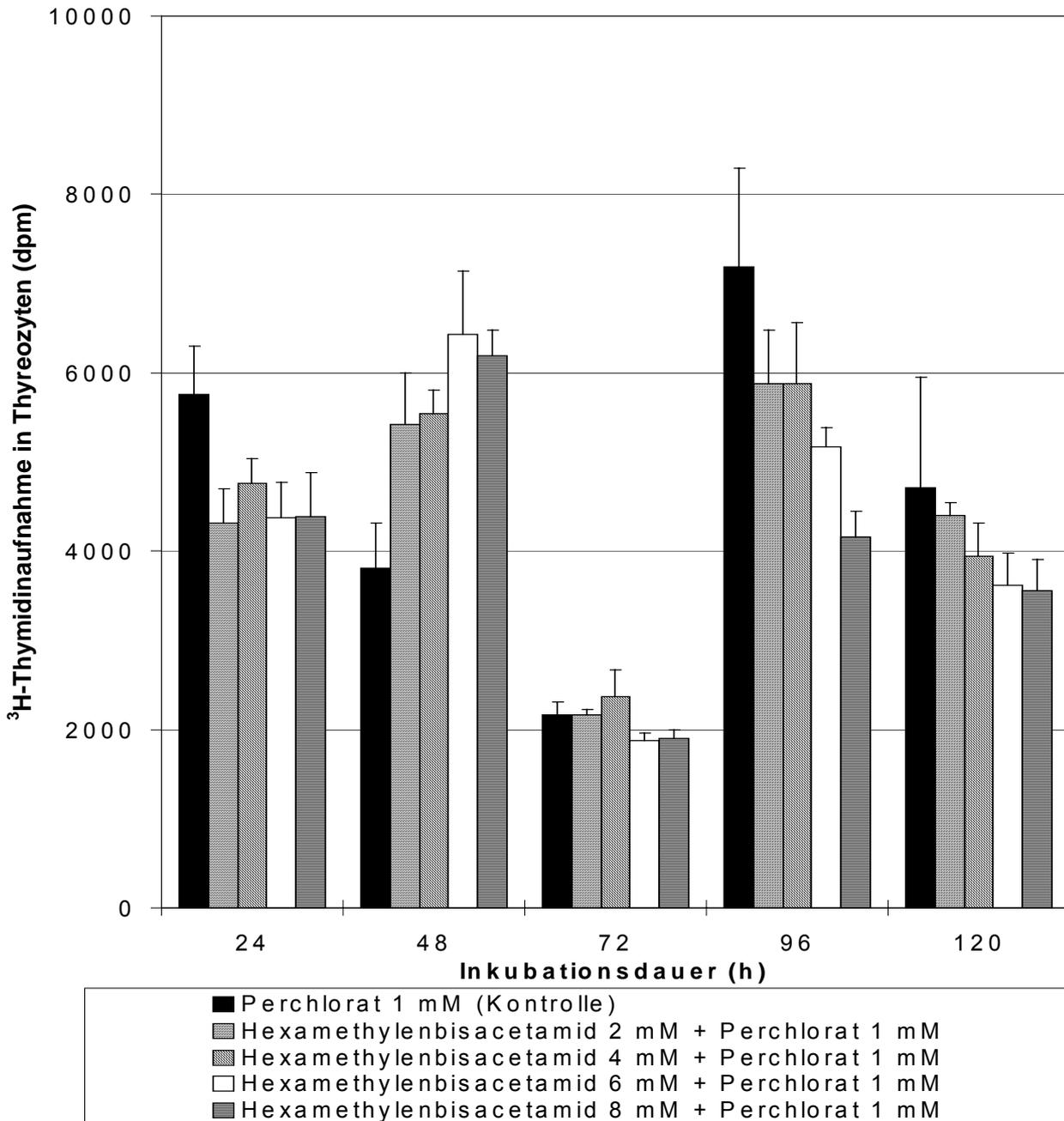


Abb.26 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 13 im Anhang)

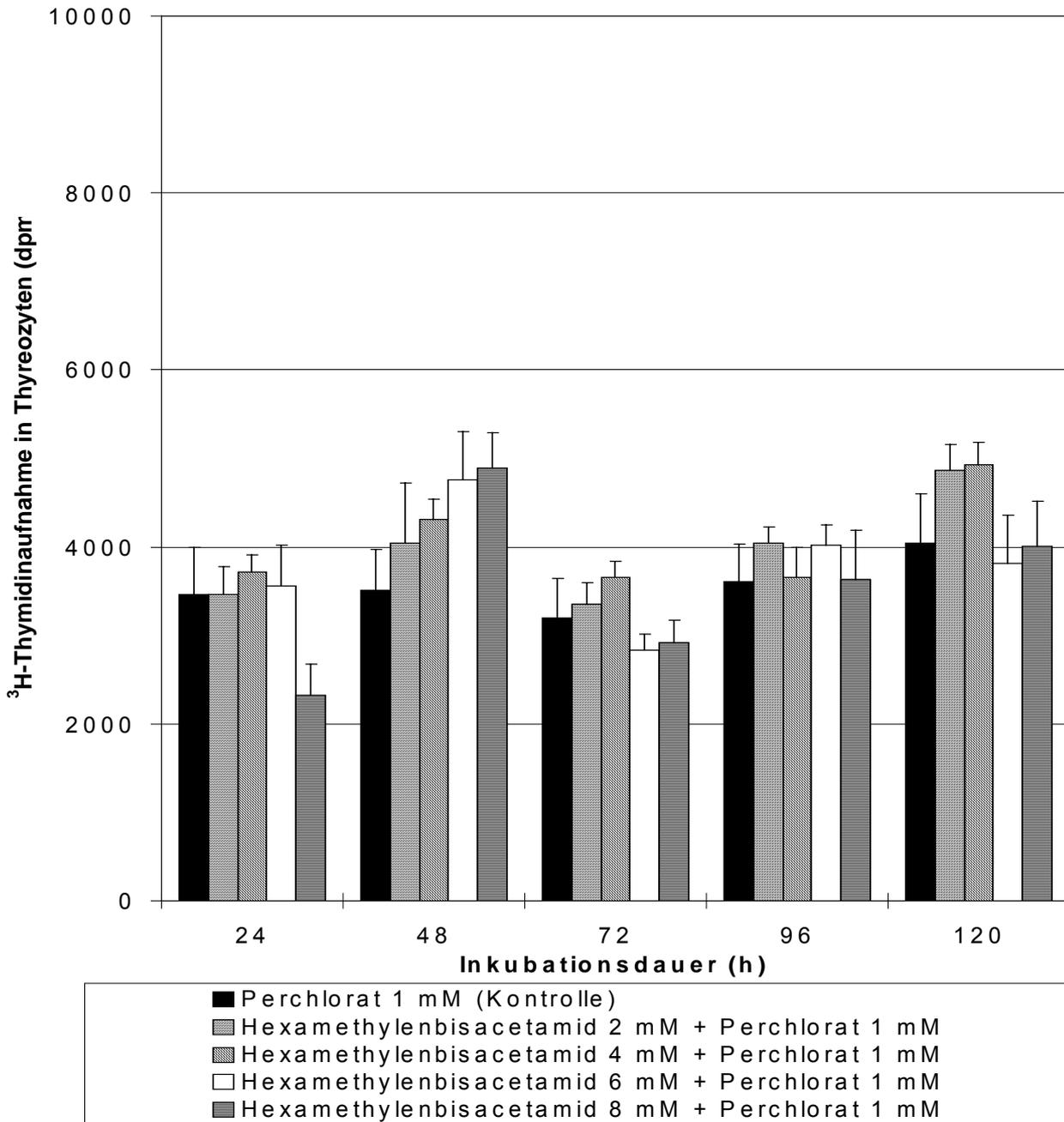


Abb.27 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid, Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin 16h nach Aussaat. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 24h, 48h, 72h, 96h und 120h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 13 im Anhang)

In einem weiteren Versuch wurden kultivierte Schweinethyreozyten mit 1 mM Perchlorat und 2; 4; 6 und 8 mM HMBA behandelt. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte entweder in retinolfreiem NCTC-135 Medium oder in NCTC-135 Medium mit 0,6 μ M Retinol. Die Stimulation der Thyreozytenkulturen mit HMBA erfolgte 16 Stunden nach Aussaat. Perchlorat (1 mM), 3 H-Thymidin und 1,3 mU TSH / Kultur wurden jeweils 6 Stunden vor der Ernte hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht mit HMBA, jedoch mit 1 mM Perchlorat behandelt wurden. Die 3 H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 30; 54; 78; 102 und 126 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden HMBA-Konzentrationen stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich von Thyreozytenkulturen, die zwar mit gleichen HMBA-Konzentrationen stimuliert, jedoch in retinolfreiem NCTC-135 Medium oder in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 28 und 29 dargestellt.

Wie man in Abb. 28 erkennen kann, hatten alle HMBA-Konzentrationen nach 30 Stunden Inkubation gegenüber der Kontrolle einen signifikant hemmenden Effekt auf die 3 H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten zur Folge. Dieser hemmende Einfluss fiel unter 8 mM HMBA am stärksten aus und betrug die Hälfte der nur mit Perchlorat behandelten Kontrolle. Nach 54 Stunden waren keine signifikanten Unterschiede in der Thymidinaufnahme zwischen Kontrollthyreozyten und mit HMBA stimulierten Thyreozyten nachweisbar. Zu diesem Zeitpunkt wurde bei allen Kulturen das Maximum im Thymidin-Uptake erreicht. Mit zunehmender Inkubationsdauer sank die Thymidinaufnahme allmählich ab und erreichte ihr Minimum nach 102 Stunden Inkubationszeit, um anschliessend wieder leicht anzusteigen. Zum Zeitpunkt 126 Stunden konnte unter allen HMBA-Konzentrationen kein signifikanter Unterschied in der 3 H-

Thymidinaufnahme der Thyreozyten gegenüber der Kontrolle beobachtet werden.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 29) zeigte sich nach 30 Stunden Inkubationszeit ein konzentrationsabhängiger Rückgang in der Thymidinaufnahme bei allen HMBA-Konzentrationen. Unter 6 und 8 mM HMBA war der Unterschied zur Kontrolle signifikant. Eine tendenzielle Zunahme in der ^3H -Thymidinaufnahme konnte nach 54 Stunden unter 6 und 8 mM HMBA beobachtet werden, wobei die Zunahme unter 6 mM HMBA am höchsten ausfiel. Zum Zeitpunkt 54 Stunden erreichten auch die Thyreozyten der Kontrolle ihr Maximum in der ^3H -Thymidinaufnahme. Nach 78 Stunden Inkubation konnten zwischen den verschiedenen HMBA-Konzentrationen keine Unterschiede in der Thymidinaufnahme festgestellt werden. Nach 102 Stunden erreichte der ^3H -Thymidin-Uptake sein Minimum. Im weiteren Verlauf kam es zu einer leichten konzentrationsabhängigen Zunahme des Thymidin-Uptakes. Diese war jedoch nicht signifikant von der Kontrolle verschieden.

Aus dem Vergleich der Abbildungen 28 und 29 kann man erkennen, dass die ^3H -Thymidinaufnahme in die unstimulierten Thyreozyten in retinolhaltigem Medium nach 54; 78; 102 und 126 Stunden verglichen mit den Thyreozyten, die in retinolfreiem Medium kultiviert wurden, signifikant auf die Hälfte zurückging. Ein ähnlicher Rückgang im Thymidin-Uptake der Thyreozyten, die in retinolhaltigem Medium kultiviert wurden, konnte für 2 mM HMBA zu den Zeitpunkten 54; 78 und 126 Stunden nachgewiesen werden. HMBA in der Konzentration von 4 mM reduzierte in retinolhaltigem Medium die ^3H -Thymidinaufnahme im Vergleich zur entsprechenden Kultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde, zu allen Zeitpunkten um fast die Hälfte. HMBA in 6 mM Konzentration reduzierte in retinolhaltigem NCTC-135 Medium die Thymidinaufnahme zu den Zeitpunkten 30; 54; 78 und 126 Stunden signifikant gegenüber der Vergleichskultur in retinolfreiem Medium. Unter 8 mM HMBA konnte ein entsprechender signifikanter Rückgang nur noch nach 78 Stunden nachgewiesen werden.

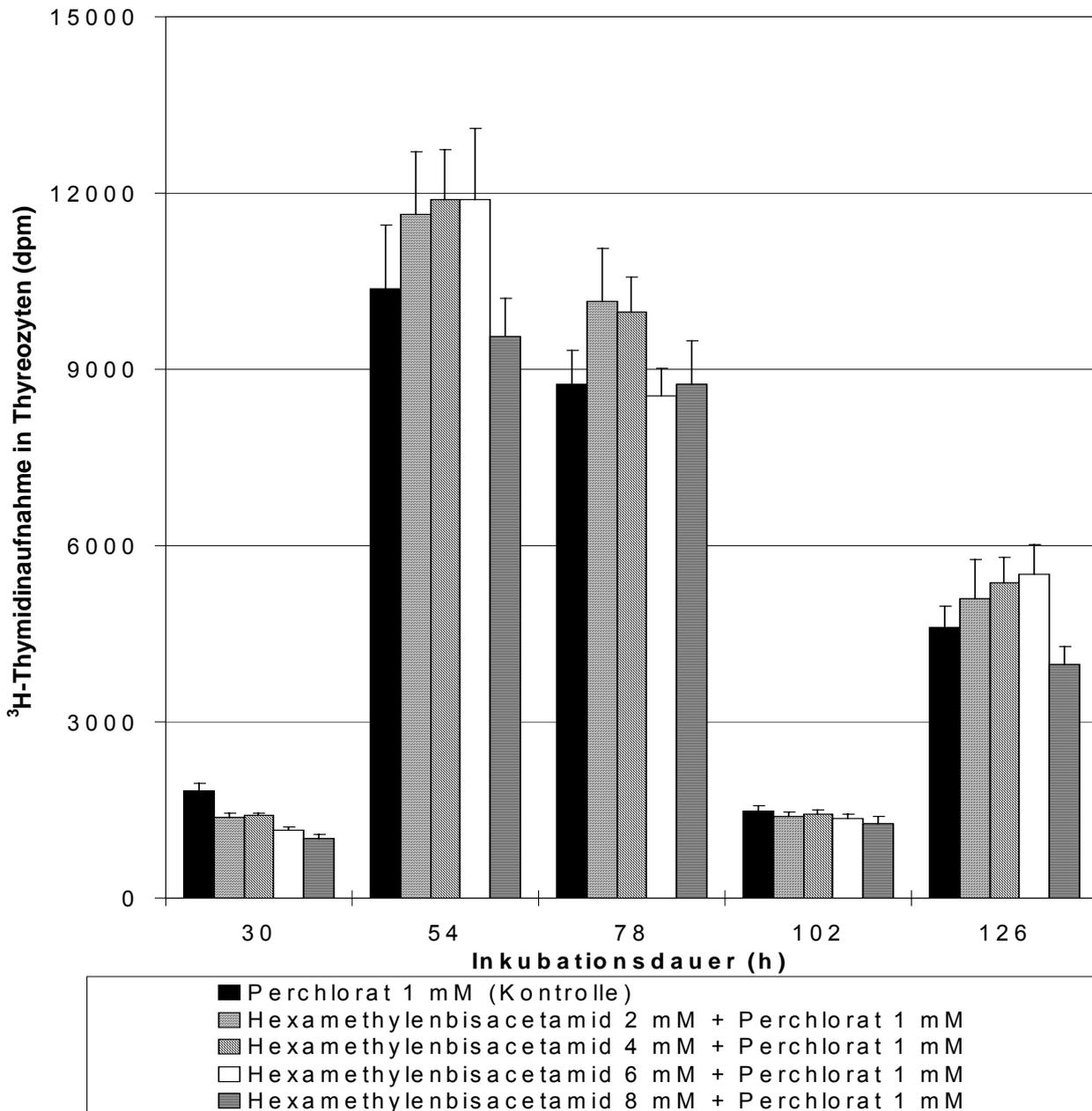


Abb.28 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 14 im Anhang)

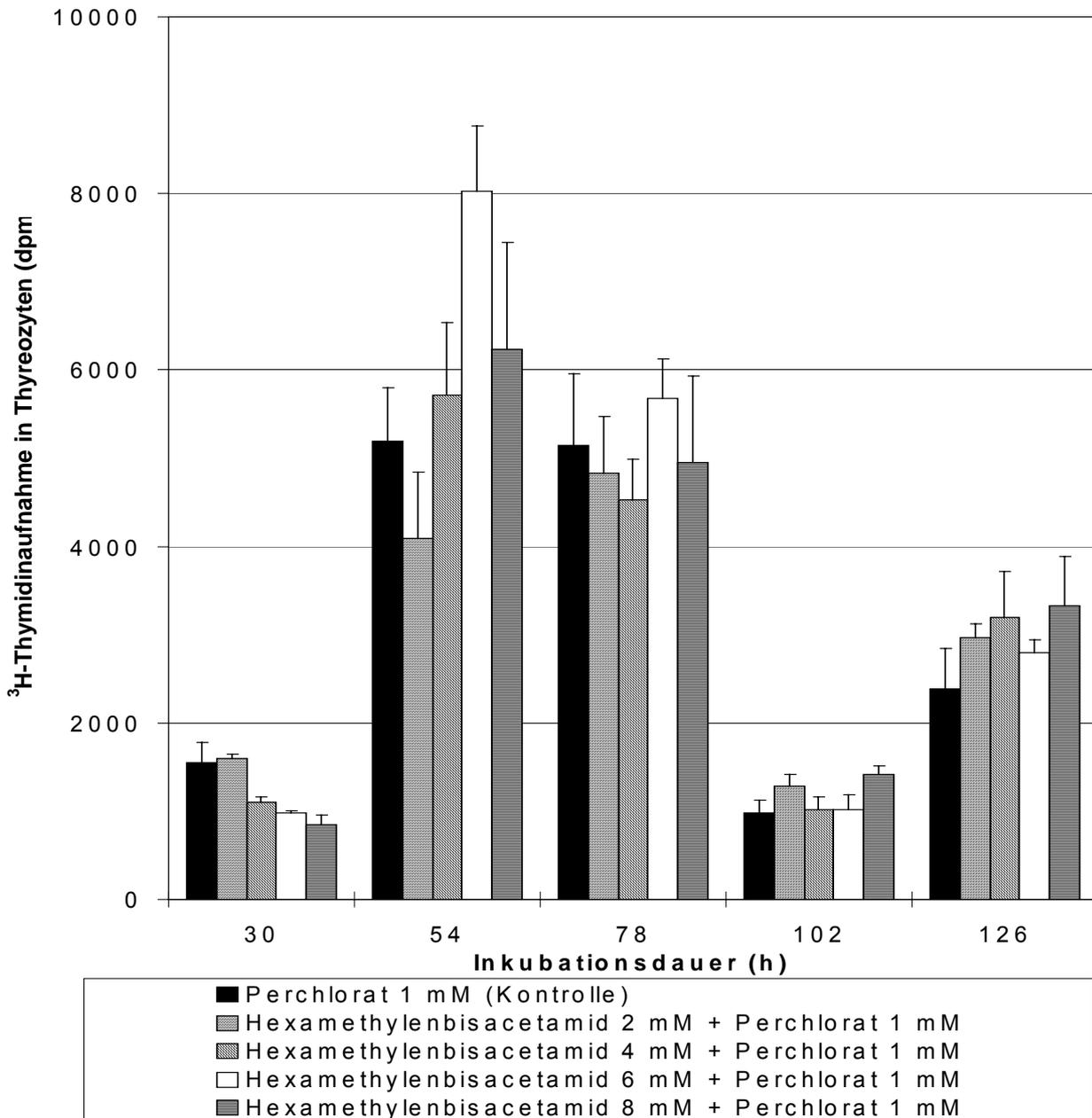


Abb.29 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid und Perchlorat (1 mM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen mit Hexamethylenbisacetamid 16h nach Aussaat. Stimulation mit Perchlorat, TSH (1,3 mU / Kultur) und ^3H -Thymidin jeweils 6h vor der Ernte. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 30h, 54h, 78h, 102h und 126h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 14 im Anhang)

3.2.4 ³H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von 2 mM HMBA und unterschiedlichen TSH-Konzentrationen

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 2 mM HMBA behandelt. Gleichzeitig erfolgte die Stimulierung mit unterschiedlichen TSH-Konzentrationen (0,01; 0,1; 0,5 und 1mU / Kultur). Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in retinolfreiem NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in einem NCTC-135 Medium mit 0,6 µM Retinol. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen bei der Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA stimuliert wurden. Die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 16; 40; 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit steigenden TSH-Konzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der Thyreozytenkulturen, die zwar mit gleichen TSH-Konzentrationen stimuliert, jedoch in retinolfreiem oder in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultiviert wurden.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 30 und 31 dargestellt.

Wie Abb. 30 zeigt, bewirkte 2 mM HMBA, verglichen mit der Kontrollgruppe, nach 16 Stunden Inkubation einen signifikanten hemmenden Einfluss auf die Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten. Dieser Effekt änderte sich anschliessend. Nach 40, 64 und 88 Stunden kam es zu einer verstärkten Aufnahme von ³H-Thymidin, die zum Zeitpunkt 88 Stunden von der Kontrolle signifikant verschieden war. TSH in der Konzentration 0,01 mU / Kultur führte nach 40 Stunden noch zu einer tendenziellen Verstärkung der ³H-Thymidinaufnahme, nach 64 Stunden jedoch zu einem signifikanten Rückgang im ³H-Thymidin-Uptake, der nur noch das 0,7fache des entsprechenden Wertes der unstimulierten Kontrollkultur betrug. Nach 16 und 40 Stunden Inkubation konnte unter einer TSH-Konzentration von 0,1 und 0,5 mU / Kultur ein zur

Kontrolle signifikanter Anstieg in der ^3H -Thymidinaufnahme beobachtet werden. Ein solcher war nach 64 und 88 Stunden Inkubation nicht mehr nachweisbar. Die TSH-Konzentration 1 mU / Kultur bewirkte nach 16 Stunden einen signifikanten Anstieg im Thymidin-Uptake gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Der Anstieg fiel jedoch geringer aus als unter der Stimulation mit 0,1 und 0,5 mU TSH / Kultur. Nach 64 Stunden lag die Thymidinaufnahmerate unter 1 mU TSH / Kultur signifikant unterhalb der Kontrollgruppe. Die Maxima der Thymidinaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten wurden nach einer Inkubationszeit von 64 Stunden gemessen. Zu dieser Zeit wurde auch die maximale ^3H -Thymidinaufnahmerate unter HMBA 6 mM + TSH 0,5 mU / Kultur erreicht.

Wie sich aus Abb. 31 (Kulturen in retinolhaltigem Medium) ergibt, hatten alle TSH-Konzentrationen nach 16 Stunden Inkubationszeit keinen signifikanten Einfluss auf die ^3H -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten. Nach 40 Stunden lies sich eine tendenzielle konzentrationsabhängige Zunahme in der Thymidinaufnahme erkennen, die unter 0,5 mU TSH / Kultur am höchsten war. Sowohl 2 mM HMBA allein als auch die zusätzliche Stimulation mit 0,1 mU TSH / Kultur bewirkten nach 64 Stunden eine signifikante Zunahme im Thymidin-Uptake, die unter 2 mM HMBA das 1,6fache und unter 2 mM HMBA + 0,1 mU TSH / Kultur das 1,4fache der unstimulierten Kontrolle erreichte. Nach 88 Stunden haben alle mit HMBA und TSH stimulierten Kulturen in der ^3H -Thymidinaufnahme das Niveau der unstimulierten Kontrolle erreicht. Die Maximalwerte der ^3H -Thymidinaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten wurden nach einer Stimulationszeit von 88 Stunden gemessen, während die Maximalwerte der ^3H -Thymidinaufnahme unter der Zusatzstimulation mit TSH in den Konzentrationen 0,01; 0,1 und 0,5 mU / Kultur schon nach 64 Stunden erreicht wurden.

Wird in den Abbildungen 30 und 31 der Vitamin A-Gehalt des Mediums berücksichtigt, so fällt auf, dass sich in retinolhaltigem NCTC-135 Medium zu nahezu allen Inkubationszeiten bei fast allen mit HMBA plus TSH stimulieren Kulturen einschliesslich der Kontrolle ein gegenüber den Kulturen in retinolfreiem Medium signifikant niedrigerer Thymidin-Uptake zeigte.

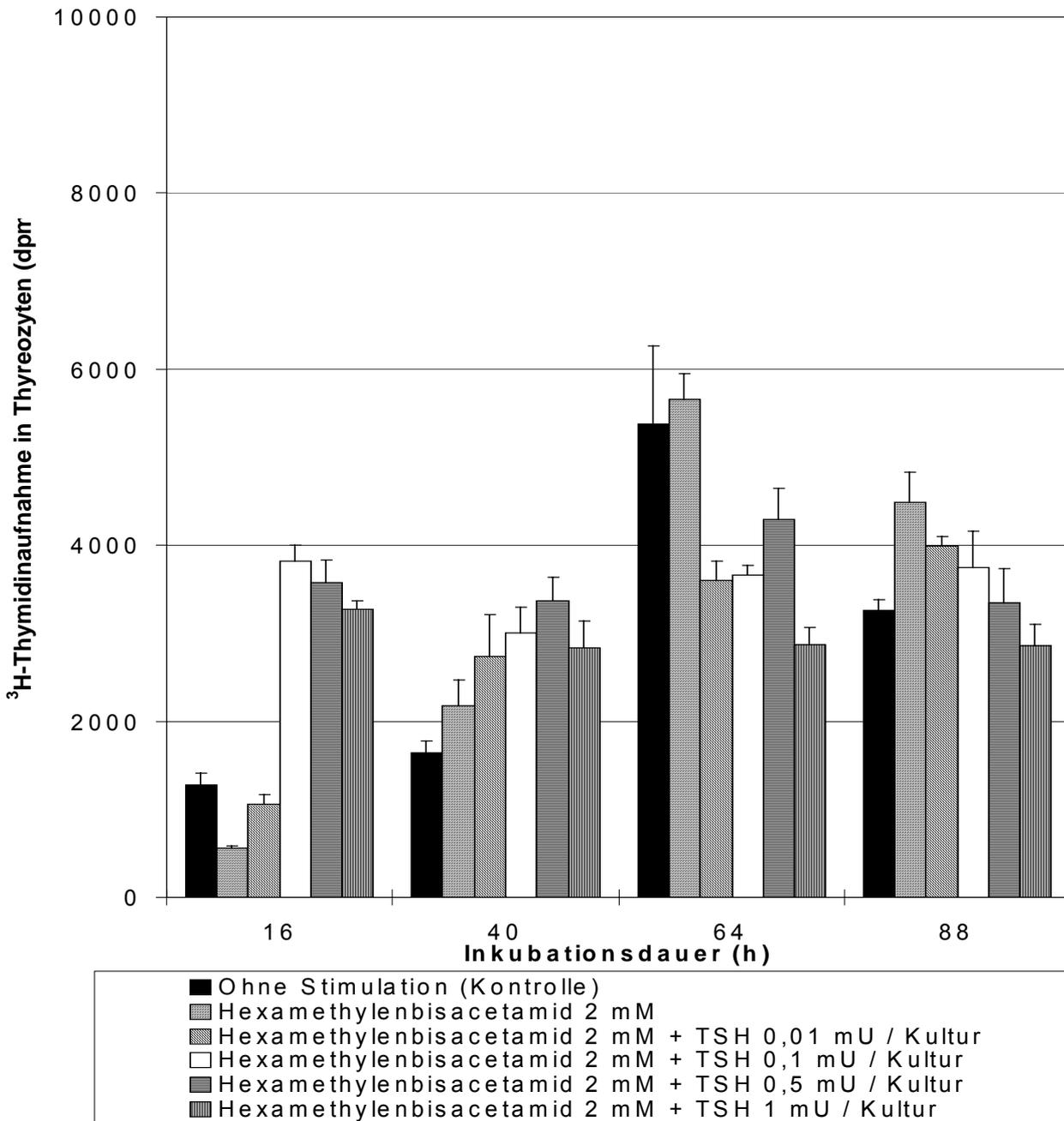


Abb.30 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (2 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulanzen zu den Thyreozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 15 im Anhang)

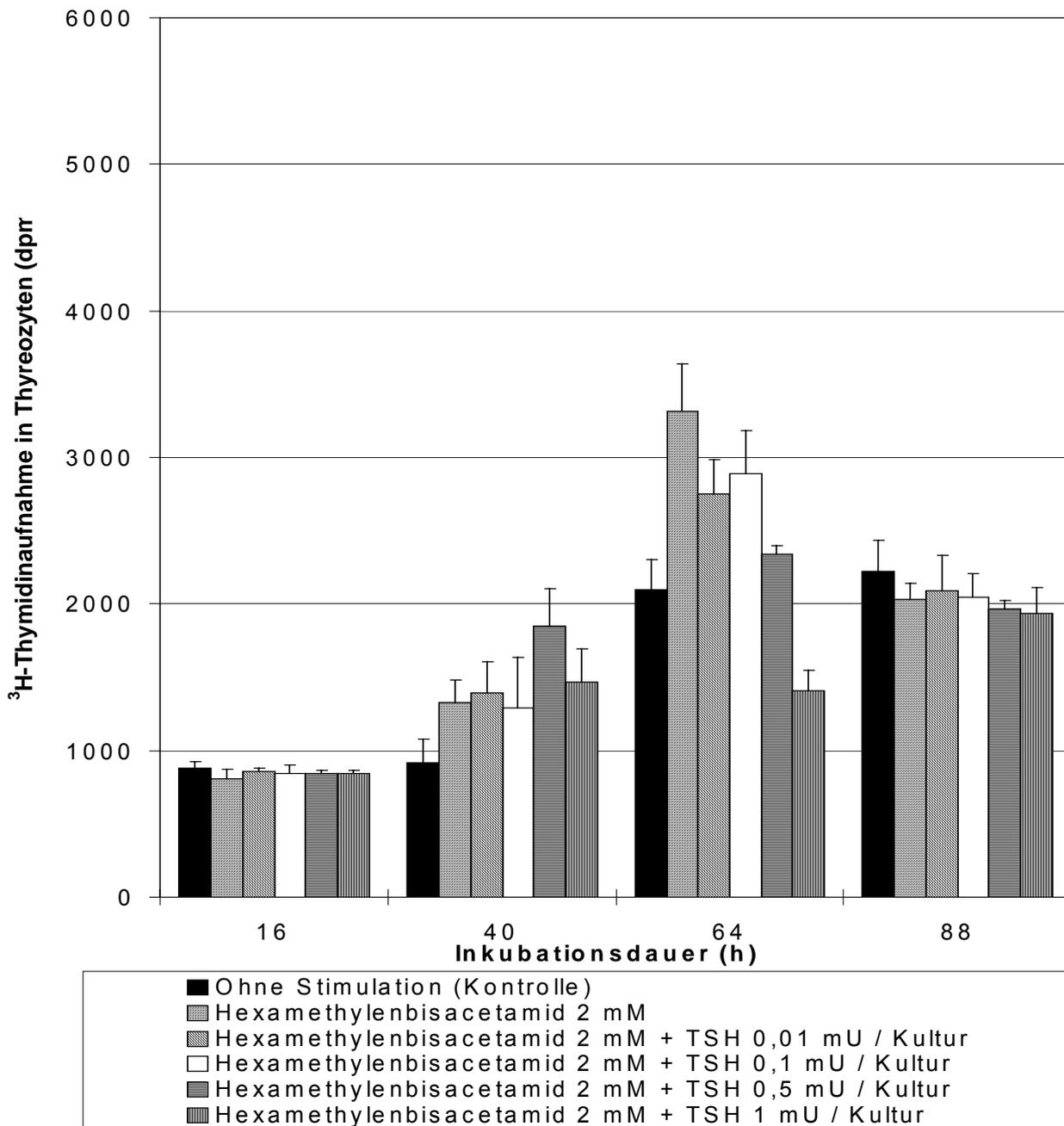


Abb.31 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (2 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Zugabe der Stimulanzen zu den Thyrozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 15 im Anhang)

3.2.5 ³H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten unter dem Einfluss von 6 mM HMBA und von unterschiedlichen TSH-Konzentrationen

In dem hier beschriebenen Ansatz werden kultivierte Schweinethyreozyten mit 6 mM HMBA stimuliert. Ansonsten entspricht der Ansatz exakt dem unter 3.2.4 beschriebenen.

Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, der Zeit und der Retinolkonzentration des Mediums sind in den Abbildungen 32 und 33 dargestellt.

Wie Abb. 32 zeigt, hatte 6 mM HMBA nach 16 und 40 Stunden Inkubation einen verstärkenden Einfluss auf die Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, die sich signifikant von der Thymidinaufnahme der Kontrollgruppe unterschied. Nach 64 Stunden sank die Thymidinaufnahme unter 6 mM HMBA unter das Niveau der Kontrollgruppe. Nach 88 Stunden konnte kein Unterschied in der ³H-Thymidinaufnahme zwischen den mit 6 mM HMBA stimulierten Kulturen und den unstimulierten Schweinethyreozyten festgestellt werden. TSH in der Konzentration 0,01 mU / Kultur verstärkte nach 16 Stunden die ³H-Thymidinaufnahme unter HMBA. Nach 16 Stunden war der Unterschied zur Kontrolle signifikant. Nach 40 Stunden Inkubation konnte unter 0,1 und 0,5 mU TSH / Kultur eine signifikante Zunahme im Thymidin-Uptake im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Nach 64 Stunden Stimulation liess sich bei allen mit HMBA und TSH stimulierten Schweinethyreozyten eine signifikante Abnahme in der Thymidinaufnahme beobachten. Unter 1 mU TSH / Kultur fiel die ³H-Thymidinaufnahme auf die Hälfte des Wertes der unstimulierten Kontrolle zurück. Nach 88 Stunden Inkubation war nur noch der ³H-Thymidin-Uptake unter 1 mU TSH / Kultur signifikant von jenem der Kontrolle verschieden. Die Maximalwerte der Thymidinaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten wurden nach einer Stimulationszeit von 64 Stunden gemessen, die Maximalwerte unter allen TSH-Konzentrationen hingegen schon nach 40 Stunden.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 33) zeigte sich nach 16 Stunden Inkubationszeit kein Unterschied in der ^3H -Thymidinaufnahme zwischen unstimulierten Thyreozyten und mit HMBA und TSH stimulierten Zellen. Nach 40 Stunden Inkubation erkennt man einen von der TSH-Konzentration abhängigen Anstieg im Thymidin-Uptake, wobei die höchste Aufnahmerate unter einer TSH-Konzentration von 1 mU / Kultur erzielt wurde. Nach 64 Stunden führte HMBA (6 mM) allein zu einem signifikanten Anstieg in der ^3H -Thymidinaufnahme. Dieser Anstieg erreichte das 1,5fache der unstimulierten Kontrolle an. Die HMBA-induzierte Thymidinaufnahme liess sich zu diesem Zeitpunkt nur noch durch eine zusätzliche Stimulation mit 0,1 mU TSH / Kultur steigern. Nach 88 Stunden war die Thymidinaufnahme bei allen mit HMBA und TSH stimulierten Kulturen gegenüber der unstimulierten Kontrolle signifikant erniedrigt. Die Maximalwerte der Thymidinaufnahme in die unstimulierten Schweinethyreozyten wurden in retinolhaltigem Medium nach einer Stimulationszeit von 16 Stunden gemessen.

Stellt man die Abb. 32 und 33 gegenüber und betrachten man sie unter dem Aspekt des Vitamin A-Gehalts des Mediums, so beobachtet man nach 16 Stunden Inkubation in retinolhaltigem Medium unter 0,01 mU TSH / Kultur einen signifikanten Rückgang in der Thymidinaufnahme gegenüber der in retinolfreiem Medium inkubierten Vergleichskultur. Nach 40 Stunden hatte der Vitamin A-Gehalt des NCTC-135 Mediums keinen signifikanten Einfluss mehr auf die ^3H -Thymidinaufnahme in mit TSH (0,01; 0,1 und 1 mU / Kultur) stimulierten Thyreozyten. Nach 64 Stunden Inkubation liess sich wieder ein signifikanter Rückgang in der Thymidinaufnahme bei den in retinolhaltigem Medium mit 6 mM HMBA und 0,5 mU TSH / Kultur behandelten Thyreozyten gegenüber der Vergleichskultur in retinolfreiem Medium nachweisen. Nach 88 Stunden war die ^3H -Thymidinaufnahme bei der in retinolhaltigem Medium kultivierten Kontrollgruppe um das 1,2fache höher als bei der Vergleichsgruppe in retinolfreiem Medium. Dieser Unterschied war statistisch signifikant.

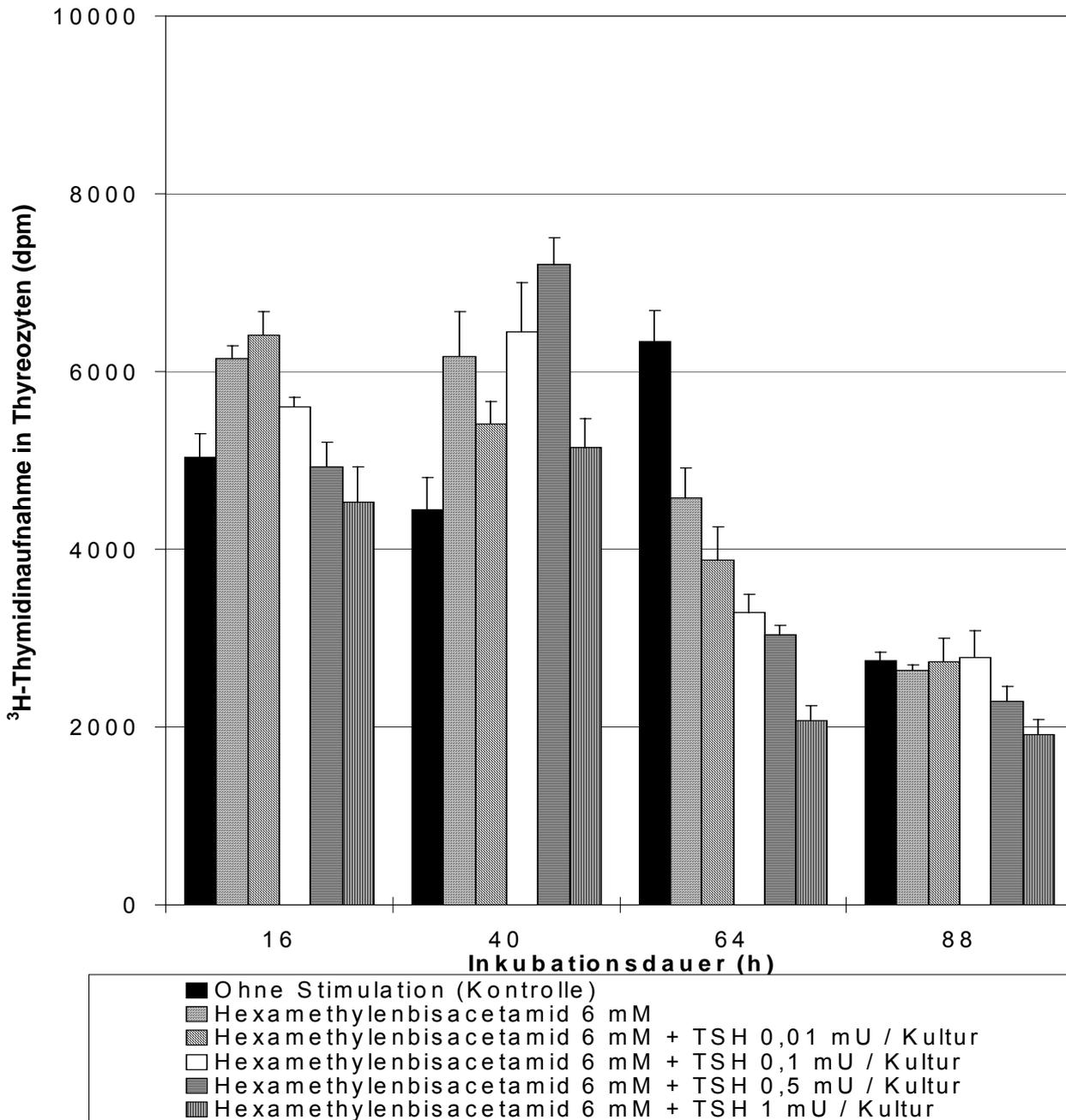


Abb.32 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (6 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulanzen zu den Thyreozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Retinolfreies Medium NCTC-135. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 16 im Anhang)

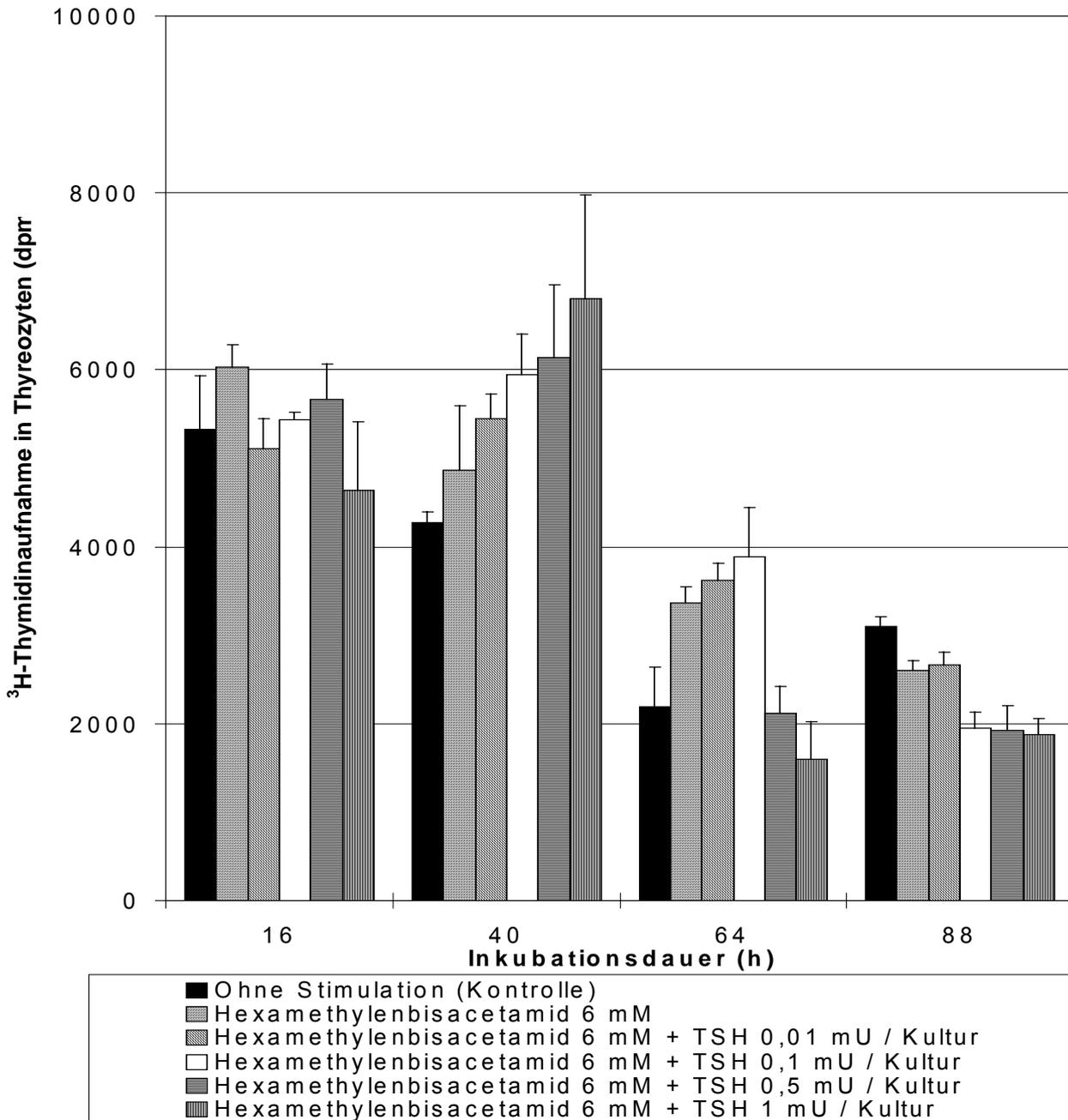


Abb.33 Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (6 mM) mit und ohne TSH-Zugabe (0,01; 0,1; 0,5 oder 1 mU / Kultur) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulanzen zu den Thyreozytenkulturen bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 16h, 40h, 64h und 88h Inkubationsdauer. Medium NCTC-135 mit 0,6 μM Retinol. Dargestellt sind Mittelwerte und SEM, n=4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12kBq ^3H -Thymidin. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 16 im Anhang)

3.3 Beeinflussung der Apoptose von Thyreozyten

Um die mögliche Induktion einer Apoptose in Thyreozyten durch HMBA aufzuklären, wurde HMBA in einer Konzentration von 2 und 6 mM verwendet. Zusätzlich fand eine Stimulation mit TSH (1mU / Kultur) statt. Die Kultivierung der Schweinethyreozyten erfolgte in retinolfreiem NCTC-135 Medium und im Vergleich dazu in NCTC-135 Medium mit 0,6 μ M Retinol. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen bei der Aussaat zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch HMBA stimuliert wurden. Die Apoptoserate wurde nach 24 und 144 Stunden Inkubation gemessen.

Wie Abb. 34 zeigt, bewirkte Staurosporin (2,5 μ M) bei den Kulturen in retinolfreiem NCTC-135 Medium die ausgeprägteste Apoptose. Nach 24 Stunden waren 35% und nach 144 Stunden 37% der Zellen apoptotisch. Die Behandlung mit TSH (1 mU / Kultur) reduzierte nach 24 und 144 Stunden die Apoptoserate bei den Schweinethyreozyten signifikant. Unter HMBA ist die Apoptoserate allenfalls nur minimal höher als unter der Kontrolle. Nach 24 Stunden Inkubation konnte die Apoptoserate unter der Stimulation mit 2 und 6 mM HMBA durch eine zusätzliche Stimulation mit TSH (1 mU / Kultur) nicht mehr reduziert werden. Nach 144 Stunden senkte 6 mM HMBA und 6 mM HMBA + TSH (1 mU / Kultur) die Apoptoserate auf 4% bzw. auf 3% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, die 8% apoptotische Zellen aufwies.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 35) wurde die höchste Apoptoserate ebenfalls unter Staurosporin (2,5 μ M) beobachtet. Unter dem Einfluss von TSH (1 mU / Kultur) zeigte sich dagegen ein leichter Anstieg der Apoptoserate gegenüber der Kontrolle, der aber zu keinem Zeitpunkt signifikant war. HMBA in der Konzentration 2 mM steigerte die Apoptoserate nach 24 Stunden auf 5% (3% apoptotische Zellen bei der Kontrolle) und nach 144 Stunden ebenfalls auf 5% (3% apoptotische Zellen bei der Kontrolle). Durch gleichzeitige Stimulation dieser Kulturen mit TSH (1 mU / Kultur) wurde die Apoptoserate allenfalls minimal gesteigert. Durch Erhöhung der HMBA-

Konzentration auf 6 mM wurde keine weitere Steigerung der Apoptoserate erzielt.

Aus Abb. 34 und 35 geht hervor, dass die unstimulierten Thyreozyten in retinolhaltigem Medium nach 24 und 144 Stunden eher eine geringere Apoptoserate aufwiesen als die Vergleichszellen in retinolfreiem Medium. Die Zugabe von TSH hat dabei keinen sicheren Einfluss. Unter der Stimulation mit HMBA (2 und 6 mM) und unter HMBA + TSH (1 mU / Kultur) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Apoptoserate, die auf den Vitamin A-Gehalt des Mediums zurückzuführen sind.

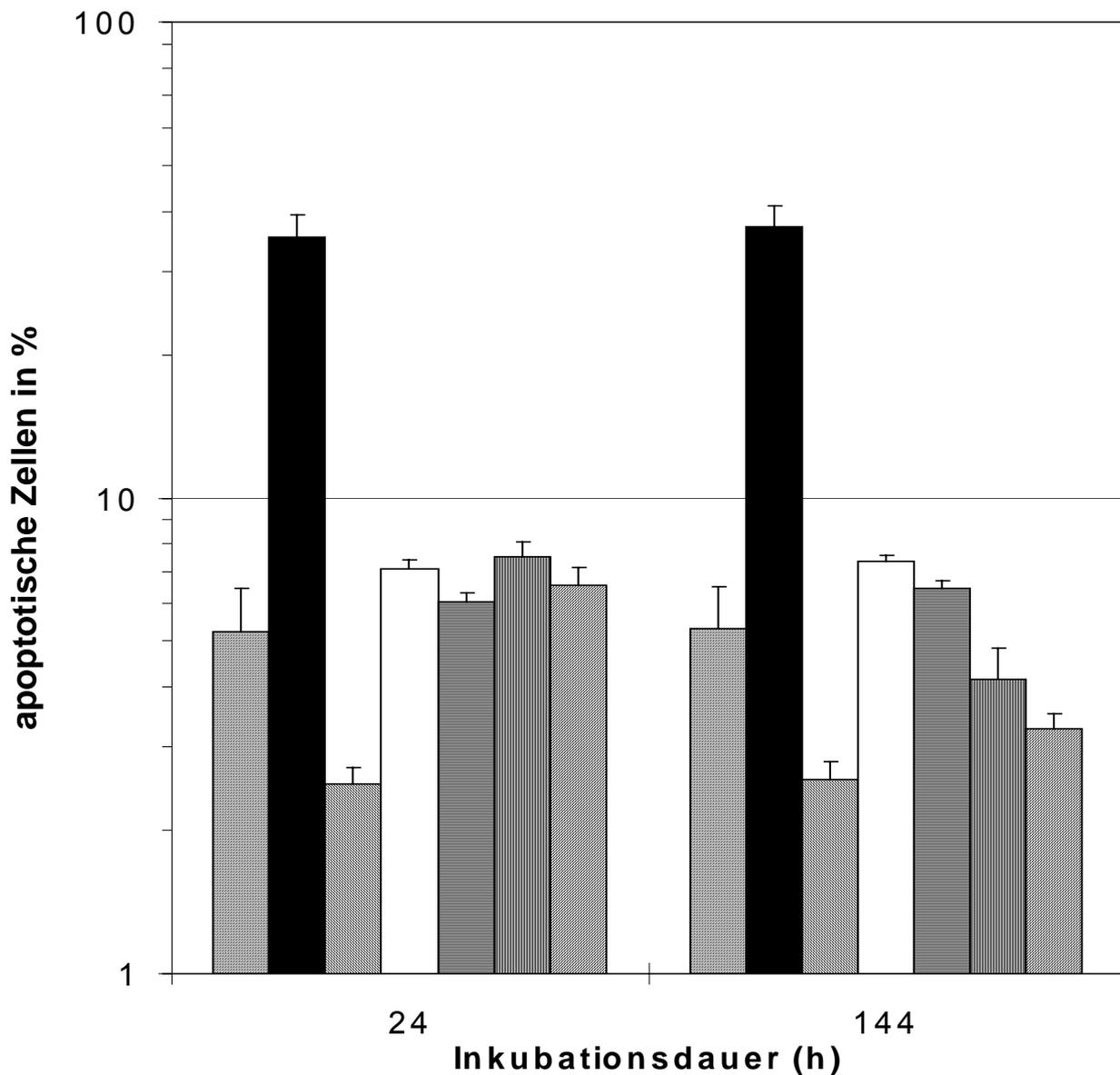


Abb.34 Apoptoserate in Thyreozyten unter dem Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (2 mM und 6 mM) mit und ohne TSH-Zusatz (1 mU / Kultur). Die Höhe der Balken entspricht der Anzahl apoptotischer Zellen in %, n=3. Retinolfreies Medium NCTC-135. Methode: Annexin-V-Test, Facsanalyse

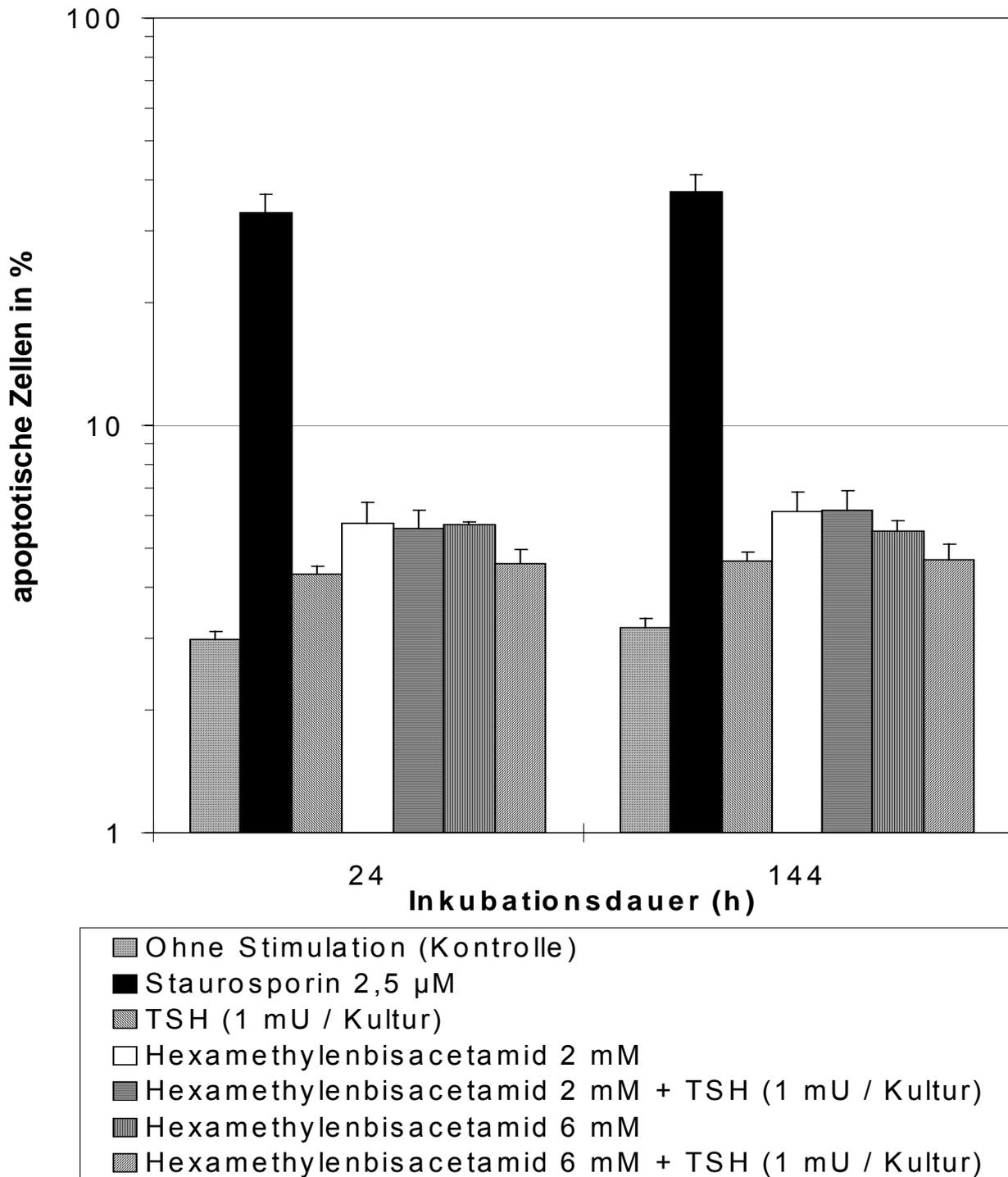


Abb.35 Apoptoserate in Thyreozyten unter dem Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (2 mM und 6 mM) mit und ohne TSH-Zusatz (1 mU / Kultur). Die Höhe der Balken entspricht der Anzahl apoptotischer Zellen in %, n=3. Medium NCTC-135 mit 0,6 µM Retinol. Methode: Annexin-V-Test, Facsanalyse

4. Diskussion

4.1 Methoden

Bei Untersuchungen an Zellen *in vitro* zeigte sich, dass Kultursysteme, die gleichzeitig *in-vivo*-Merkmale besitzen, besonders wertvoll sind. Unsere Primärkulturen von Schweineschilddrüsen haben gegenüber den meisten Zelllinien den Vorteil, dass sie noch alle *in-vivo*-Eigenschaften aufweisen. Auf der anderen Seite besitzen sie den Nachteil, dass für eine Untersuchungsreihe immer wieder neue Kulturen angelegt werden müssen. Die Kultivierung der Thyreozyten-Primärkulturen im NCTC-Medium und gleichzeitige Stimulation mit TSH innerhalb der ersten 24 Stunden ermöglicht eine Aggregation der Zellen zu dreidimensionalen follikelartigen Strukturen (Wahl, 1991). Dabei entstehen Follikel mit richtiger Polarität, denen jedoch eine Basalmembran fehlt. Fayet et al. beschrieben 1979 erstmals die Vorteile des NCTC-Mediums gegenüber den Medien HAM F 12 und RPM I bei Schweinethyreozyten-Primärkulturen. Lediglich im NCTC-Medium konnte unter Stimulation mit TSH eine Follikelbildung beobachtet werden. Eine andere Alternative zu unseren Thyreozytenkulturen ist die Kultivierung von isolierten Schilddrüsen-Follikeln (Gärtner et al., 1985). Während der Isolierung dieser Follikel durch Perfusion der Schilddrüse mit Kollagenase geht allerdings auch diesen Follikeln die Basalmembran verloren (Martin, 1994).

Bei unseren Primärkulturen bestand die Gefahr einer Kontamination, da das Gewebe für diese Kulturen direkt vom Schlachthof stammt. Antibiotika- und antimykotikahaltige Medien und eine sterile Arbeitsweise minimierten dieses Risiko. Ein weiteres Problem stellt die Kontamination der Thyreozytenkultur mit Mycoplasmen dar. Es besteht die Möglichkeit der Thymidinaufnahme in Mycoplasmen, und dadurch könnten die Messergebnisse der Thymidinaufnahme in Thyreozyten verfälscht werden. Diese Fehlermöglichkeit relativiert sich jedoch dadurch, dass die Mycoplasmen im Gegensatz zu Thyreozyten wegen ihres kleineren Durchmessers von ca. 0,8 µm durch die

Glasfiltermatten (Porengrösse 1,5 µm) des Zell-Harvesters nicht zurückgehalten werden.

Der Schilddrüsenstoffwechsel von Zuchttieren wie Schweinen und Rindern wird durch die Fütterung und die damit verbundene Iodzufuhr beeinflusst. Für unsere Versuchsschweine lässt sich nicht mehr zurückverfolgen, womit diese gemästet wurden. Bisweilen werden Schweine mit Manjok und Raps gemästet, was Strumen verursachen kann. Weitere Einflussgrössen sind Medikamente, die den Iodgehalt von Schilddrüsen verändern und sich damit dann auch auf die in Primärkulturen gehaltenen Schweinethyreozyten auswirken. Zur Diskussion steht in diesem Zusammenhang auch ein ständiger Wandel der Schweinerassen, da die Züchter durch Einkreuzen ihre Rasse optimieren wollen. Deshalb besteht die Möglichkeit, dass Ergebnisse innerhalb einer zeitlich ausgedehnten Untersuchungsreihe beeinträchtigt werden können (Martin, 1994).

Die oben beschriebenen Einflüsse auf den Iodgehalt von Schweineschilddrüsen können sich auch auf die in Primärkulturen gehaltenen Thyreozyten auswirken. Der Iodgehalt in Thyreozyten spielt unter in-vitro-Bedingungen bei der ³H-Thymidinaufnahme eine entscheidende Rolle (Heldin et al., 1985).

Bei den von uns durchgeführten Versuchen war es wichtig, primär retinoid-freies Medium zu benutzen, um den Retinolgehalt des NCTC-135 Mediums individuell steuern zu können. Eine Sonderanfertigung des NCTC-135 Mediums ohne Vitamin A stand uns für unsere Versuchsreihen zur Verfügung. Dies ermöglichte uns, Stoffwechseleffekte in primär retinoid-freien Kulturmedien zu messen und die Retinoid-Konzentration dann zu steigern. Handelsübliche Kulturmedien enthalten meist eine Konzentration von bis zu 10⁻⁶ M Vitamin A.

Die gemessenen ³H-Thymidinaufnahme lag bei unseren Versuchen bei einer relativ niedrigen Impulsrate, da das von uns verwendete NCTC-135 Medium im Gegensatz zu sonst üblichen Kulturmedien bereits kaltes Thymidin enthält. Dadurch wird das radioaktive Thymidin verdünnt.

4.2 ^{125}I -Iodidaufnahme in Thyreozyten, kultiviert in retinolfreiem oder retinolhaltigem Medium, unter dem Einfluss von HMBA, Thiamazol und Perchlorat in Abhängigkeit von TSH und Retinol

4.2.1 ^{125}I -Iodidaufnahme in Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen

Hexamethylenbisacetamid (HMBA) stellt einen Differenzierungsfaktor in murinen Erythroleukämiezellen (MELC) dar. Es steigert die Hämoglobinsynthese und verringert die Malignität dieser Zellen (Friend et al., 1971; Reuben et al., 1976). Fayet et al. beschrieben 1996 erstmalig, dass HMBA das Wachstum menschlicher Schilddrüsenzellen und Schweineschilddrüsenzellen induziert.

Bei der Auswertung der Radioiodaufnahme der in retinolfreiem NCTC-135 Medium kultivierten Thyreozyten konnte unter Stimulation mit 8 mM HMBA nach 24 und 120 Stunden Inkubation ein signifikanter Rückgang in der Radioiodaufnahme beobachtet werden (Abb. 2). Das Maximum der Radioiodaufnahme wurde in retinolfreiem NCTC-135 Medium nach 48 Stunden Inkubation erreicht.

In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 3) verhielten sich die mit HMBA stimulierten Thyreozyten gegenüber der unstimulierten Kontrolle ähnlich. Die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten war in retinolhaltigem Medium unter gleichen HMBA-Konzentrationen gegenüber den in retinolfreiem Medium kultivierten Vergleichskulturen signifikant erhöht. Das Maximum der Radioiodaufnahme wurde zu einem früheren Zeitpunkt, nämlich schon nach 24 Stunden, erreicht. Retinol begünstigt die Radioiodaufnahme. Fasst man die Radioiodaufnahmeraten der einzelnen während der Inkubationszeit betrachteten Ansätze zu entsprechenden Mittelwerten zusammen und normiert diese auf die Kontrolle (Abb. 2a und 3b im Anhang), so zeigt sich in retinolfreiem Medium unter 6 und 8 mM HMBA insgesamt ein Rückgang der

Radioiodaufnahme in die Thyreozyten auf 87 % bzw. 77% der Kontrolle. 4 mM HMBA führte in retinolhaltigem Medium zum leichten Anstieg der Radioiodaufnahme auf 117% der Kontrolle (Abb. 3a im Anhang). Ob es sich dabei um einen statistisch gesicherten Effekt handelt, müsste an einer grossen Zellreihe geprüft werden.

Werden die Zellen aus dem Gewebsverband abgelöst, kommt es während des Abbauprozesses mittels Dispase zu einer Irritation der Thyreozytenmembran. Durch die Enzymbehandlung kann der extrazelluläre Anteil der TSH-Rezeptoren dabei verloren gehen. Vitamin A, das in den meisten Kulturmedien enthalten ist, gilt als Differenzierungsfaktor im Zellstoffwechsel (Löffler et al., 1998). Das Fehlen dieses Differenzierungsfaktors in unserem Vitamin A-freien Medium könnte somit nach dem Abauvorgang auch die Regeneration des extrazellulären Anteils der TSH-Rezeptoren verzögern. Dies wäre zumindest eine Erklärung für das späte Erreichen des Maximums der ¹²⁵I-Iodidaufnahme bei den Thyreozyten, die in retinolfreiem Medium kultiviert wurden. Die für die TSH-Wirkung erforderlichen membranständigen TSH-Rezeptoren, die das cAMP-Signal weiterleiten, benötigen somit nach der Gewebsdesintegration in retinolfreiem Medium eine längere Regenerationsphase als in primär retinolhaltigem Medium.

Die Messung der globalen Radioiodaufnahme in die Thyreozyten ist nicht zwangsläufig mit der Hormonsynthese gleichzusetzen, da das proteingebundene und damit das in das Thyreoglobulin inkorporierte Iodid nicht gemessen wurde. Primäre Schilddrüsenzellkulturen vom Schwein sind im Gegensatz zu Zelllinien, wie z. B. den FRTL-5-Zellen, zur Hormonsynthese in der Lage (Wahl, 1991).

Unter der Vorbehandlung der Thyreozyten mit 2 bis 8 mM HMBA zeigte sich bei Stimulation mit TSH (1,3 mU / Kultur) jeweils 6 Stunden vor dem Erntezeitpunkt ein biphasischer Verlauf in der Radioiodaufnahme. Ein grosses erstes Maximum war nach 30 Stunden und ein kleineres zweites nach 78 Stunden zu erkennen. In retinolfreiem Medium trat das 2. Maximum deutlicher in Erscheinung als in retinolhaltigem (Abb. 4 und 5). In retinolhaltigem NCTC-135 Medium zeigte sich wiederum eine höhere globale Radioiodaufnahme als in

retinolfreiem Medium. Auch hier kommt somit wieder der die Iodaufnahme begünstigende Effekt des Retinols zum Vorschein. Bei einer 6 und 8 mM HMBA-Konzentration lagen die Radioiodaufnahmeraten in die in retinolhaltigem Medium kultivierten Thyreozyten nach 30 Stunden signifikant unterhalb der unstimulierten Kontrolle. Insgesamt konnte HMBA weder in retinolhaltigem noch in retinolfreiem Medium die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten gegenüber der Kontrolle signifikant steigern. Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte (Abb. 4a und 5a im Anhang), so zeigt sich in retinolfreiem Medium unter 8 mM HMBA insgesamt ein Rückgang der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten auf 87 % der Kontrolle. In retinolhaltigem Medium fiel der Rückgang der Radioiodaufnahme noch ausgeprägter aus. 6 mM HMBA führte zur einer Abnahme auf 74 % der Kontrolle. Unter 8 mM HMBA fiel der Rückgang der Radioiodinkorporation auf 69 % ab (Abb. 5a im Anhang).

Die Thyreozyten, die nur wenige Stunden mit TSH und Radioiod behandelt werden (Abb. 4 und 5), zeigen gegenüber jenen Kulturen, die bereits bei der Aussaat mit TSH und Radioiod stimuliert wurden, keinen grundsätzlichen Unterschied im Verlauf der Radioiodaufnahme, obwohl diese wesentlich länger stimuliert waren. Möglicherweise kann 6 und 8 mM HMBA den Ausstrom von Radioiod aus den Zellen verstärken, denn nach 30 Stunden Inkubation zeigte sich immerhin ein signifikanter negativer Unterschied zur Kontrolle. Es bleibt somit festzuhalten, dass HMBA die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten in keinem Fall verstärkt, eher sogar hemmt.

4.2.2 ^{125}I -Iodidaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von HMBA, Thiamazol und Perchlorat

Thiamazol (Favistan[®]) inhibiert die Synthese von Schilddrüsenhormonen, indem es mit der Schilddrüsenperoxidase (TPO), der Tyrosiniodinase und dem Kopplungsmechanismus von Iodtyrosyl-Resten interferiert (Thomas et al., 1986). Bei Hundeschilddrüsen lässt sich die intrazelluläre Iodorganifizierung

durch Thiamazol komplett blockieren (Rousset et al., 1980). Das in die Thyreozyten aufgenommene Radioiod dürfte daher nur den Vorgang der Iodination wiedergeben, während die Iodisation durch Thiamazol blockiert wird.

Die mit HMBA + Thiamazol behandelten Thyreozyten verhalten sich im Hinblick auf die Radioiodinkorporation zumindest in der frühen Inkubationsphase bis 24 Stunden anders, wenn sie in retinolhaltigem Medium inkubiert werden als wenn sie sich in retinolfreiem Medium befinden (Abb. 6 und 7). In retinolfreiem Medium nimmt zu diesem frühen Zeitpunkt die Radioiodaufnahme in Gegenwart von HMBA konzentrationsabhängig ab, in retinolhaltigem Medium dagegen zu. HMBA und Retinol müssen sich also in ihrer Wirkung auf den NIS in nicht näher bekannter Weise verstärken. Nach 48 Stunden Inkubation ist die globale Radioiodaufnahme in retinolfreiem Medium überraschenderweise höher als in retinolhaltigem Medium. Da sich die HMBA-freie, aber Thiamazol-haltige Kontrolle parallel zu den Versuchen mit HMBA verhält, ist es wenig wahrscheinlich, dass der Effekt durch HMBA bedingt ist, sondern eher durch Thiamazol. Die drastische Abnahme in der Iodspeicherung nach 72 Stunden ist damit zu erklären, dass das aufgenommene Iod unter dem Einfluss von Thiamazol nicht in Hormone eingebaut werden kann und dadurch auch nicht länger intensiv in Thyreozyten festgehalten werden kann. Ob der Vorgang der Apoptose hierbei eine Rolle spielt, muss dahingestellt bleiben. Thiamazol behindert die Iodidaufnahme nicht. Unter Thiamazol kann der 'second messenger' des TSH, nämlich cAMP sogar ansteigen (Pisarev et al., 1988). Die im Anhang in Abb. 6a (retinolfreies Medium) dargestellten und auf die Kontrolle normierten Mittelwerte machen die oben beschriebene von der HMBA-Konzentration abhängige Abnahme der Radioiodaufnahme bei Fehlen von Retinol im Medium deutlich. In retinolhaltigem Medium (Abb. 7a im Anhang) zeigt sich hingegen eine Zunahme des Radioiod-Uptakes unter 4 mM und 6 mM HMBA auf 128 % bzw. 118 % der Kontrolle. Diese Effekte unterscheiden sich von den unter 4.2.1 beschriebenen. Der Unterschied zwischen den Versuchen liegt nur im Fehlen oder Vorhandensein von Thiamazol. Der hier beschriebene Effekt ist somit wohl durch das Thiamazol bedingt.

Kann das TSH und Radioiod nur maximal 6 h auf die Zellen einwirken, so kommt die offensichtlich vom Zellzyklus abhängige und in Wellen verlaufende Radioiodaufnahme besonders deutlich zur Darstellung (Abb. 8 und 9). Generell zeigen in diesem Ansatz die Thyreozyten in retinolfreiem und retinolhaltigem Medium bei ihrer Radioiodaufnahme die gleiche Tendenz wie wenn das Radioiod sehr viel länger (seit der Aussaat der Zellen) einwirken kann. In retinolfreiem Medium dominiert unter HMBA –bezogen auf die Kontrolle anfangs die Abnahme der Radioiodspeicherung, in retinolhaltigem Medium die Zunahme der Radioiodspeicherung. Werden die Messwerte bei den einzelnen Inkubationszeitpunkten zusammengefasst, so zeigt das Wirkprofil des HMBA bei Normierung der Mittelwerte auf die Kontrolle (Abb. 8a und 9a in Anhang), dass sich die Radioiodaufnahme bei allen HMBA-Konzentrationen im Niveau der HMBA-freien Kontrolle bewegt. Es ist somit auch hier kein Anstieg der Radioiodaufnahme durch HMBA festzustellen.

Nach Fröhlich et al. (2004) kann eine niedrigere "physiologische" Konzentration des Retinols im Medium die Bindung von TSH an die Thyreozyten verstärken. Dies kann eine Erklärung sein, weshalb sich die Thyreozyten in retinolfreiem Medium von solchen in retinolhaltigem Medium insbesondere in der initialen Radioiodaufnahme unterscheiden.

Die Aufnahme des Perchlorat-Anions und des Iodid-Anions in die Zelle erfolgt normaler Weise kompetitiv. Dadurch dürfte der vom TSH abhängige NA^+/I^- -Symporter vermehrt Perchlorat, das bei den Perchlorat-Versuchen im Medium im Überschuss vorhanden ist, in die Zelle pumpen (Lawrence et al., 2001; Petrich et al., 2003). Die Folge dieser kompetitiven Hemmung zeigt sich in der niedrigeren globalen Radioiodaufnahme im Vergleich zu den Versuchen, bei denen Thiamazol eingesetzt wurde. In retinolfreiem Medium (Abb. 10) verstärkt HMBA die Perchloratwirkung nach 24 h, d.h. der Abfall der Radioiodaufnahme wird deutlicher. In retinolhaltigem Medium (Abb. 11) ist dieser Effekt nur partiell vorhanden. Nach 48 Stunden kommt es dann zum entgegengesetzten Effekt. In beiden Medien nimmt die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten mit steigender HMBA-Konzentration zu. Bei diesem vorübergehenden Umkehreffekt dürfte auch der phasenförmig verlaufende Zellzyklus eine Rolle spielen. Zu späteren

Zeiten dominiert in retinolfreiem Medium wieder eine von der HMBA-Konzentration abhängige additive Verstärkung der Wirkung von Perchlorat, also der Iodidausstrom. In retinolhaltigem Medium zeigt sich kein so klares Bild wie in retinolfreiem Medium. Die Betrachtung der normierten Mittelwerte (Abb. 10a im Anhang) zeigt in retinolfreiem Medium eine von der HMBA-Konzentration abhängige Abnahme der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten. Nach Amphoux-Fazekas et al. (1997) reduziert die gleichzeitige Stimulation der Thyreozyten mit TSH und HMBA die Iodidaufnahme und inhibiert die Organifizierung von Iodid vollständig. HMBA müsste demnach mit dem Thyreoperoxidase-System an der apikalen Zellmembran interferieren und auch mit dem TSH-Rezeptor-Natrium/Iodid-Symporter (NIS-) System an der basalen Membran. Retinol in "physiologischer" Konzentration kann andererseits die TSH-Bindung an die Thyreozyten begünstigen (Fröhlich et al., 2004). Dadurch könnte in retinolhaltigem Medium die Blockade der Iodidaufnahme zumindest partiell überwunden werden.

4.2.3 ^{125}I -Iodidaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von HMBA und in Abhängigkeit von TSH

HMBA alleine oder in Kombination mit Retinsäure induziert bei in vitro kultivierten humanen papillären Schilddrüsenkarzinomzellen eine Re-Differenzierung indem es die NIS-mRNA und die TSH-Rezeptor mRNA erhöht. Die Kombination beider Substanzen wirkt sich jedoch nicht additiv aus. Keine Wirkung zeigen beide Differenzierungsfaktoren in anaplastischen Malignomzellen (Amphoux-Fazekas et al., 1999).

Die Stimulation unserer nicht-transformierten Schweinethyreozyten nur mit 2 mM HMBA ohne gleichzeitige TSH-Zugabe bewirkte in retinolfreiem NCTC-135 Medium nach 16 und 40 Stunden Inkubation einen signifikanten Anstieg in der Radioiodaufnahme gegenüber der Kontrollkultur (Abb. 14). Diese Beobachtung lässt sich auch bei den auf die Kontrolle normierten Mittelwerten machen. So führte in retinolfreiem Medium 2 mM HMBA (Abb. 14a im Anhang)

im Vergleich zur Kontrolle zur einer Zunahme der Radioiodinkorporation auf 134%. HMBA ist also in der Lage den von Amphoux-Fazekas et al. 1997 beschriebenen TSH-Effekt auf die Thyreozyten in irgendeiner Form nachzuahmen. Durch Zugabe von niederen TSH-Dosen (0,01 mU / Kultur) konnte die Radioiodaufnahme zwar signifikant gegenüber der Kontrolle gesteigert werden, sie war jedoch nicht höher als unter HMBA (2 mM) alleine. Eine weitere Erhöhung der TSH-Konzentration erbrachte in Gegenwart von HMBA keine weitere Steigerung des Radioiod-Uptakes, sondern in der frühen Inkubationsphase sogar eine Abnahme. Bei der Inkubation der entsprechenden Kulturen in retinolhaltigem Medium (Abb. 15) zeigte sich die schon zuvor beschriebene Zunahme in der Radioiodaufnahme unter HMBA. Die niedrigste TSH-Dosis verstärkte initial sogar den HMBA-Effekt.

Bei der Erhöhung der HMBA-Konzentration auf 6 mM beobachteten wir den prinzipiell gleichen Effekt wie unter 2 mM HMBA. So führte die Stimulation der Thyreozyten mit 6 mM HMBA ohne gleichzeitige TSH-Stimulation nach 16 und 40 Stunden in retinolfreiem Medium (Abb. 16) zu einer signifikanten Zunahme der Radioiodaufnahme, die durch zusätzliche Simulation mit TSH in der niedrigsten Dosierung (0,01 mU / Kultur) weiter geringfügig gesteigert werden konnte. Die Effekte von 6 mM HMBA auf die Radioiodaufnahme nach 16 und 40 Stunden fallen deutlicher aus als unter 2 mM HMBA wie der Vergleich der Abb. 14/16 und 15/17 zeigt. Es zeigt sich somit eine gewisse Konzentrationsabhängigkeit.

Die Kultivierung der Thyreozyten in retinolhaltigem Medium (Abb. 17) bewirkte gegenüber dem Ansatz in retinolfreiem Medium (Abb. 16) generell eine leichte Zunahme der Radioiodaufnahme. In Vitamin A-haltigem Medium sind die Thyreozyten in der Lage, Radioiod besser und schneller aufzunehmen. Eine Erklärung ist die, dass Retinol in niederer Konzentration die TSH-Bindung an die Thyreozytenmembran verstärkt (Fröhlich et al., 2004). Retinol kann offensichtlich aber auch die von Amphoux-Fazekas et al. (1997) beschriebene Hemmwirkung von HMBA + TSH auf die Iodidaufnahme in gewissem Umfang wieder rückgängig machen.

4.3 ³H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten, kultiviert in retinolhaltigem und retinolfreiem NCTC-135 Medium, unter dem Einfluss von HMBA, Perchlorat und Thiamazol in Abhängigkeit von TSH und Retinol

4.3.1 ³H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen HMBA-Konzentrationen

In Schweinethyreozyten fördert HMBA das Wachstum und steigert die Sensitivität für TSH als Differenzierungsfaktor (Amphoux-Fazekas et al., 1997). HMBA gehört wie die Retinsäure zu den Differenzierungsfaktoren, die zur terminalen Differenzierung in murinen Erythroleukämiezellen führen (Reuben et al., 1976, 1978; Marks et al., 1984, 1989; Breslow et al., 1991). Eine ähnliche Wirkung des HMBA und der Retinsäure wurde bei papillären und anaplastischen Schilddrüsenmalignomzellen beobachtet (Amphoux-Fazekas et al., 1999).

Bei unseren Versuchen wurde die globale ³H-Thymidinaufnahme in nicht-transformierte Schweinethyreozyten gemessen. Die globale Thymidinaufnahme in die Schweinethyreozyten beweist allerdings noch keinen Einbau des Thymidins in die DNS. Damit ist diese für die Annahme eines Thyreozytenwachstums nicht spezifisch genug, denn das Thymidin könnte auch im Zytosol verweilen. Wahl (1991) konnte an vorausgegangenen Untersuchungen an Thyreozytenkulturen zeigen, dass die Thymidinaufnahme in Thyreozyten mit dem Einbau in die DNS parallel verläuft und somit als Wachstumsparameter betrachtet werden kann.

Bei unseren Ergebnissen zur ³H-Thymidinaufnahme ist zu berücksichtigen, dass NCTC-135 Medium bereits (kaltes) Thymidin enthält. Dieses verdünnt das Radiothymidin, so dass die Radiothymidin-Aufnahmen dadurch generell niedriger ausfallen als bei Untersuchungen, bei denen Thymidin-freies Kulturmedium verwendet wird.

Eigene Untersuchungen mit Retinol-freiem Kulturmedium zeigten (Abb. 18), dass die gleichzeitige Stimulation der Thyreozyten mit HMBA und 1,3 mU TSH /

Kultur nach 24 Stunden Inkubation gegenüber der unstimulierten Kontrolle einen hemmenden Einfluss auf die ^3H -Thymidinaufnahme besitzt. Dieser Effekt war nach 48 Stunden für 6 mM und 8 mM HMBA signifikant. Zu anderen Zeitpunkten konnte jedoch kein signifikanter Effekt des HMBA auf die Thymidinaufnahme nachgewiesen werden. Betrachtet man die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Thymidinaufnahme in retinolfreiem Medium (Abb. 18a im Anhang), so zeigt das Wirkprofil eine von der HMBA-Konzentration abhängige Abnahme des Thymidin-Uptakes in die Thyreozyten.

Bei den in retinolfreiem Medium kultivierten Thyreozyten war die globale Thymidinaufnahme höher als bei den in retinolhaltigem Medium kultivierten. In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 19) konnte nach 48 Stunden ein von der HMBA-Konzentration abhängiger Anstieg in der Thymidinaufnahme in die Thyreozyten gemessen werden. Auch die auf die Kontrolle normierten Mittelwerte der Thymidinaufnahme zeigen einen von der HMBA-Dosis abhängigen ansteigenden Verlauf. Retinol kann offensichtlich die HMBA-Wirkung auf die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten modifizieren.

4.3.2 ^3H -Thymidinaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von HMBA, Thiamazol und Perchlorat

Urabe beschreibt 1989 die Wirkung von Thiamazol an Kulturen von FRTL-5-Rattenthreozyten. Das Wachstum von Rattenthreozyten konnte durch TSH, cAMP und Forskolin gesteigert werden. Erfolgte eine zusätzliche Stimulierung der Kulturen mit Thiamazol (=Methiamazol), so zeigte sich bei den Thyreozyten eine von der Thiamazol-Konzentration abhängige Suppression der ^3H -Thymidinaufnahme. Der Autor vermutet, dass Thiamazol das Wachstum der Schilddrüsenzellen auf einem direkten Weg beeinflusst ohne am cAMP-System anzugreifen.

Eigene Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung der Thyreozyten mit Thiamazol (2 mM) und HMBA in retinolfreiem Medium (Abb. 22) zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der ^3H -Thymidinaufnahme

gegenüber der nur mit Thiamazol stimulierten Kontrollkultur ergab. Folglich hatte HMBA in Gegenwart von Thiamazol und fehlendem Retinol keinen Einfluss auf die Thymidinaufnahme in normale Schweinethyreozyten. Das Maximum der Aufnahme war bei allen Kulturen nach 48 Stunden Inkubation erreicht.

Erfolgte die Kultivierung und entsprechende Stimulierung der Thyreozyten in retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 23), so verhielten sich die Thyreozytenkulturen ähnlich wie jene in retinolfreiem Medium. Es waren während der gesamten Inkubationszeit keine signifikanten Unterschiede zu der nur mit 2 mM Thiamazol behandelten Kontrolle erkennbar. Das Maximum in der Thymidinaufnahme wurde ebenfalls nach 48 Stunden Inkubation beobachtet. Die globale Thymidinaufnahme war in Anwesenheit von Retinol, Thiamazol und HMBA allerdings signifikant niedriger als in den nur mit Thiamazol und HMBA stimulierten Vergleichskulturen.

Bei der Vorinkubation der Thyreozyten mit HMBA und einem nur 6 stündigen Einwirken von Thiamazol, TSH + ^3H -Thymidin auf die Zellen (Abb. 24 und 25) zeigte sich während der Inkubationsdauer sowohl in retinolfreiem als auch in retinolhaltigem Medium eine in Wellen verlaufende Thymidinaufnahme in die Thyreozyten mit einem ersten Höhepunkt nach 54 Stunden Inkubation und einem weiteren nach 126 Stunden Inkubation. In retinolfreiem Medium konnten keine signifikanten Unterschiede in der Thymidinaufnahme zwischen der mit 2 mM Thiamazol stimulierten Kontrolle und den mit Thiamazol + HMBA stimulierten Thyreozyten festgestellt werden. In retinolhaltigem Medium zeigte sich dagegen nach 30 Stunden Inkubation ein von der HMBA-Konzentration abhängiger Anstieg in der ^3H -Thymidinaufnahme. Auch nach der jeweiligen Normierung der Mittelwerte auf die Kontrolle (Abb. 25a im Anhang) ist ein Anstieg noch erkennbar. Retinol modifiziert hier die Wirkung von HMBA auf die Thymidinaufnahme in die Zelle positiv. In retinolfreiem Medium war die globale Thymidinaufnahme in die Zellen niedriger als in retinolhaltigem Medium.

Die Stimulation der Thyreozyten mit 1 mM Perchlorat und HMBA zeigt in retinolfreiem Medium (Abb. 26) ein biphasisches Verhalten: Nach 48 Stunden nehmen die mit HMBA + Perchlorat stimulierten Thyreozyten signifikant mehr

Thymidin auf als die nur mit Perchlorat stimulierten Kontroll-Thyreozyten. Nach 96 Stunden fällt die Thymidinaufnahme unter HMBA + Perchlorat dagegen unter die nur mit Perchlorat behandelten Kontroll-Thyreozyten ab. Dieser biphasische Verlauf der Thymidinaufnahme konnte bei Kulturen in retinolhaltigem Medium (Abb. 27) nicht so deutlich beobachtet werden. HMBA induziert somit ein ambivalentes Verhalten gegenüber der Thymidinaufnahme, je nach Zellzyklusphase. Die Thymidinaufnahme in die in retinolhaltigem Medium kultivierten Zellen unterschied sich signifikant von den Kulturen in retinolfreiem Medium. In retinolfreiem Medium war die Thymidin-Speicherung wiederum höher als in retinolhaltigem Medium. Betrachtet man die auf die Kontrolle bezogenen Mittelwerte aus der gesamten Inkubationszeit, so zeigt HMBA weder in retinolfreiem noch in retinolhaltigem Medium sichere Effekte. Eine Vorinkubation der Thyreozyten (Abb. 28 und 29) mit HMBA über 16 Stunden lieferte ähnliche Ergebnisse wie die unmittelbare Stimulation der Thyreozyten mit HMBA und Perchlorat bei der Aussaat (Abb. 26 und 27). Die Thymidinaufnahmeraten in die Thyreozyten waren unter dem Einfluss von Retinol signifikant niedriger als bei Thyreozyten in retinolfreiem Medium. HMBA führte in keiner Konzentration zu einem signifikanten Anstieg im ^3H -Thymidin-Uptake verglichen mit der nur mit Perchlorat (1 mM) stimulierten Kontrolle.

4.3.3 ^3H -Thymidinaufnahme in Thyreozyten in Abhängigkeit von HMBA und von TSH

Die Funktion von TSH als Wachstumsfaktor in vitro wird von zahlreichen Autoren kontrovers diskutiert. Nitsch et al. (1980), Wynford-Thomas et al. (1987) und Smith et al. (1987) berichteten über eine wachstumsstimulierende Wirkung des TSH bei Rattenthreozyten. Gleiche Beobachtungen bei Zellen der Rattenthreozyten-Linie FRTL-5 konnten von Tramontano et al. (1987) und Kennedy et al. (1988) gemacht werden. Beiden Autorengruppen gelang es, die ^3H -Thymidinaufnahme durch bTSH zu steigern. In Kontrast dazu stehen die Ergebnisse von Fayet et al. (1979) an kultivierten Schweinethreozyten,

wonach TSH keine wachstumsstimulierende Wirkung auf kultivierte Schweinethyreozyten hat. In-vitro-Untersuchungen von Eggo et al. (1984), Gärtner et al. (1985) und Watanabe et al. (1985) an isolierten Thyreozyten ergaben keinen wachstumsstimulierenden TSH-Effekt. Beobachtungen an kultivierten menschlichen Schilddrüsenzellen brachten ebenfalls unterschiedliche Ergebnisse hervor. So zeigten einige Untersucher (Goretzki et al., 1987; Roger et al., 1988), dass TSH einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation ausübt. Im Gegensatz dazu konnten Westermark et al. (1979) und Davies et al. (1985) entweder keinen oder sogar einen inhibitorischen TSH-Effekt auf die Zellproliferation beobachten. Ollis et al. (1986) beobachteten bei kultivierten menschlichen Schilddrüsenzellen unterhalb von 1 mU TSH / ml eine Stimulation des Schilddrüsenwachstums, bei darüber liegenden Konzentrationen eine inhibierende Wirkung. Beobachtungen von Kraiem et al. (1990) an kultivierten menschlichen Schilddrüsenzellen zeigen in den ersten drei Tagen nach Aussaat einen stimulierenden TSH-Effekt auf die Zellproliferation, der aber nur bei einer niedrigen Zelldichte auftrat. Nach längerer Inkubation (>5 Tage) mit TSH konnte eine inhibierende Wirkung von TSH auf das Zellwachstum der Thyreozyten festgestellt werden.

Eigene Untersuchungen an Schweinethyreozyten ergaben unter Stimulation mit 2 mM HMBA und TSH (0,1 mU und 0,5 mU / Kultur) in retinolfreiem Medium (Abb. 30) einen signifikanten Anstieg im Thymidin-Uptake nach 16 und 40 Stunden Inkubation im Vergleich zu den Kontrollthyreozyten. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Amphoux-Fazekas et al. (1997) wonach HMBA bei Schweineschilddrüsenzellen den Verlust der TSH-Sensitivität verhindert. Bei den eigenen Untersuchungen zeigte sich, dass sich durch eine Steigerung der TSH-Konzentration über 0,5 mU / Kultur hinaus die Thymidinaufnahme nicht mehr signifikant erhöhen lässt. Unsere Ergebnisse lassen ferner darauf schiessen, dass die Thyreozyten nach einer Stimulationsdauer, die über 40 h hinausgeht, gegenüber TSH refraktär werden und der TSH-Effekt auf die Steigerung der Thymidinaufnahme somit verloren geht. Diese Beobachtung steht im Widerspruch zu dem von Amphoux-Fazekas et al. 1997 beschriebenen TSH-Effekt. Es könnte sein, dass der proliferative Effekt des TSH nach mehr als

40 Stunden Inkubationsdauer durch den apoptoseinduzierenden Effekt des HMBA aufgehoben wird. In retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 31) ist die globale Thymidinaufnahme in die Thyreozyten insgesamt niedriger als in retinolfreiem Medium, und eine simultane Stimulation mit 2 mM HMBA + 0,1 mU TSH / Kultur steigerte die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten auch noch nach 64 Stunden signifikant gegenüber der Wirkstoff-freien Kontrollkultur. Die Ursache für die verlängerte und gegenüber der Kontrolle gesteigerte Thymidinaufnahme kann nur am Retinol liegen, da die Versuchsbedingungen gegenüber den Kulturen in retinolfreiem Medium bis auf das Retinol sonst gleich waren. Vermutlich modifiziert Retinol die HMBA-Wirkung auf die Thymidinaufnahme. Wahl (1991), Greil et al. (1985) und Eggo et al. (1979) machten die Beobachtungen, dass TSH die ^3H -Thymidinaufnahme in die DNS von Schweinethyreozyten dosisabhängig hemmt, wenn die Zellen in einem Medium, das „physiologische“ Dosen an Retinol (ca. 1 μM) enthält, kultiviert werden. Eine entsprechende Beobachtung lässt sich für die hohen TSH Konzentrationen auch bei den eigenen Versuchen aus den Abb. 30 und 31 herauslesen. Dass der Effekt der Hemmung der Thymidinaufnahme nicht bei den niederen TSH-Dosen auftritt, dürfte wahrscheinlich dem HMBA zuzuschreiben sein, denn nach Amphoux-Fazekas et al., 1997) fördert HMBA das Zellwachstum. Bei hohen TSH-Dosen macht sich der die Thymidinaufnahme hemmende Effekt des TSH bemerkbar und übertrifft offensichtlich den Effekt von HMBA.

Unter 6 mM HMBA liess sich die Thymidinaufnahme in Thyreozyten, die in retinolfreiem Medium (Abb. 32) 16 und 40 Stunden lang inkubiert wurden, signifikant gegenüber der Wirkstoff-freien Kontrolle steigern. Dieser Effekt konnte nach 16 und 40 Stunden nur noch durch simultane Stimulation mit TSH (0,01-0,5 mU / Kultur) gesteigert werden. Nach 64 Stunden müssen die Zellen gegenüber HMBA refraktär geworden sein. Auch alle zusätzlich mit TSH stimulierten Kulturen rufen jetzt einen negativen Einfluss auf die Thymidinaufnahme hervor.

Die Kultivierung der Thyreozyten in retinolhaltigem NCTC-135 Medium (Abb. 33) zeigte unter 6 mM HMBA nach 16 Stunden Inkubation keine signifikanten

Unterschiede zwischen der unstimulierten Kontrolle und den mit HMBA und TSH stimulierten Kulturen. Ein von der TSH-Konzentration abhängiger Anstieg im Thymidin-Uptake konnte hingegen nach 40 Stunden beobachtet werden, wobei die höchste Aufnahmerate hier bei einer TSH-Konzentration von 1 mU / Kultur beobachtet wurden. Der hierfür entscheidende Effekt dürfte durch HMBA bedingt sein, da bei Schweinethyreozyten in Gegenwart von 0,6 μ M Retinol unter hohen TSH-Dosen sonst ein Abfall der Thymidinaufnahme beobachtet wird (Wahl, 1991). Im Gegensatz zum retinolfreiem Medium werden die Thyreozyten in retinolhaltigem Medium nach 64 Stunden gegenüber HMBA noch nicht refraktär. Auch hier könnte das im Medium enthaltene Retinol die Wirkung des HMBA modifizieren, zumal beide Substanzen chemische Ähnlichkeiten besitzen. Diese Interaktion könnte am Membranrezeptor ablaufen. Nach 88 Stunden Inkubation fielen die mit 6 mM HMBA + TSH stimulierten Kulturen unter das Niveau der Kontrollgruppe. Dieser Effekt kann mit dem Alter der Primärkultur zu klären sein.

4.4 Beeinflussung der Apoptoserate von Thyreozyten durch HMBA, Staurosporin und TSH

Unter Apoptose versteht man einen physiologischen Zelluntergang bei dem einzelne Zellen beseitigt werden. Die Apoptose spielt für die Erhaltung, Entwicklung und das Altern vielzelliger Gewebe eine grosse Rolle. Die Expression Apoptose-auslösender Gene wird nach Löffler et al. (1998) über Kernrezeptoren gesteuert. Der Beweis, dass zum Beispiel Vitamin A zum Zelltod durch Apoptose führt, wurde in einigen Tumor-Zelllinien erbracht (Iwata et al., 1992; Nagy et al., 1995; Zhang et al., 1995). Eggo et al. (1979) beobachteten bei Meerschweinchen thyreozyten unter dem Einfluss von Retinol eine Zellschädigung durch Schwächung der lysosomalen Membranen, die zum vermehrten Zelltod durch Apoptose führt.

In den eigenen Versuchen konnte der Apoptose-induzierende Effekt von Retinol nicht beobachtet werden. Retinol lag in unserem Medium allerdings nur in einer sehr niedrigen "physiologischen" Konzentration (0,6 μM) vor. So verhielten sich die Kontrollkulturen in retinolfreiem Medium zu den Zeitpunkten 24 und 144 Stunden vergleichbar mit den in retinolhaltigem NCTC-135 Medium kultivierten Thyreozyten (Abb. 34 und 35).

Ein Apoptose-induzierende Effekt von Retinol auf menschliche Schilddrüsenkarzinomzellen wurde von Schmutzler et al. (2000) beschrieben. Hierfür waren allerdings wesentlich höhere Dosen als die bei uns verwendeten, erforderlich. Wu et al. (1994) beobachtete eine Vergrößerung des Golgiapparates bei Thyreozyten nach Zugabe von Vitamin A und Evain-Brion et al. (1991) beschrieben eine toxische Wirkung von Retinsäure auf Zellmembranen ab einer Konzentration von 100 μM . Auf einer Apoptose dürfte auch die in den Fünfzigerjahren eingesetzte Vitamin A-Behandlung der Hyperthyreose und der Struma beruhen (Simkins, 1947). Aufgrund der wahrscheinlich zu hoch gewählten Dosis mit schweren Nebenwirkungen wurde diese Therapieform schnell verlassen. Hirsch beobachtete 1967, dass jahreszeitliche Schwankungen im Auftreten der Hyperthyreose im umgekehrten Verhältnis zum Vitamin A-Angebot in der Nahrung standen.

Bei den eigenen Untersuchungen wurde als Positivkontrolle zum Apoptose-Nachweis 2,5 μM Staurosporin eingesetzt. Staurosporin ist in der Lage, die Apoptose in vitalen Zellen einzuleiten (Arrebola et al., 2005). Unter Staurosporin zeigten unsere Kulturen nach 24 und 144 Stunden Apoptoseraten zwischen 33% und 35% (Abb. 34 und 35). Möglicherweise ist dieser geringe Anstieg der Apoptose mit einem Mangel an Energie zu erklären, denn zwischen 24 und 144 Stunden wurde das Medium nicht gewechselt. Apoptose ist ein energieaufwendiger Prozess. Somit könnte dieser geringe Anstieg auch ein unspezifischer Effekt des Energiemangels sein.

In retinolfreiem Medium konnte unter 1 mU TSH / Kultur nach 24 und 144 Stunden Inkubation eine Senkung der Apoptoserate gegenüber der unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Zu beiden Zeitpunkten betrug sie nur 2% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle, die eine Rate von 5% aufwies.

TSH zeigt somit eine Zell-protective Wirkung. In retinolfreiem Medium zeigt sich unter HMBA und HMBA + TSH im Vergleich zur Kontrolle nach 24 Stunden eine geringgradige, allerdings statistisch nicht gesicherte Steigerung der Apoptose. Nach 144 Stunden zeigen die hohen HMBA-Konzentrationen (6mM) jedoch einen Apoptose-abschwächenden Effekt, der besonders in Gegenwart von TSH deutlich wird. TSH verliert also durch HMBA seine zellprotective Wirkung nicht. In retinolhaltigem Medium zeigt TSH, gemessen an der Kontrolle, weder nach 24 noch nach 144 Stunden einen Apoptose-hemmenden Effekt. In retinolhaltigem Medium könnte HMBA sogar eine Apoptose-verstärkende Wirkung besitzen. Wie unsere Versuche zeigen, kann diese Wirkung aber keinesfalls eine ausgeprägte sein. Für eine statistische Absicherung wäre hier eine grosse Anzahl von Versuchen notwendig.

Yamamoto-Yamaguchi et al. (2003) beschreiben eine Induktion der Apoptose in menschlichen Lungencarcinomzellen durch HMBA und zusätzliche Behandlung mit Interferon α . HMBA bewirkt dabei eine Freisetzung von Cytochrom c und erhöht den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Auch bei Multiple-Myelom-Zellen induziert HMBA die Apoptose. Die Unterdrückung der bcl-2 Gen Expression könnte ein möglicher Angriffspunkt sein (Siegel et al., 1998), denn das bcl-2 Gen hat eine anti-apoptotische Funktion, die die Zelle vor dem Zelltod schützt. Yu et al. (2002) kommen zu dem Schluss, dass HMBA die Zellproliferation bei Leukämiezellen hemmt und die Anzahl der Zellen in der S-Phase der Zellteilung verringert. Ferner konnte eine dosisabhängige Reduzierung der Cyclin A Expression beobachtet werden.

5. Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen zum Schilddrüsenstoffwechsel erfolgten an Primärkulturen von Schweinethyreozyten. Diese Kulturen stellen ein in-vitro-System mit in-vivo-Merkmalen dar. Für die vorliegenden Versuche wurde ein retinolfreies und ein retinolhaltiges (0,6µM) NCTC-135 Medium verwendet.

An kultivierten Schweinethyreozyten sollte zunächst der Einfluss von Hexamethylenbisacetamid (HMBA) allein und dann in Kombination mit Thiamazol oder Perchlorat auf die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thmidinaufnahme untersucht werden.

In einem zweiten Schritt wurde die Untersuchung erweitert und die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thmidinaufnahme unter simultaner Stimulation mit TSH (0,01; 0,1; 0,5; 1 mU / Kultur) verfolgt.

Gegenstand des dritten Teils der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der genannten Stimulanzen (HMBA und TSH) auf die Apoptoserate von Schweinethyreozyten.

HMBA in hoher Konzentration (6 und 8 mM) hat als Zusatz zum Kulturmedium einen signifikant hemmenden Einfluss auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Unter gleichen HMBA-Konzentrationen war die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten in retinolhaltigem Medium gegenüber den in retinolfreiem Medium kultivierten Thyreozyten signifikant erhöht. Das Maximum der Radioiodaufnahme wurde in retinolhaltigem NCTC-Medium gegenüber retinolfreiem NCTC-Medium zu einem früheren Zeitpunkt, nämlich schon nach 24 Stunden, erreicht. Bei der Zellaufbereitung mittels Dispase kommt es zu einem Verlust von TSH-Rezeptoren auf der Thyreozytenmembran. Durch die Verwendung von retinolhaltigem NCTC-Medium findet offensichtlich eine zügigere Regeneration der Rezeptoren statt.

Unter Einfluss von Thiamazol zeigte sich in retinolfreiem Medium eine von der HMBA-Konzentration abhängige Abnahme der Radioiodaufnahme. Auch unter Perchlorat-Einfluss konnte nach 72, 96 und 120 Stunden Inkubation in retinolfreiem Medium eine Abnahme der Radioiodspeicherung beobachtet werden.

Die Stimulation der Schweinethyreozyten nur mit HMBA (2 mM) ohne TSH-Zugabe zeigte in retinolfreiem NCTC-135 Medium nach 16 und 40 Stunden einen signifikanten Anstieg in der Radioiodaufnahme gegenüber der Kontrollkultur. HMBA ist in der Lage den TSH-Effekt in irgendeiner Form nachzuahmen. Die niedrigste TSH-Dosis (0,01 mU), die eingesetzt wurde, verstärkt initial in retinolhaltigem Medium den HMBA-Effekt. Eine weitere Erhöhung der TSH-Konzentration erbrachte in Gegenwart von HMBA keine weitere Steigerung des Radioiod-Uptakes. Eine Erhöhung der HMBA-Konzentration auf 6 mM erbrachte die gleichen Effekte wie unter 2 mM HMBA. Unter gleichzeitiger Stimulation der Thyreozyten mit HMBA und 1,3 mU TSH / Kultur konnte nach 24 Stunden Inkubation in retinolfreiem Medium ein hemmender Einfluss auf die ^3H -Thymidinaufnahme gegenüber der unstimulierten Kontrolle beobachtet werden. Dieser Effekt war nach 48 Stunden für 6 und 8 mM HMBA signifikant. Zu anderen Zeitpunkten konnte jedoch kein signifikanter Effekt des HMBA auf die Thymidinaufnahme nachgewiesen werden. Thyreozyten in retinolhaltigem Medium zeigten nach 48 Stunden Inkubation einen von der HMBA-Konzentration abhängigen Anstieg in der Thymidinaufnahme, die jedoch geringer ausfiel als in retinolfreiem Medium. Retinol kann offensichtlich die HMBA-Wirkung auf die Thymidinaufnahme modifizieren.

Unter Einfluss von 2 mM Thiamazol und HMBA konnten sowohl in retinolfreiem als auch retinolhaltigem Medium zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede in der Thymidinaufnahme gegenüber der nur mit Thiamazol stimulierten Kontrollkultur beobachtet werden. Die globale Thymidinaufnahme war in Anwesenheit von Retinol, Thiamazol und HMBA signifikant niedriger als in den nur mit Thiamazol und HMBA stimulierten Vergleichskulturen.

Wurden die Thyreozyten jedoch mit HMBA vorinkubiert und konnten Thiamazol, TSH und ^3H -Thymidin nur 6 Stunden auf die Zellen einwirken, so zeigte sich sowohl in retinolfreiem als auch in retinolhaltigem Medium eine in Wellen verlaufende Thymidinaufnahme. Des Weiteren zeigte sich insbesondere nach 30 h Inkubation in retinolhaltigem Medium ein von der HMBA-Konzentration abhängiger Anstieg in der ^3H -Thymidinaufnahme. Bei 6 und 8 mM HMBA

verwischen sich die Unterschiede mit zunehmender Inkubationsdauer. Retinol kann somit die Wirkung von HMBA auf die Thymidinaufnahme in die Zellen positiv modifizieren.

Wurden die Thyreozyten mit 1 mM Perchlorat und HMBA inkubiert, so führte HMBA, sowohl in retinolfreiem als auch retinolhaltigem Medium, in keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einem signifikanten Anstieg im ^3H -Thymidin-Uptake verglichen mit der nur mit Perchlorat stimulierten Kontrolle. Die Thymidinaufnahmeraten in die Thyreozyten waren unter dem Einfluss von Retinol wiederum signifikant niedriger als bei Thyreozyten in retinolfreiem Medium

In retinolfreiem Medium konnte bei der Stimulation der Schweinethyreozyten mit 2 bzw. 6 mM HMBA plus TSH (0,1 mU und 0,5 mU / Kultur) ein signifikanter Anstieg in Thymidin-Uptake nach 16 und 40 Stunden Inkubation beobachtet werden. Durch eine Steigerung der TSH-Konzentration über 0,5 mU / Kultur hinaus liess sich die Thymidinaufnahme nicht mehr signifikant steigern. Ferner zeigte sich, dass die Thyreozyten nach einer Stimulationsdauer, die über 40 Stunden hinausgeht, gegenüber TSH refraktär werden und der TSH-Effekt auf die Steigerung der Thymidinaufnahme verloren geht. In retinolhaltigem Medium ist die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten insgesamt niedriger als in retinolfreiem Medium, und eine simultane Stimulation mit 2 mM HMBA + 0,1 mU TSH / Kultur steigerte die Thymidinaufnahme in Thyreozyten auch noch nach 64 Stunden signifikant gegenüber der Kontrollkultur.

Unter dem Einfluss von TSH (1 mU / Kultur) sank die Apoptoserate in kultivierten Schweinethyreozyten nach 24 und 144 Stunden Inkubation. TSH zeigte somit eine Zell-protective Wirkung unabhängig vom Retinolgehalt des Mediums. Bei der Stimulation der Thyreozyten mit HMBA (2 und 6 mM) konnte nach 24 Stunden ein leichter, statistisch allerdings nicht belegter Anstieg der Apoptoserate beobachtet werden. Bei der zusätzlichen Stimulation mit TSH (1 mU / Kultur) konnte erneut eine Zell-protective TSH-Wirkung beobachtet werden.

6. Anhang

Tab. 1 zu Abb. 2 und 3. ^{125}I -Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit \blacklozenge gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| Zeit (Stunden) Stimulation\ | 24h | 48h | 72h | 96h | 120h |
|---|------------------------------------|-------------------|----------------------|----------------------|------------------------------------|
| Ohne Stimulation SEM | 10870,1 1500,8 | 12614,8 1452,9 | 5527,7 754,7 | 3136,7 381,6 | 3487,9 365,7 |
| HMBA 2 mM SEM Signifikant | 11247,5 1131,7 | 13058,6 1415,9 | 5220,3 309,2 | 3511,9 233,8 | 3415,2 163 |
| HMBA 4 mM SEM Signifikant | 9591 753,1 | 13085,4 634,5 | 5597,3 333,9 | 3267,4 160,2 | 2978,7 134 |
| HMBA 6 mM SEM Signifikant | 8741,7 682,6 | 11751 952 | 5017,2 190,1 | 2863,5 206,9 | 2744,3 258,2 |
| HMBA 8 mM SEM Signifikant | 5443,3 110,6 \blacklozenge | 12147,1 521,7 | 4555,5 173,5 | 2811,8 205,6 | 2632,8 106,2 \blacklozenge |
| Retinol 0,6 μM SEM Signifikant | 22126,8 2612,4 * | 14641,9 2297,2 | 7172,2 1080,4 | 5073,3 674,5 * | 4954,4 562,3 |
| HMBA 2 mM +Retinol 0,6 μM SEM Signifikant | 24894,9 4749,6 * | 15808,6 2448,3 | 8812,4 615,9 * | 5966,7 622,1 * | 4871,4 470,3 * |
| HMBA 4 mM +Retinol 0,6 μM SEM Signifikant | 26618,2 3496,6 * | 17792 1890,2 | 7800,5 366,8 * | 5513,1 766,3 * | 5421,7 824,7 * |

| | | | | | |
|------------------------------|---------|---------|--------|--------|--------|
| HMBA 6 mM +Retinol 0,6 µM | 18798,2 | 17108,5 | 6725,2 | 7020,2 | 4336 |
| SEM | 1850,2 | 2174,8 | 568,7 | 1324,4 | 470,9 |
| Signifikant | * | | * | * | * |
| HMBA 8 mM +Retinol 0,6 µM | 18137,8 | 16462,1 | 6217,7 | 6029,4 | 3822,7 |
| SEM | 2185,2 | 1677,2 | 530,1 | 599,3 | 245 |
| Signifikant | * | * | * | * | * |

Tab. 2 zu Abb. 4 und 5. ^{125}I -Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zu den Ergebnissen der Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) | 30 | 54h | 78h | 102h | 126h |
|----------------------------------|---------|--------|--------|--------|-------|
| Stimulation\ Ohne Stimulation | 17921,4 | 2753,9 | 5693,1 | 4085,6 | 645,8 |
| SEM | 1826,1 | 292,1 | 526,5 | 96,5 | 50,4 |
| HMBA 2 mM | 15438 | 2645,4 | 6104,8 | 4390,3 | 664 |
| SEM | 1205,5 | 182,7 | 661,6 | 711,9 | 49 |
| Signifikant | | | | | |
| HMBA 4 mM | 18662,7 | 2180,2 | 5510,3 | 4012,8 | 694,9 |
| SEM | 2015,6 | 180,2 | 886,7 | 209,6 | 53,7 |
| Signifikant | | | | | |
| HMBA 6 mM | 16423,1 | 2501,3 | 5517,1 | 4040,7 | 700,4 |
| SEM | 854,4 | 103,9 | 491,3 | 232,6 | 29,2 |
| Signifikant | | | | | |
| HMBA 8 mM | 14416,3 | 2475,2 | 5416,3 | 4109,7 | 696,1 |
| SEM | 1953,8 | 166,4 | 587,8 | 245,6 | 65,7 |
| Signifikant | | | | | |
| Retinol 0,6 µM | 36999,1 | 2993,1 | 2590 | 4311,6 | 595,3 |
| SEM | 1488,8 | 198,4 | 386,3 | 393,6 | 58,2 |
| Signifikant | * | | * | | |

| | | | | | |
|--|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------|
| HMBA 2 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 32156,5 2580,2 * | 3431 309,1 * | 3394,7 614,9 | 2446,5 350,5 * | 765,5 43,2 |
| HMBA 4 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 35783,6 1706,9 * | 3920,3 290,6 * | 4090,1 605,4 | 2282,1 329 * | 730,5 13 |
| HMBA 6 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 23475,9 3681,2 | 3090,7 320,1 | 4068,6 522 | 3744,2 516,5 | 601,3 32,3 |
| HMBA 8 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 22167,9 2255,2 * | 2933 289,9 | 3504,1 403,9 * | 3620,3 812,5 | 682,1 66,9 |

Tab. 3 zu Abb. 6 und 7. ^{125}I -Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Thiamazol 2 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 24 | 48h | 72h | 96h | 120h |
|--|------------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Thiamazol 2 mM SEM | 7507,1 1489,9 | 8400,1 183 | 2297,2 167,5 | 2465,7 343,4 | 2014,9 173,7 |
| HMBA 2 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 5807,1 1129,7 | 9681,3 368,6 | 2177,5 213,2 | 2295,2 248,7 | 1749,5 74,3 |
| HMBA 4 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 5435,9 971 | 9327,3 1037,4 | 2144,4 135,3 | 2245,4 231 | 1563 68,2 |

| | | | | | |
|--|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| HMBA 6 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 4690 980,3 | 9293,7 703,2 | 1979,4 117,1 | 1952,4 112,9 | 1604,7 56,9 |
| HMBA 8 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 5104,4 363,3 | 8770,7 227,3 | 1646,8 92,3 ♦ | 2233,9 200,8 | 1549,6 152,4 |
| Retinol 0,6 µM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 3353 820,4 | 6554,4 1099,1 | 1475,4 168 * | 1767,7 51,4 | 1223,3 132,3 * |
| HMBA 2 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3933,9 704,2 | 5932,6 770,1 * | 1650,8 99,9 | 1761,9 137,4 | 1330,2 149,8 * |
| HMBA 4 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 6691,7 1046 ♦ | 7176,2 711,9 | 1436 82,9 * | 1606,1 32,6 * | 1551,2 126,9 |
| HMBA 6 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 4545,3 665,2 | 7086,9 438,2 * | 1635,6 205,8 | 1780,4 237,3 | 1871,2 226,8 ♦ |
| HMBA 8 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3853,3 734,5 | 5966,3 503,9 * | 1422,3 220,6 | 1519,5 158,4 * | 1598,5 19,2 |

Tab. 4 zu Abb. 8 und 9. ^{125}I -Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Thiamazol 2 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 30 | 54h | 78h | 102h | 126h |
|--|-----------------|---------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| Thiamazol 2 mM SEM | 8905,6 1020 | 1731,6 72 | 4599,3 298,1 | 3240,1 267,1 | 861,2 67,5 |
| HMBA 2 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 8373,2 246,9 | 2012,5 58,4 | 5157,3 577,9 | 3563,1 342,2 | 655 44,9 ♦ |
| HMBA 4 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 8145 568 | 1840,1 68,5 | 6185,6 468,2 | 3836,1 323,9 | 599,9 24 ♦ |
| HMBA 6 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 8330,4 720,1 | 1835,8 107,1 | 4870,3 560,9 | 3721,3 125,7 | 582,6 43,8 ♦ |
| HMBA 8 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 7550,1 574,7 | 1586,8 96,2 | 5486,5 160 | 2856,6 200,1 | 583,9 51,6 ♦ |
| Retinol 0,6 µM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 7041,1 379,3 | 1475,2 52,9 * | 2680,5 319,7 * | 2453,2 531,9 | 797,9 84,4 |
| HMBA 2 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 6219,5 890,8 | 1911,6 490,2 | 2519,8 408,7 * | 2018,8 211 * | 764,8 103,8 |
| HMBA 4 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 8261,8 637,6 | 1870,8 105,6 | 3927,5 784 * | 2247,3 185,9 * | 599,3 16,8 |
| HMBA 6 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 7621,7 480,7 | 1634 134,8 | 4240,5 665,9 | 2740,3 93,5 * | 506,4 68,5 ♦ |

| | | | | | |
|--|----------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|
| HMBA 8 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 6348,7 1212 | 1723,1 85 | 4218,3 707,5 | 2685,2 286,9 | 521 22,5 ♦ |
|--|----------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|

Tab. 5 zu Abb. 10 und 11. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Perchlorat 1 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 24 | 48h | 72h | 96h | 120h |
|--|-----------------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Perchlorat 1 mM SEM | 4639,1 303,8 | 3027,4 248,2 | 1593,1 88,1 | 5670,7 739,4 | 4012,4 608,7 |
| HMBA 2 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 3123,2 503,5 ♦ | 4192,8 406,9 | 1476,8 30,2 | 4694,6 409,9 | 3064,8 121,7 |
| HMBA 4 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 3768,8 219,3 | 4189,9 220,7 | 1703,4 255,9 | 4818,9 542,1 | 2764,6 129,5 ♦ |
| HMBA 6 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 3506 293,7 | 4900,1 576,4 | 1243,4 56,5 | 4495,3 149,9 | 2704,4 82,7 ♦ |
| HMBA 8 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 3497,3 308,3 | 4834,5 237,1 | 1215,8 24,8 | 3595,7 203,2 ♦ | 2361,6 60,7 ♦ |
| Retinol 0,6 µM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 3012,36 435,4 * | 3046,7 335,8 | 2483,1 199,6 * | 3414,9 345,1 * | 3810,3 532,4 |

| | | | | | |
|---|-----------------|-----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| HMBA 2 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 2333,4 454,1 | 3589,5 476 | 2403,1 172,6 * | 3621,7 314,4 | 3598,7 174 * |
| HMBA 4 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3208,5 203,6 | 3952,3 266,4 | 3140,4 188 * | 4174,8 309,1 | 4791,6 360,6 * |
| HMBA 6 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3356,6 342 | 3884,7 477,8 | 1875,3 187,8 * | 3747,2 152,4 * | 3346,1 320,9 |
| HMBA 8 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 2437,7 363,5 | 4349,9 474,4 | 1929,5 281,7 * | 2823,8 434,3 | 3014,1 340,1 |

Tab. 6 zu Abb. 12 und 13. ^{125}I -Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Perchlorat 1 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 30 | 54h | 78h | 102h | 126h |
|---|----------------------|-------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Perchlorat 1 mM SEM | 3954,5 258,6 | 743 52,1 | 4154,6 408,5 | 3512,7 272,4 | 584,8 46,3 |
| HMBA 2 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 4241,4 277,1 | 701,7 93 | 4661,7 435,8 | 4005,8 325,2 | 598,9 33,7 |
| HMBA 4 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 5134,4 414,5 ♦ | 586 8 | 4962,8 296,8 | 4052,4 233,6 | 620,2 53,5 |

| | | | | | |
|---|----------------------|--------------------|----------------------|----------------------|--------------------|
| HMBA 6 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 4436,4 185,2 | 495,4 17,3 ♦ | 4939,8 450 | 3477,9 214,8 | 563,2 35,3 |
| HMBA 8 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 3817,6 170,7 | 455 18,3 ♦ | 4196,3 238,6 | 3664,6 343,6 | 589,8 38,9 |
| Retinol 0,6 µM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 2813,8 181,2 * | 738,3 101,9 | 2121,7 260,9 * | 1813,2 291,9 * | 406,4 55,5 * |
| HMBA 2 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 2988,7 420,9 * | 730,9 19,9 | 1978,6 522,8 * | 2081,6 437,8 * | 454,8 28,2 * |
| HMBA 4 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3794,9 205,9 * | 553,2 32,7 | 2403,4 300,9 * | 1988,5 403,5 * | 425,6 67 |
| HMBA 6 m +Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3790,2 292,9 | 534,5 80,1 | 3997,4 538,9 ♦ | 2146,3 150,8 * | 398 68,2 |
| HMBA 8 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3522,5 644,1 | 414,8 37,1 ♦ | 2545,4 509,3 * | 1892 347,2 * | 449,8 110,3 |

Tab. 7 zu Abb. 14 und 15. ^{125}I -Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| Stimulation \ Zeit (Stunden) | 16 | 40h | 64h | 88h |
|--|---------|--------|--------|--------|
| Ohne Stimulation | 9409 | 3539 | 4516,4 | 3888,8 |
| SEM | 509,7 | 471,7 | 98,2 | 297,2 |
| HMBA 2 mM | 12215 | 6328,7 | 5650,3 | 4495,9 |
| SEM | 120,3 | 613,1 | 113,3 | 482 |
| Signifikant | ♦ | ♦ | ♦ | |
| HMBA 2 mM+TSH 0,01 mU | 11512,4 | 6339,1 | 6419,7 | 3166,5 |
| SEM | 1104 | 591,1 | 300,3 | 423,5 |
| Signifikant | | ♦ | | |
| HMBA 2 mM+TSH 0,1 mU | 10920,6 | 4600,7 | 6249,1 | 3878,8 |
| SEM | 531,9 | 523 | 808 | 129,3 |
| Signifikant | | | | |
| HMBA 2 mM+TSH 0,5 mU | 9282,7 | 5005,9 | 6152,8 | 3438,5 |
| SEM | 543,7 | 557,9 | 605,7 | 772,8 |
| Signifikant | | | | |
| HMBA 2 mM+TSH 1 mU | 8604 | 4664,7 | 5902,9 | 3127,9 |
| SEM | 578,6 | 310,7 | 472 | 406,8 |
| Signifikant | | | | |
| Retinol 0,6 µM | 13005,3 | 7734,8 | 6301,6 | 4463,9 |
| SEM | 1043,2 | 813,7 | 1111,1 | 90,1 |
| Signifikant | * | * | | |
| HMBA 2 mM+Retinol 0,6 µM | 13161,7 | 9671,8 | 8484 | 4274,7 |
| SEM | 706,8 | 1319,4 | 792,1 | 445,5 |
| Signifikant | | | * | |
| HMBA 2 mM+TSH 0,01 mU +Retinol 0,6 µM | 14729 | 8009,1 | 6030,6 | 3532,5 |
| SEM | 930,2 | 1361,1 | 684 | 319 |
| Signifikant | | | | |
| HMBA 2 mM+TSH 0,1 mU +Retinol 0,6 µM | 12329,8 | 8129,7 | 6336,9 | 4193,3 |
| SEM | 969,5 | 919,6 | 955,1 | 312 |
| Signifikant | | * | | |
| HMBA 2 mM+TSH 0,5 mU +Retinol 0,6 µM | 12525,3 | 6638,3 | 8109,2 | 5131,7 |
| SEM | 190,3 | 803,2 | 971,3 | 739,2 |
| Signifikant | * | | | |

| | | | | |
|---|-----------------------|---------------|---------------|-----------------|
| HMBA 2 mM+TSH 1 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 12075,9 528,3 * | 6775 938,9 | 6889 438,2 | 3497,6 291,5 |
|---|-----------------------|---------------|---------------|-----------------|

Tab. 8 zu Abb. 16 und 17. ^{125}I -Iodidaufnahme in cpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| Stimulation \ Zeit (Stunden) | 16 | 40h | 64h | 88h |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------|----------------------|
| Ohne Stimulation SEM | 10675,6 282 | 4811,6 704,4 | 5680,1 596,1 | 3690 509,8 |
| HMBA 6 mM SEM Signifikant | 12457,1 513,2 ♦ | 6612,7 196,6 ♦ | 4227,7 414,8 | 3111 188,9 |
| HMBA 6 mM+TSH 0,01 mU SEM Signifikant | 13890,8 555 ♦ | 5045,6 206,6 | 3719,2 638,2 | 3715,6 201,7 |
| HMBA 6 mM+TSH 0,1 mU SEM Signifikant | 12928,6 837,4 | 7947,4 750,9 ♦ | 4370,6 395,4 | 3600,2 387 |
| HMBA 6 mM+TSH 0,5 mU SEM Signifikant | 11989,6 746,5 | 8924,5 1106,5 ♦ | 4013,3 619,9 | 3033,2 266 |
| HMBA 6 mM+TSH 1 mU SEM Signifikant | 11855 568,5 | 7651,9 577,6 ♦ | 4237,2 458,3 | 2872,4 317,4 |
| Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 13182,1 742,2 * | 7581,8 405,7 * | 6599 1363,4 | 5422,4 306,8 * |

| | | | | |
|--|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|
| HMBA 6 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 13794,3 775,1 | 8858,3 1241,7 | 6853,8 93,8 * | 3540,4 168,4 ♦ |
| HMBA 6 mM+TSH 0,01 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 14685,6 1074,8 | 8444,1 731,6 * | 5311,4 521,7 | 3903,6 159 ♦ |
| HMBA 6 mM+TSH 0,1 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 14607,8 969,4 | 8242 1216,2 | 5213,3 750,9 | 2602,1 345,1 ♦ |
| HMBA 6 mM+TSH 0,5 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 14655,6 672 * | 9361,4 1369,1 | 4559,4 879,4 | 2588,9 332,6 ♦ |
| HMBA 6 mM+TSH 1 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 13439 1190,2 | 10192,8 332,8 * | 4740,3 618,9 | 2523,5 311,3 ♦ |

Tab. 9 zu Abb. 18 und 19. ^3H -Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 |
|---------------------------------|----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Ohne Stimulation SEM | 868,4 163,2 | 10853,2 705,4 | 3386,8 230 | 2109,8 400,7 | 2831,2 406,9 |
| HMBA 2 mM SEM Signifikant | 637,1 197,4 | 10679,4 1609,2 | 3017,4 389,1 | 2106,2 105,9 | 2718,5 430,5 |
| HMBA 4 mM SEM Signifikant | 339,9 6,1 | 10594,9 405,9 | 2962,9 239,1 | 1853,2 94,3 | 2363,2 175,5 |

| | | | | | |
|------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
| HMBA 6 mM | 454,1 | 8973,4 | 3155,2 | 1593,8 | 2285,5 |
| SEM | 145,4 | 1323,6 | 239,5 | 90 | 309,6 |
| Signifikant | | ♦ | | | |
| HMBA 8 mM | 586,6 | 9213,6 | 2737,8 | 1693,6 | 2098 |
| SEM | 29,2 | 558,2 | 219,8 | 143,7 | 82,9 |
| Signifikant | | ♦ | | | |
| Retinol 0,6 µM | 497,2 | 2926,6 | 2809,3 | 2532,2 | 1808,2 |
| SEM | 65,7 | 700 | 233,4 | 465,8 | 171,7 |
| Signifikant | | * | | | |
| HMBA 2 mM +Retinol 0,6 µM | 533 | 3977,2 | 3147,5 | 3111,1 | 2001 |
| SEM | 108,1 | 177,8 | 391,1 | 388,8 | 325,2 |
| Signifikant | | * | | * | |
| HMBA 4 mM +Retinol 0,6 µM | 435,3 | 4159,7 | 2029,4 | 2603,8 | 1578,7 |
| SEM | 115,1 | 571,1 | 283,5 | 411,8 | 49,8 |
| Signifikant | | * | * | | * |
| HMBA 6 mM +Retinol 0,6 µM | 459,9 | 8205,4 | 2561,2 | 3149,6 | 1799,6 |
| SEM | 137,4 | 2541,4 | 381,3 | 627,7 | 114 |
| Signifikant | | | | * | |
| HMBA 8 mM +Retinol 0,6 µM | 515,1 | 8537,1 | 2202,4 | 2818,1 | 1990,5 |
| SEM | 75,4 | 811 | 422,4 | 352,7 | 316,6 |
| Signifikant | | | | * | |

Tab. 10 zu Abb. 20 und 21. ^3H -Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 30 | 54h | 78h | 102h | 126h |
|--|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Ohne Stimulation SEM | 2054,9 224,6 | 10228,1 138,6 | 9774,3 255,5 | 2054,4 200,8 | 5032,2 167,2 |
| HMBA 2 mM SEM Signifikant | 1961,4 41,7 | 12310,9 1663,1 | 9527,6 1650,7 | 1398,9 86,3 ♦ | 4377,2 515,5 |
| HMBA 4 mM SEM Signifikant | 2114,7 240,7 | 10990,2 1851,6 | 9010,4 872,1 | 1315,7 99,2 ♦ | 4928,5 438 |
| HMBA 6 mM SEM Signifikant | 2103,1 196 | 10917 1465,1 | 9228,1 662 | 1315,8 117 ♦ | 4343,5 536,7 |
| HMBA 8 mM SEM Signifikant | 2360,4 303,4 | 10049,1 1649 | 9307,4 352 | 1471,9 168,2 ♦ | 5083,7 663 |
| Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 1181,7 126,6 * | 4561,7 950,4 * | 9740,3 947,3 | 1773,2 250,8 | 2494,5 151,4 * |
| HMBA 2 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 1655,6 207,1 | 5802,2 983,9 * | 5272,8 846,6 ♦ | 1758,6 303,8 | 2253,2 376,6 * |
| HMBA 4 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 1719,6 204,4 | 5467,6 814,5 * | 5135,9 726,8 ♦* | 1196,2 43,1 | 2972,9 394,2 * |
| HMBA 6 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 1645 23,6 ♦ | 6804,9 994 | 8415,9 1084,7 | 1119,3 176,6 | 2309,1 163,7 * |
| HMBA 8 mM +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 1864 332,1 ♦ | 5639,2 1040,3 | 6386,9 836,9 * | 1270,2 45,6 | 2669,9 444,5 * |

Tab. 11 zu Abb. 22 und 23. ^3H -Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit \blacklozenge gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Thiamazol 2 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 24 | 48h | 72h | 96h | 120h |
|---|------------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| Thiamazol 2 mM SEM | 3440,2 445,2 | 9366,3 292 | 2782,5 122,4 | 3494,7 509,8 | 3025,8 215,9 |
| HMBA 2 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 3816,7 519,4 | 10647,5 837,8 | 2724,8 345,2 | 2899,3 291,2 | 2940,8 175,6 |
| HMBA 4 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 3089,1 413,5 | 10656,5 1283,7 | 2876,4 299,2 | 2900,5 274,7 | 2624,2 240 |
| HMBA 6 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 2291 292,8 | 10101 920,1 | 2508,2 258,7 | 2567,6 159,1 | 2546 178,8 |
| HMBA 8 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 2580,7 500,2 | 11008,7 780,3 | 2074,6 161,4 | 2982,3 224,9 | 2534,1 310,1 |
| Retinol 0,6 μM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 1304,2 180,7 * | 6549,9 185,6 * | 2021,7 281,6 * | 2993,1 213,2 | 1888,9 226,8 * |
| HMBA 2 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 μM SEM Signifikant | 2408 179,3 * | 6613 852,5 * | 2223,7 116,2 | 2881,7 215,4 | 2582,8 70,7 |
| HMBA 4 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 μM SEM Signifikant | 2866,9 216,3 \blacklozenge | 7721,4 679,8 | 1881,8 110,6 * | 2257,7 125,5 | 2202,1 142 |

| | | | | | |
|--|-----------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| HMBA 6 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 2374 511,9 | 8255,4 597,3 | 1877,6 347,5 | 2457,1 309,5 | 2851,5 444,3 |
| HMBA 8 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 2046,1 393,7 | 7074 466,6 * | 1910,4 326,5 | 2187,7 242,2 | 2100,5 291 |

Tab. 12 zu Abb. 24 und 25. ³H-Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Thiamazol 2 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 30 | 54h | 78h | 102h | 126h |
|--|-----------------|-------------------|------------------|-----------------|------------------|
| Thiamazol 2 mM SEM | 1846,3 162 | 10061,9 837,7 | 7575,9 430,5 | 1558,2 137,2 | 8483,1 859,6 |
| HMBA 2 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 2436,3 324,8 | 10999,6 1466,8 | 8841,7 941,6 | 1413 122 | 7770,3 1112,8 |
| HMBA 4 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 2351,2 163,7 | 13132,3 1424,1 | 9331,4 814,5 | 1244 117,4 | 8432,8 479,7 |
| HMBA 6 mM +Thiamazol 2 mM SEM Signifikant | 2175,9 97,8 | 9993 1277,4 | 9776,7 1122,8 | 1337,8 93,6 | 7595,5 733,5 |
| HMBA 8 mM +Thiamazol 2 mM SEM | 2308,2 165,3 | 11316,3 512,9 | 6510,7 388,1 | 1438,1 131,1 | 6695,8 431,2 |

| | | | | | |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|----------------------|
| Retinol 0,6 μ M +Thiamazol 2mM SEM Signifikant | 1021,3 97,5 * | 4065,1 418 * | 4784,3 555 * | 1230,8 81,7 | 3590,9 220,5 * |
| HMBA 2 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 μ M SEM Signifikant | 1439,2 222,1 * | 4733,1 961,2 * | 4592,8 430,5 * | 1273,5 113,6 | 3500,8 351 * |
| HMBA 4 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 μ M SEM Signifikant | 1854,8 147,9 | 8715 1932,4 | 5300 535,1 * | 1230,8 50,7 | 4048,8 523,8 * |
| HMBA 6 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 μ M SEM Signifikant | 1960,6 72,3 | 7060,5 588,2 | 6340,1 257,8 * | 1066,5 73,2 | 5317,8 1412,7 |
| HMBA 8 mM+Thiamazol 2 mM+Retinol 0,6 μ M SEM Signifikant | 2412,5 376,5 ♦ | 7117,9 599,3 * | 6206,5 586,1 | 1400,1 159 | 4598,4 820,4 |

Tab. 13 zu Abb. 26 und 27. ^3H -Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Perchlorat 1 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 24 | 48h | 72h | 96h | 120h |
|---|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Perchlorat 1 mM SEM | 5762,3 530,6 | 3805,2 514,5 | 2164,8 143,4 | 7192 1104,6 | 4708,5 1236,3 |
| HMBA 2 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 4320,1 384,2 | 5424,4 570 | 2159,6 65,8 | 5878,7 594,4 | 4394,6 148,8 |

| | | | | | |
|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------|
| HMBA 4 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 4763,7 272,4 | 5540,3 266,9 | 2369,5 300,5 | 5874,4 687,6 | 3942,1 370,6 |
| HMBA 6 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 4373,7 400,5 | 6430,5 713,6 ♦ | 1877,6 83 | 5173,3 207,2 | 3617,9 365,9 |
| HMBA 8 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 4387,3 498 | 6188,5 290,8 | 1897,5 95,8 | 4158,3 284,4 ♦ | 3555,6 351,8 |
| Retinol 0,6 µM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 3465,8 532,4 * | 3509,4 459,7 | 3197,7 447 | 3603,2 433,7 * | 4037,6 562,7 |
| HMBA 2 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3463,5 314,3 | 4045 675,1 | 3350 244,4 * | 4044,6 177,4 * | 4862,4 298,9 |
| HMBA 4 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3721,5 190,4 * | 4310,9 225,2 * | 3657,6 181,7 * | 3653,3 345,7 * | 4926,4 249,8 |
| HMBA 6 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 3556,1 460,6 | 4752,6 548,2 | 2835 180,4 * | 4024,8 224 * | 3814,7 544,7 |
| HMBA 8 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 2326 354,7 * | 4890,4 395,2 * | 2920,5 250,9 * | 3627,6 563,1 | 4012,5 504,2 |

Tab. 14 zu Abb. 28 und 29. ^3H -Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten mit Perchlorat

1 mM). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| \Zeit (Stunden) Stimulation\ | 30 | 54h | 78h | 102h | 126h |
|---|---------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Perchlorat 1 mM SEM | 1827,1 122,1 | 10373,3 1081,4 | 8738,9 592,8 | 1475,9 97,4 | 4613,5 361 |
| HMBA 2 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 1379,1 69,4 ♦ | 11634,4 1073,9 | 10151 906 | 1395,1 69,6 | 5102,7 661,8 |
| HMBA 4 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 1412,3 36 ♦ | 11894,2 847,6 | 9984,2 587,2 | 1424,9 71,1 | 5359,1 446,7 |
| HMBA 6 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 1163,5 52,4 ♦ | 11894,1 1214,2 | 8556,3 460,9 | 1351,1 72,5 | 5508,1 517,5 |
| HMBA 8 mM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 1018,7 64,3 ♦ | 9558,9 645,3 | 8752,2 737,1 | 1266,1 133,7 | 3984 297,4 |
| Retinol 0,6 µM +Perchlorat 1 mM SEM Signifikant | 1555,2 227,3 | 5195,1 604,4 * | 5139,6 817,6 * | 985,1 145,1 * | 2387,2 460 * |
| HMBA 2 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 1601,4 45 * | 4096,5 745,2 * | 4825,7 643 * | 1288,7 130,4 | 2970 159,5 * |
| HMBA 4 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 1099,5 63,7 * | 5719,2 815 * | 4531,8 450,8 * | 1016,9 139,5 * | 3196,9 524,5 * |

| | | | | | |
|---|---------------------|----------------------|----------------------|-----------------|--------------------|
| HMBA 6 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 979,2 21,2 ◆* | 8023,9 735,4 * | 5679,5 448,6 * | 1014,6 174,4 | 2801,3 143 * |
| HMBA 8 mM+Perchlorat 1 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 846,7 113 ◆ | 6235,1 1210,8 | 4948 989,6 * | 1417,6 99,2 | 3323,6 558,5 |

Tab. 15 zu Abb. 30 und 31. ^3H -Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei $n=4$. Die mit ◆ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p<0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| Stimulation\ | Zeit (Stunden) | 16 | 40h | 64h | 88h |
|---|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Ohne Stimulation SEM | | 1279,5 128,5 | 1638,1 136,3 | 5374,1 892,2 | 3264,4 119,9 |
| HMBA 2 mM SEM Signifikant | | 562,2 19,2 ◆ | 2182,3 288,2 | 5658,3 287,7 | 4492,5 339,2 ◆ |
| HMBA 2 mM+TSH 0,01 mU SEM Signifikant | | 1057,4 114,5 | 2737,2 470,9 | 3599,9 218 ◆ | 3993,7 106,3 |
| HMBA 2 mM+TSH 0,1 mU SEM Signifikant | | 3824,3 182,8 ◆ | 3008,6 293,5 ◆ | 3662,6 103,7 | 3750,8 414 |
| HMBA 2 mM+TSH 0,5 mU SEM Signifikant | | 3573,8 257,2 ◆ | 3364,7 270,1 ◆ | 4289,2 359,2 | 3344,3 393,3 |
| HMBA 2 mM+TSH 1 mU SEM Signifikant | | 3278,5 87,3 ◆ | 2833,6 304,1 | 2873,1 187,9 ◆ | 2864,5 232,4 |

| | | | | |
|--|-------|--------|--------|--------|
| Retinol 0,6 µM | 879,7 | 917,8 | 2096,1 | 2219,2 |
| SEM | 44,3 | 162,1 | 204,6 | 214,4 |
| Signifikant | * | * | * | * |
| HMBA 2 mM+Retinol 0,6 µM | 810,2 | 1327,4 | 3315,1 | 2033,9 |
| SEM | 64,2 | 153,9 | 324,2 | 107,1 |
| Signifikant | * | * | ◆* | * |
| HMBA 2 mM+TSH 0,01 mU +Retinol 0,6 µM | 856,4 | 1392,6 | 2748,9 | 2089,4 |
| SEM | 24,9 | 212,2 | 233,8 | 244,1 |
| Signifikant | * | * | * | * |
| HMBA 2 mM+TSH 0,1 mU +Retinol 0,6 µM | 845,8 | 1292 | 2888,8 | 2043,3 |
| SEM | 53,3 | 347,1 | 294,5 | 166,8 |
| Signifikant | | * | ◆* | * |
| HMBA 2 mM+TSH 0,5 mU +Retinol 0,6 µM | 844 | 1850,3 | 2338,6 | 1964,2 |
| SEM | 25,1 | 251,3 | 58,5 | 57,1 |
| Signifikant | * | * | * | * |
| HMBA 2 mM+TSH 1 mU +Retinol 0,6 µM | 841,5 | 1468,8 | 1411,7 | 1940 |
| SEM | 24,8 | 226,7 | 135,2 | 172,5 |
| Signifikant | * | * | * | * |

Tab. 16 zu Abb. 32 und 33. ^3H -Thymidinaufnahme in dpm. Angegeben sind Mittelwerte und SEM bei n=4. Die mit ◆ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Die mit * gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden zur Thyreozytenkultur, die in retinolfreiem Medium inkubiert wurde.

| Stimulation \ Zeit (Stunden) | 16 | 40h | 64h | 88h |
|------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Ohne Stimulation | 5035,1 | 4450 | 6334 | 2751,5 |
| SEM | 261,4 | 352,3 | 355,8 | 90,4 |
| HMBA 6 mM | 6139,6 | 6168,3 | 4577,9 | 2605,2 |
| SEM | 155,5 | 510 | 340,6 | 59,7 |
| Signifikant | ◆ | ◆ | ◆ | |

| | | | | |
|--|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| HMBA 6 mM+TSH 0,01 mU SEM Signifikant | 6415,5 260,8 ♦ | 5407,3 257,6 | 3883,6 374,3 ♦ | 2734,3 261,1 |
| HMBA 6 mM+TSH 0,1 mU SEM Signifikant | 5604 107,6 | 6447,7 554,3 ♦ | 3289,3 204,4 ♦ | 2783 303,1 |
| HMBA 6 mM+TSH 0,5 mU SEM Signifikant | 4931,8 270,2 | 7199,7 305,2 ♦ | 3039,5 104,5 ♦ | 2285 178,7 |
| HMBA 6 mM+TSH 1 mU SEM Signifikant | 4529,7 402,2 | 5147,7 318 | 2068,5 176,4 ♦ | 1911,7 174,7 ♦ |
| Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 5322 610,7 | 4271,2 128,8 | 2192,6 441,8 * | 3096,8 105,5 * |
| HMBA 6 mM+Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 6025,3 255,6 | 4871,7 725,1 | 3365,7 185,8 ♦* | 2603 109,8 ♦ |
| HMBA 6 mM+TSH 0,01 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 5110,2 337,6 * | 5451,4 272,3 | 3625,6 191,3 | 2666,6 140,9 |
| HMBA 6 mM+TSH 0,1 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 5430,3 96,1 | 5939,8 465,6 | 3888,2 553,4 ♦ | 1945,1 184,4 ♦ |
| HMBA 6 mM+TSH 0,5 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 5668,8 395,3 | 6139,4 821,1 | 2113,9 306 * | 1922,8 279,7 ♦ |
| HMBA 6 mM+TSH 1 mU +Retinol 0,6 µM SEM Signifikant | 4631 783,2 | 6808,1 1172 | 1603,6 420,9 | 1879,5 177 ♦ |

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

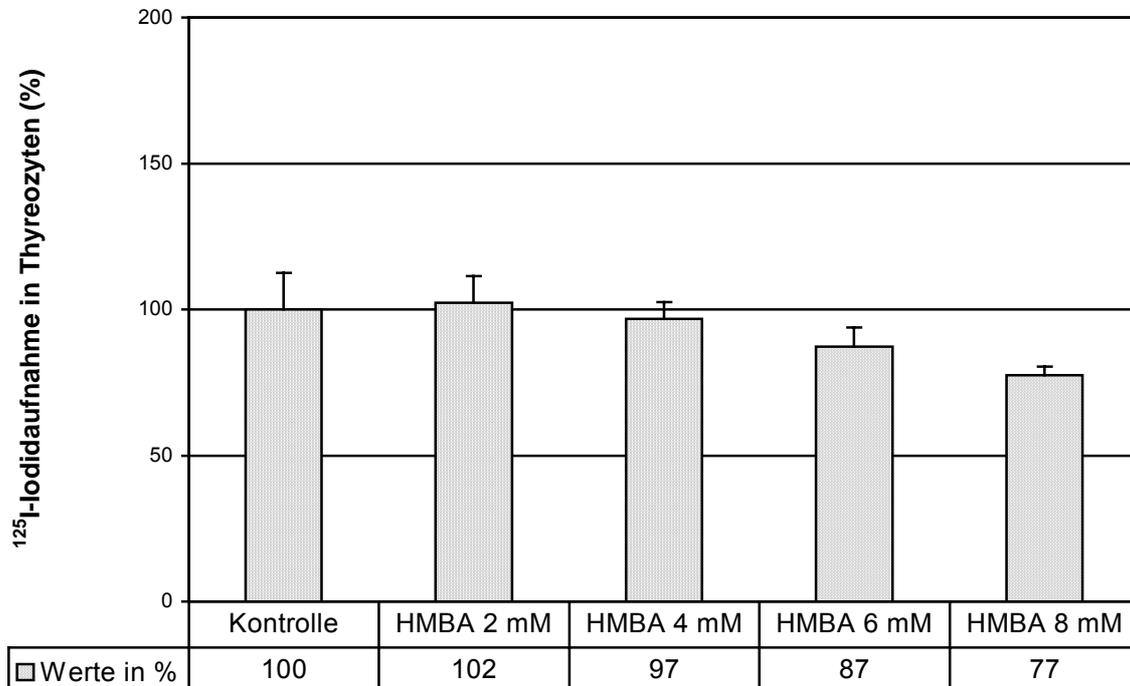


Abb. 2a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 2 normiert auf die Kontrolle

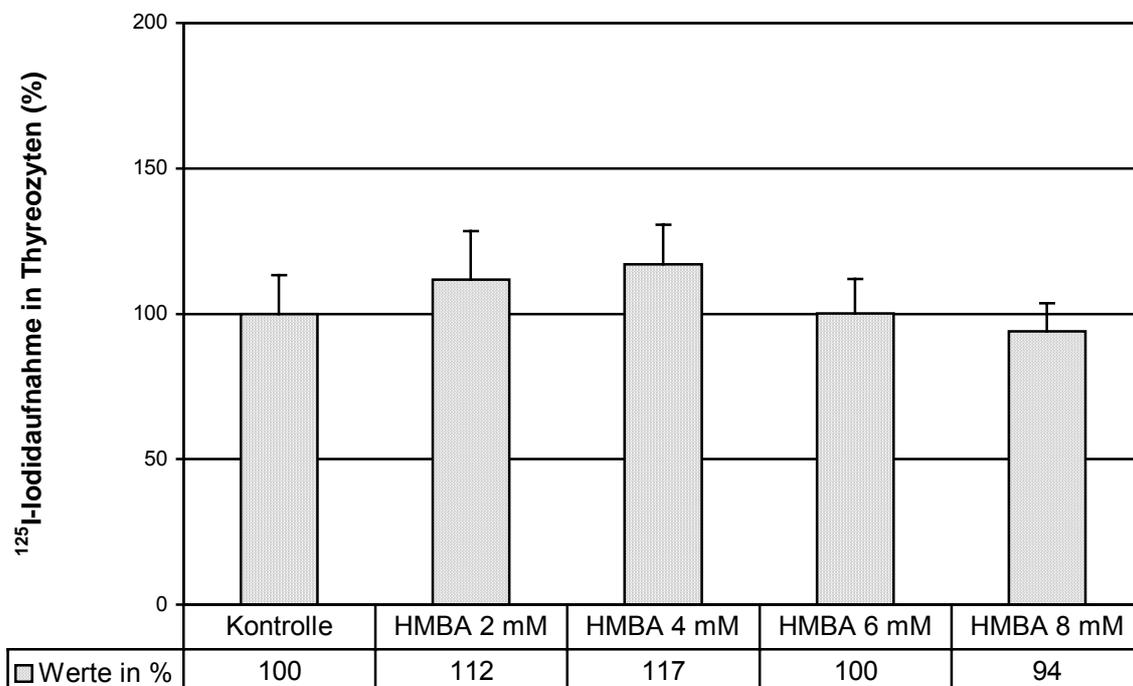


Abb. 3a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 3 normiert auf die Kontrolle

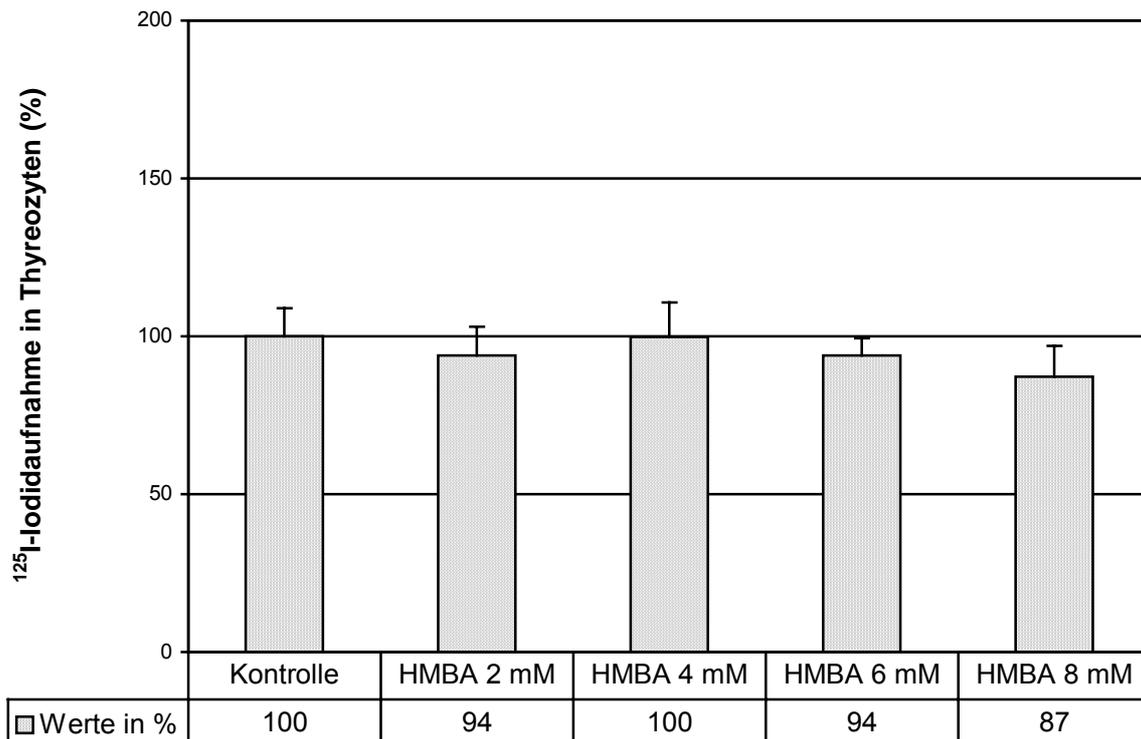


Abb. 4a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 4 normiert auf die Kontrolle

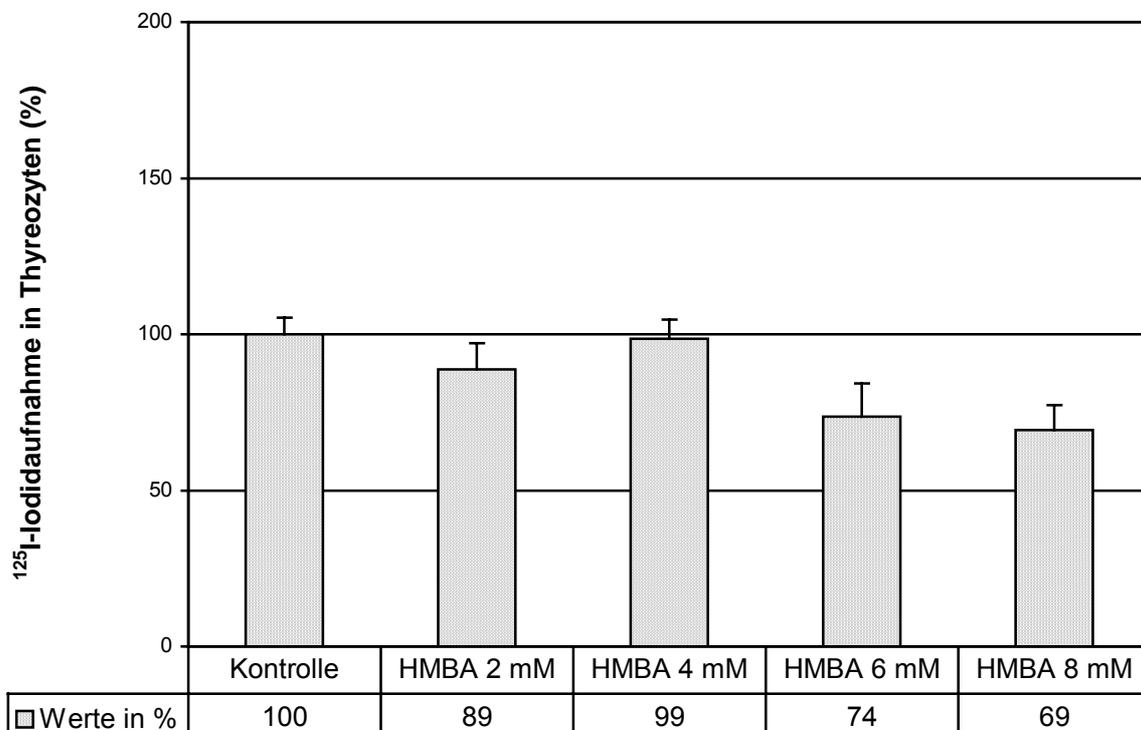


Abb. 5a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 5 normiert auf die Kontrolle

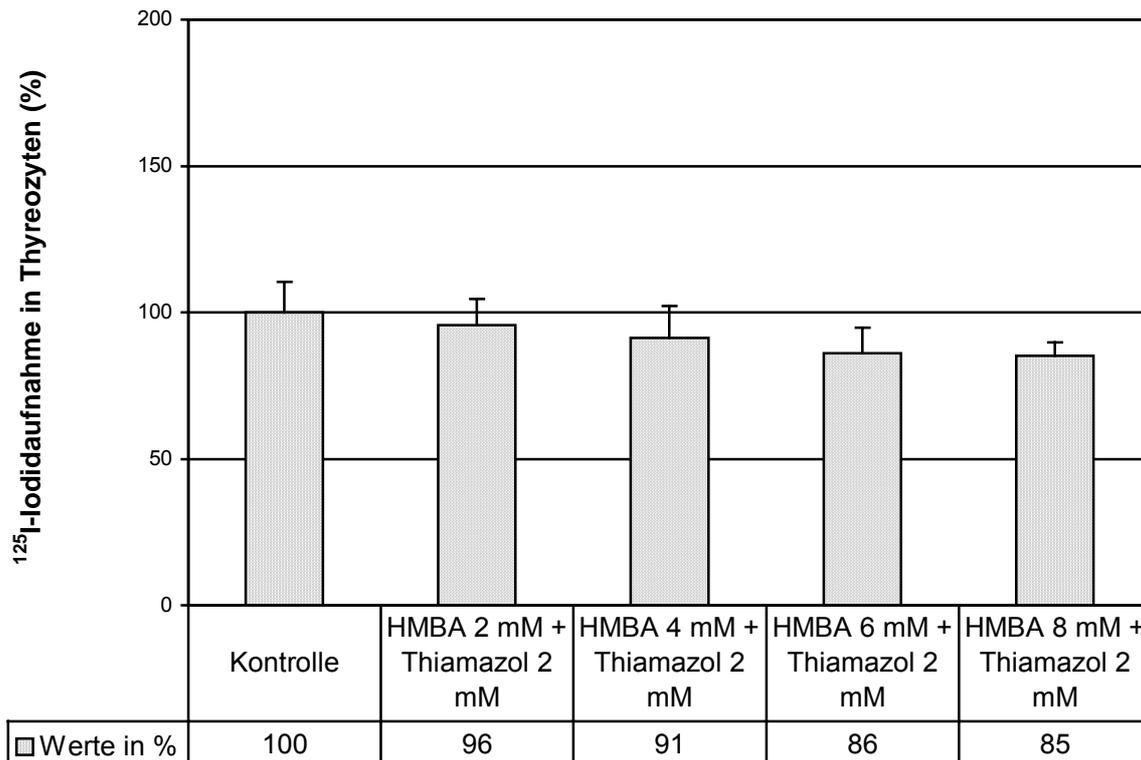


Abb. 6a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 6 normiert auf die Kontrolle

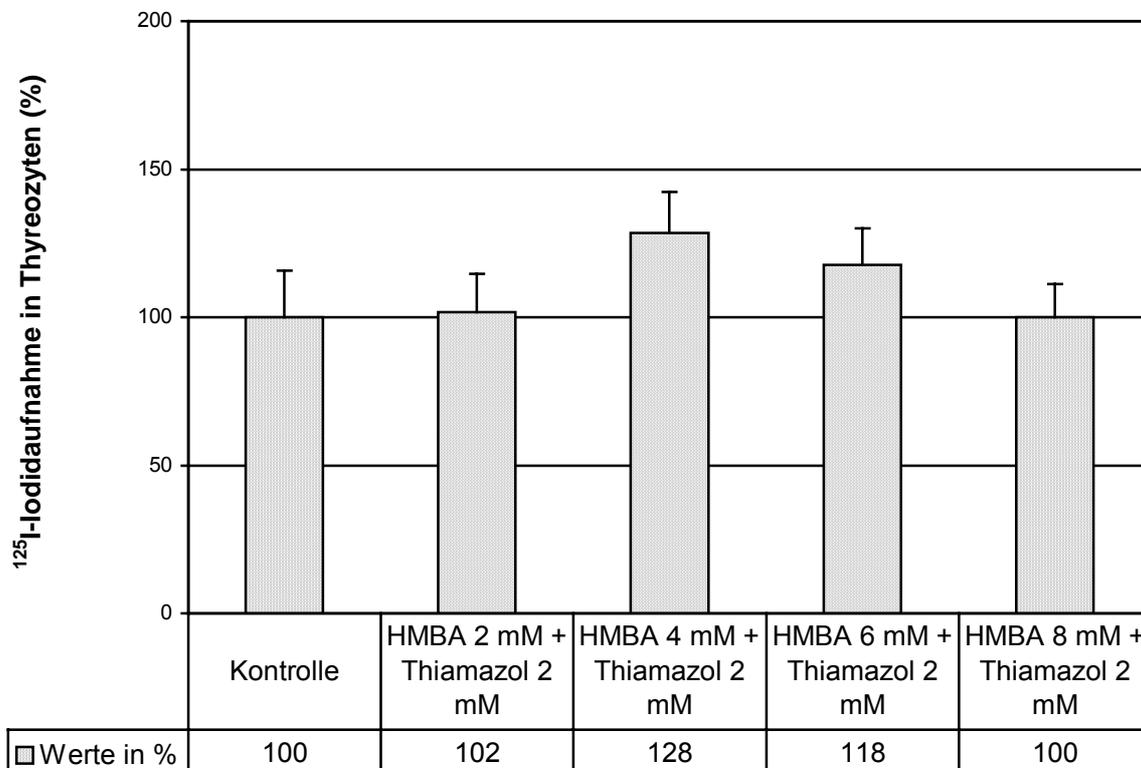


Abb. 7a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 7 normiert auf die Kontrolle

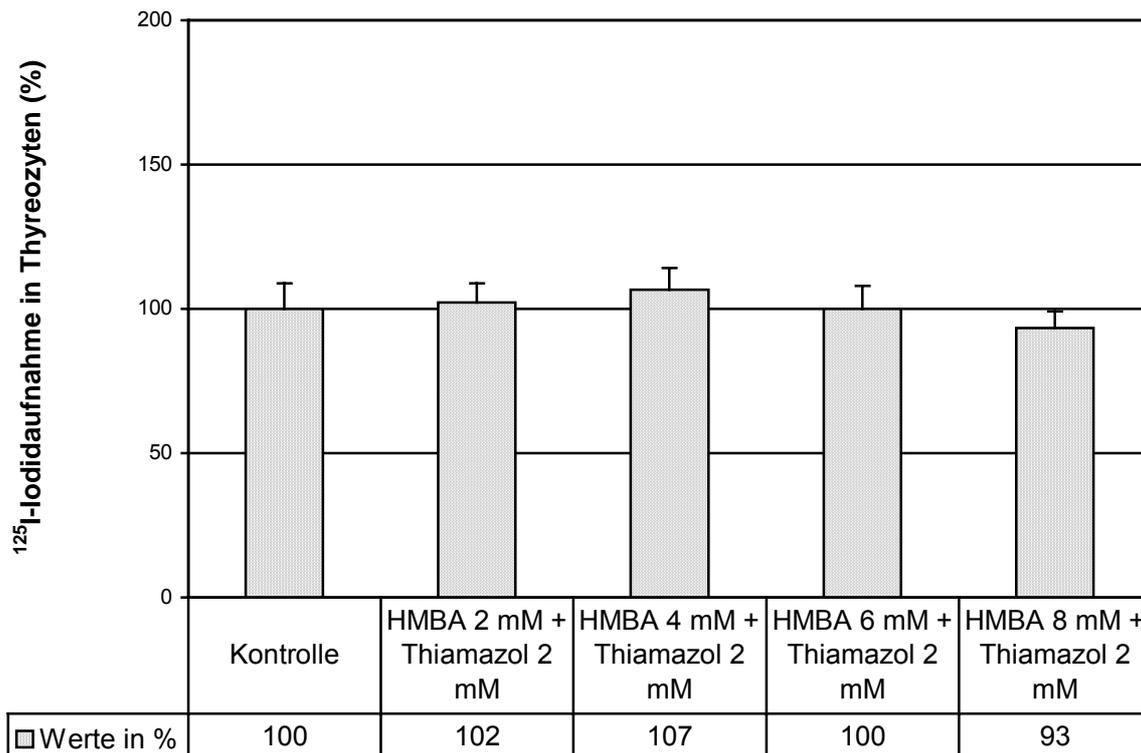


Abb. 8a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 8 normiert auf die Kontrolle

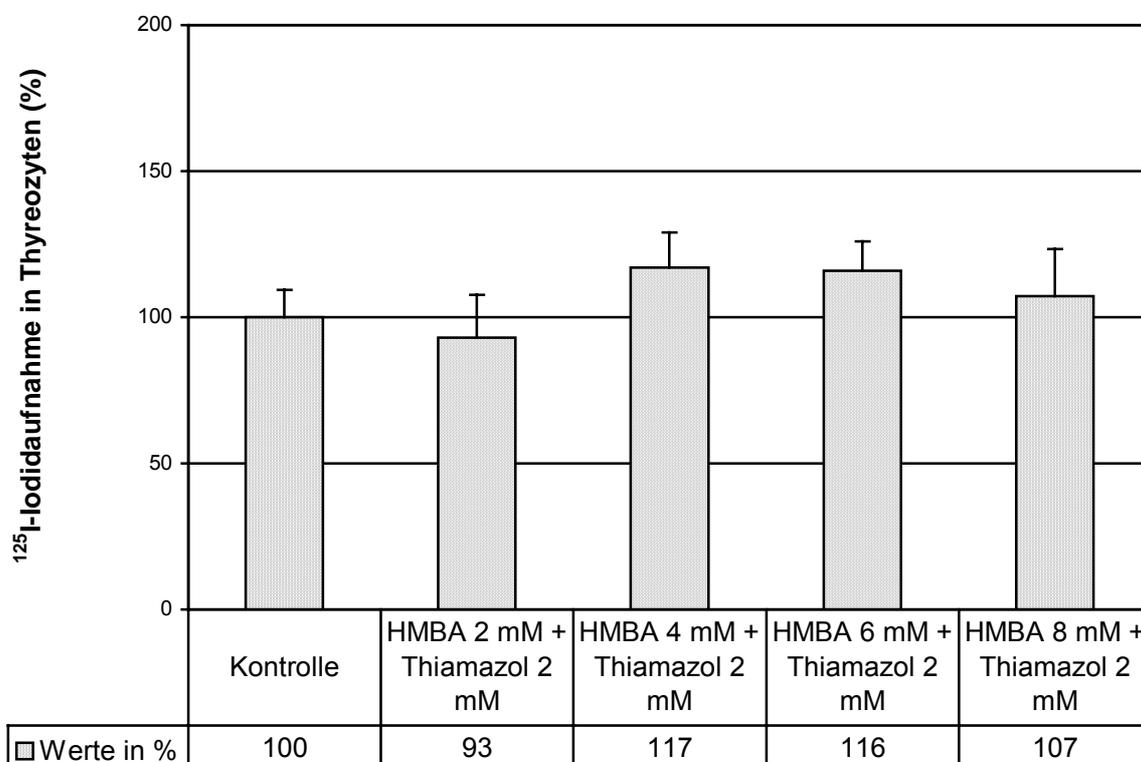


Abb. 9a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 9 normiert auf die Kontrolle

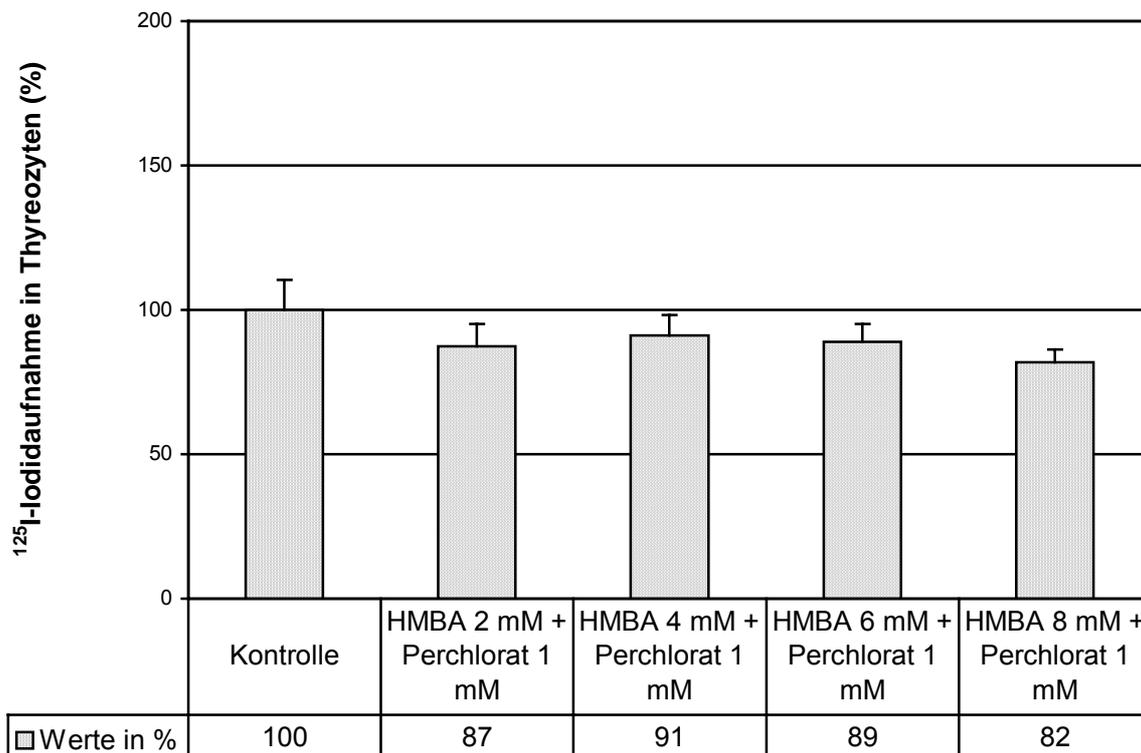


Abb. 10a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 10 normiert auf die Kontrolle

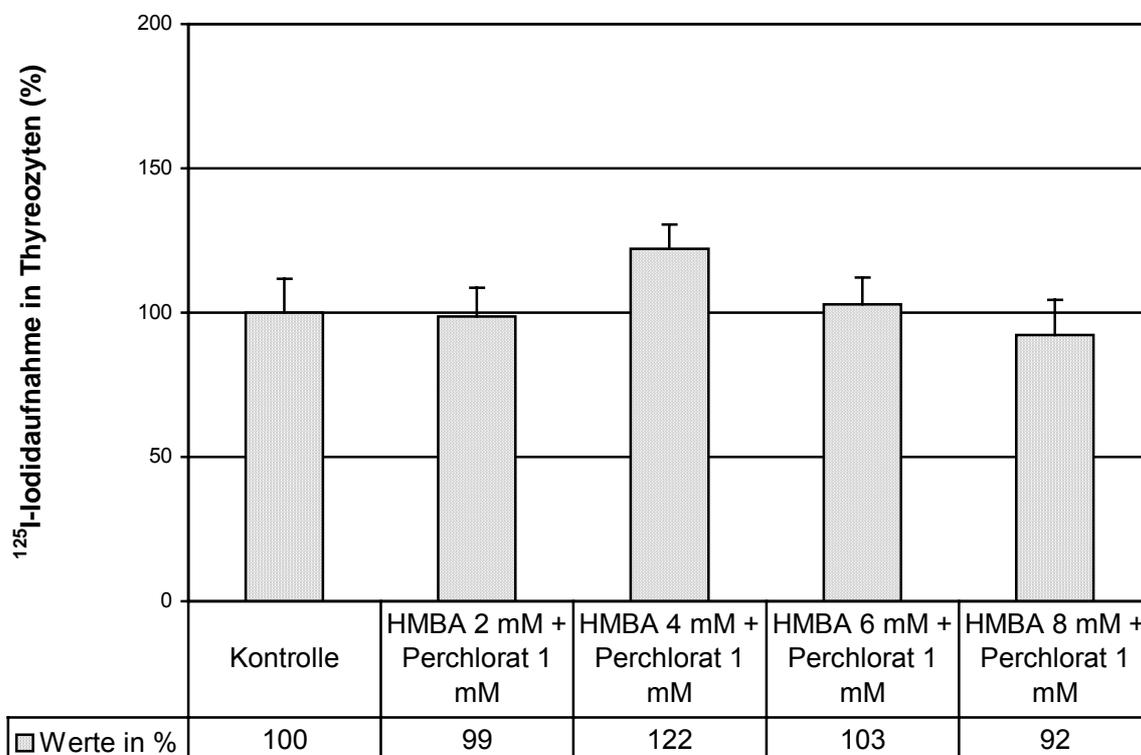


Abb. 11a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 11 normiert auf die Kontrolle

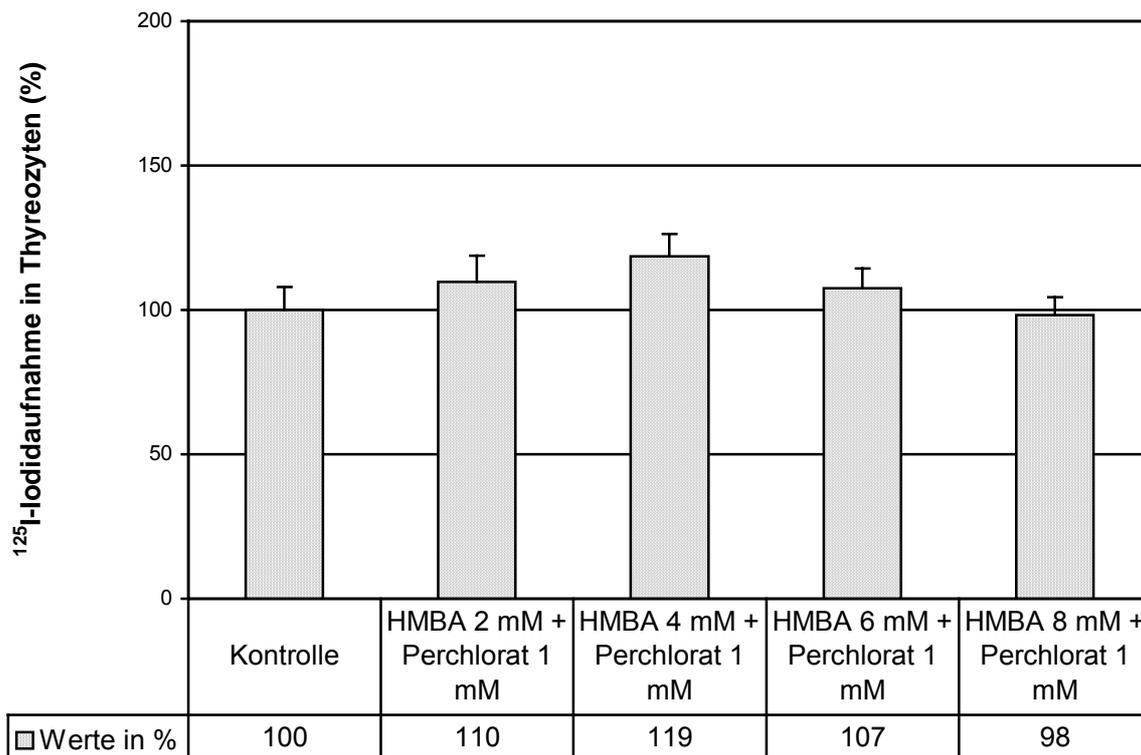


Abb. 12a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 12 normiert auf die Kontrolle

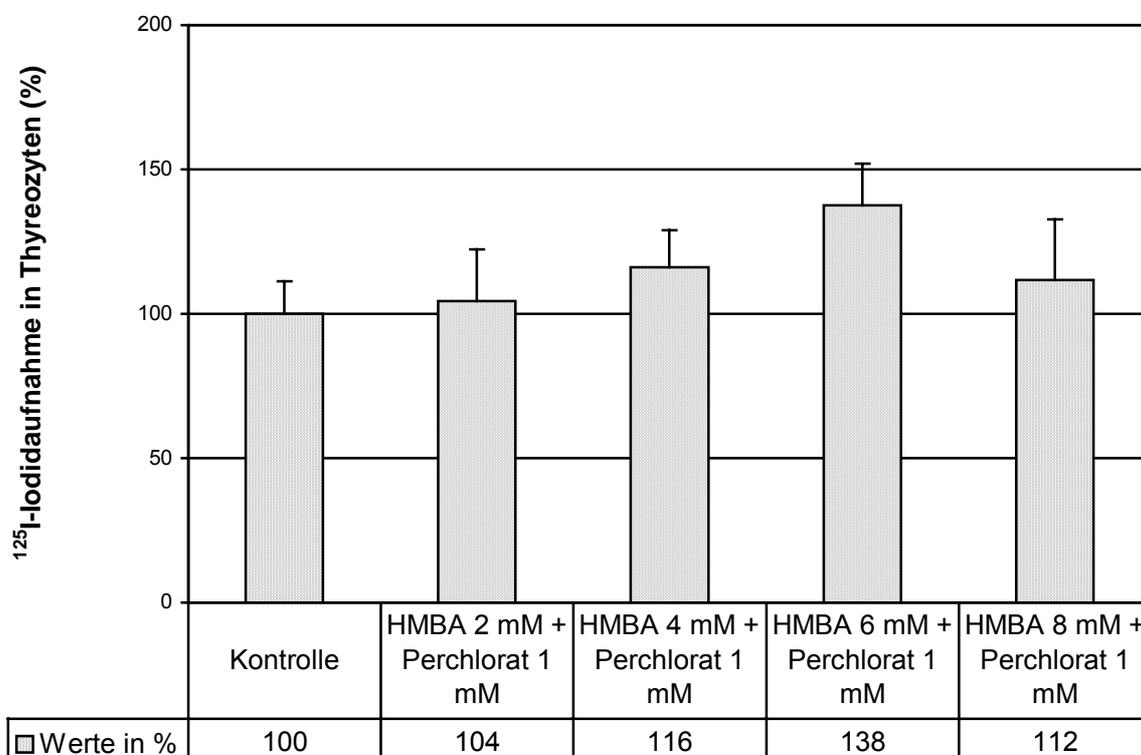


Abb. 13a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 13 normiert auf die Kontrolle

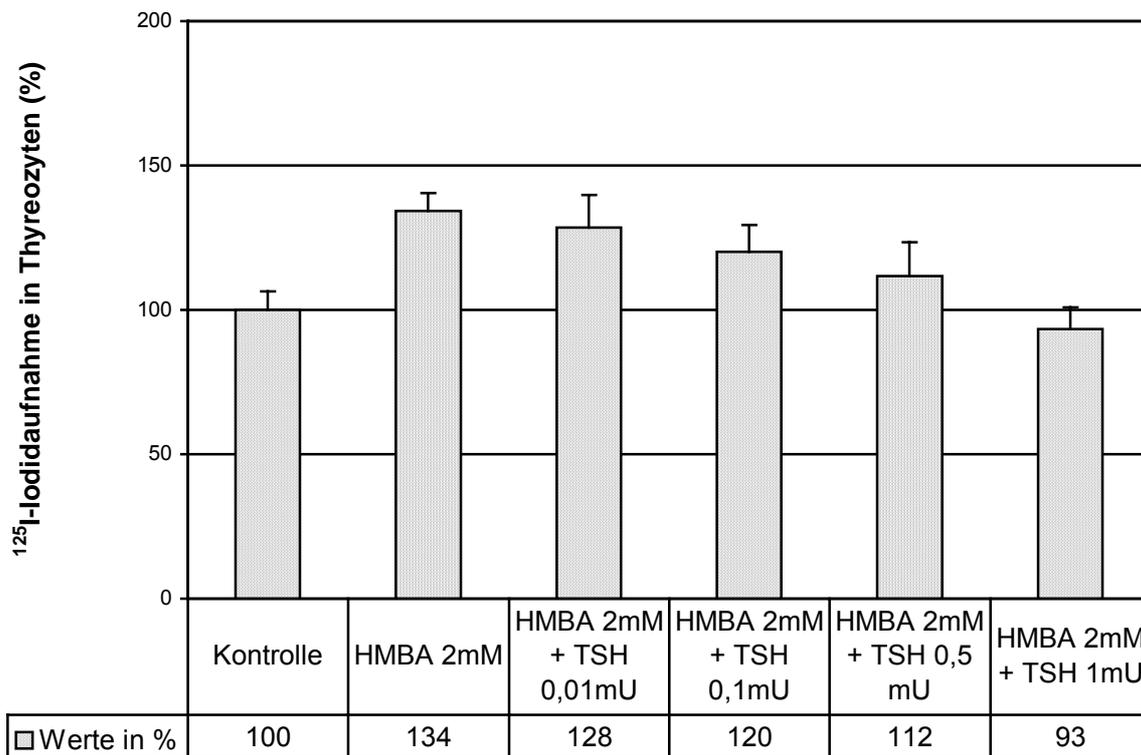


Abb. 14a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 14 normiert auf die Kontrolle

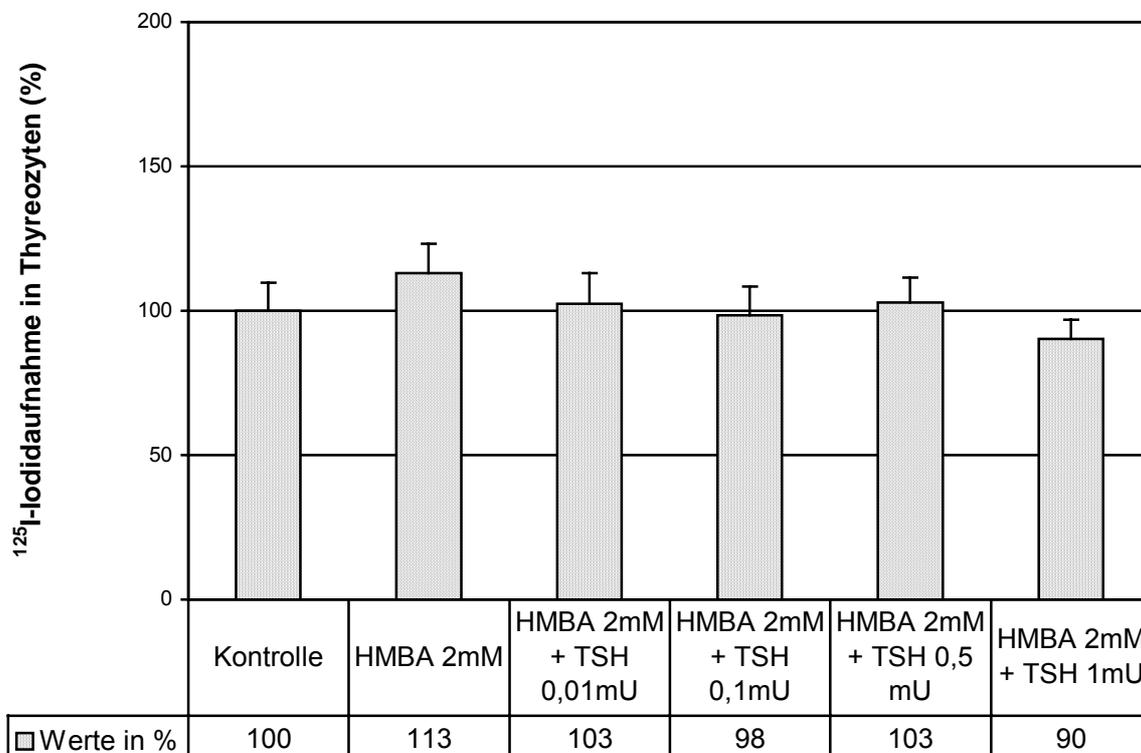


Abb. 15a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 15 normiert auf die Kontrolle

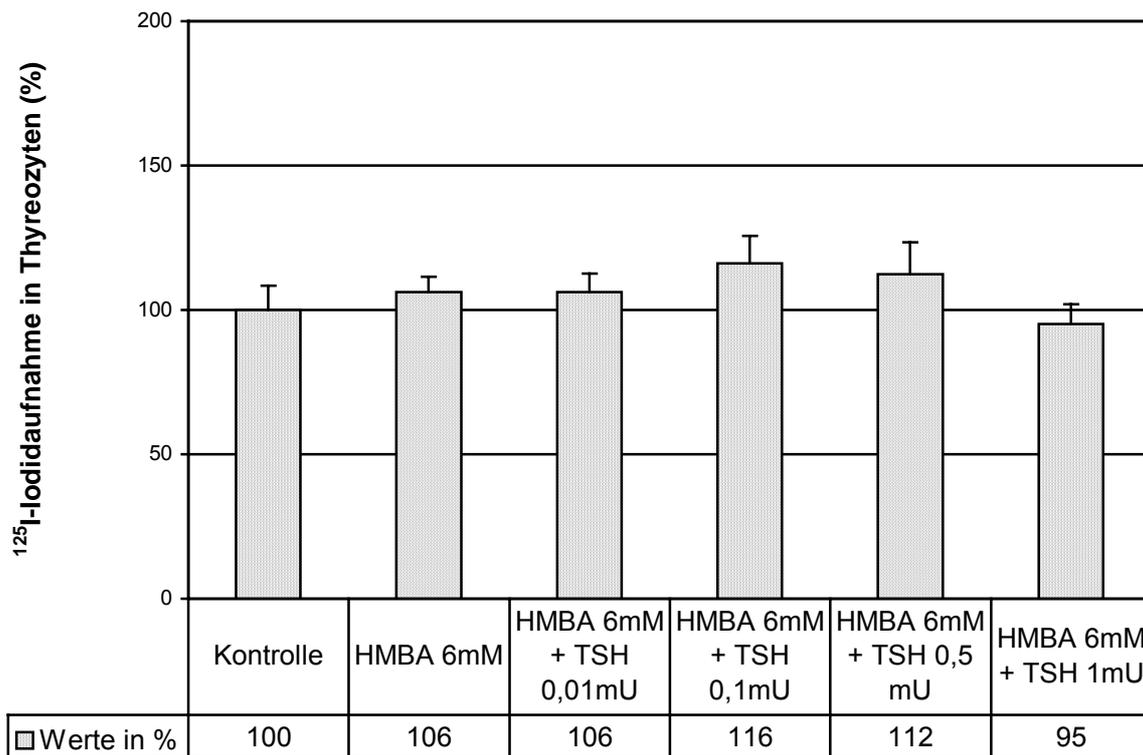


Abb. 16a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 16 normiert auf die Kontrolle

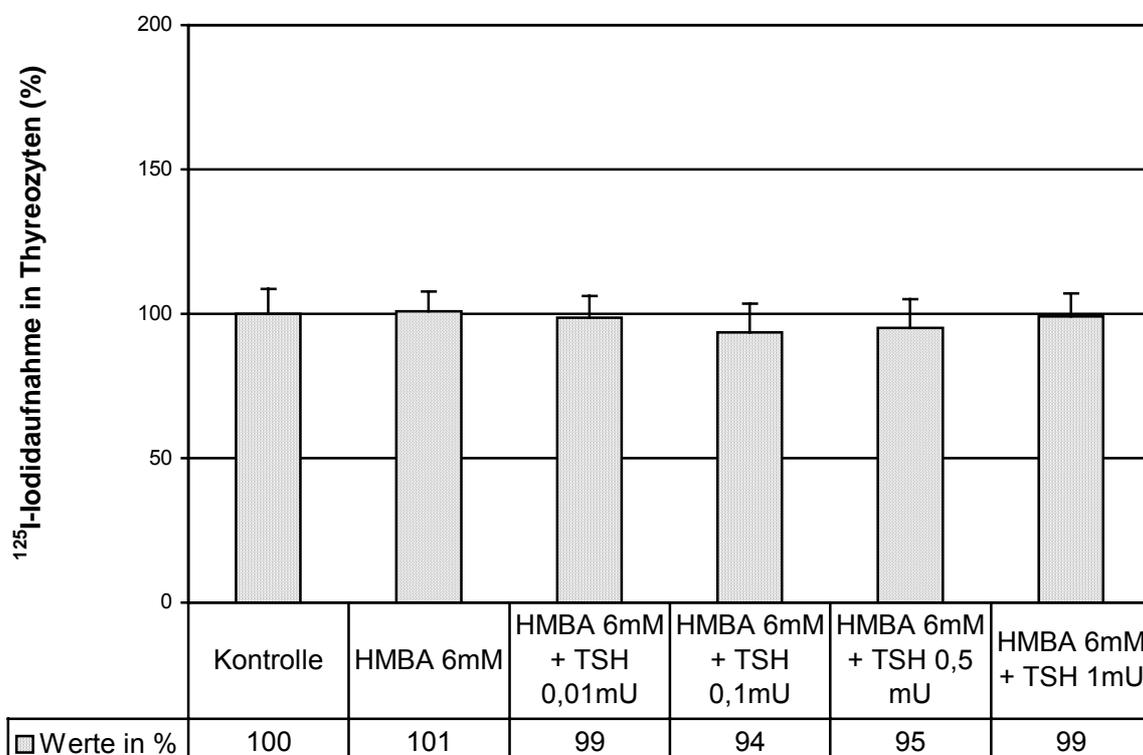


Abb. 17a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 17 normiert auf die Kontrolle

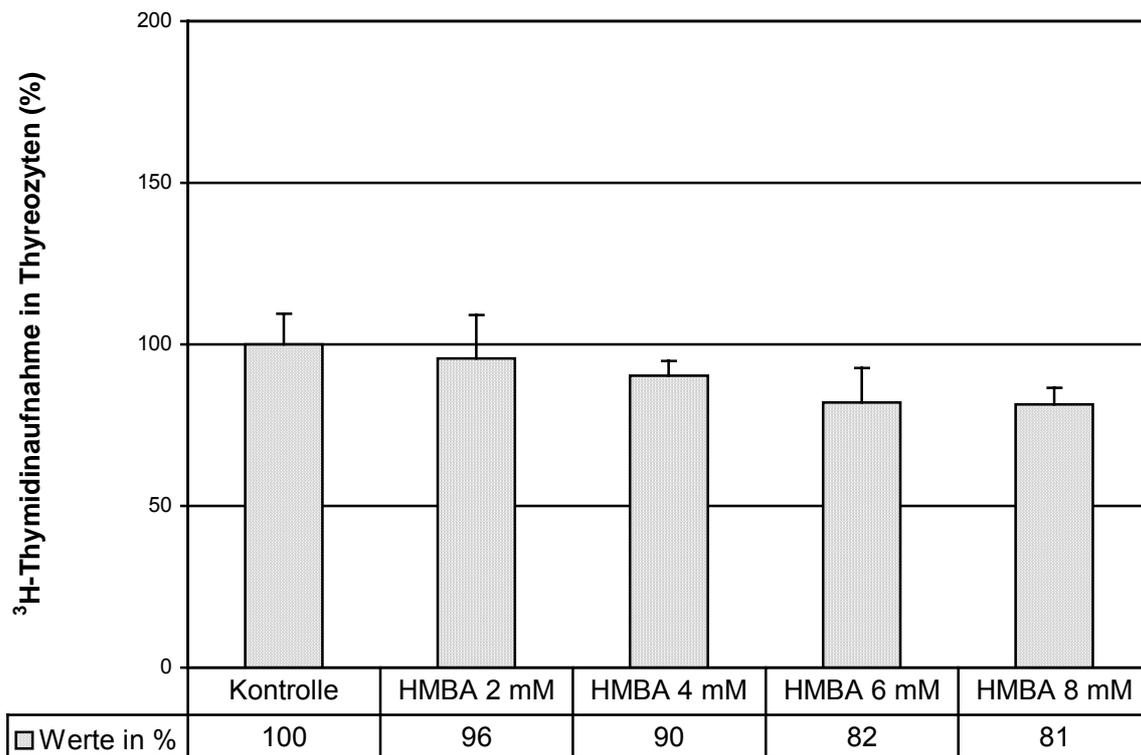


Abb. 18a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 18 normiert auf die Kontrolle

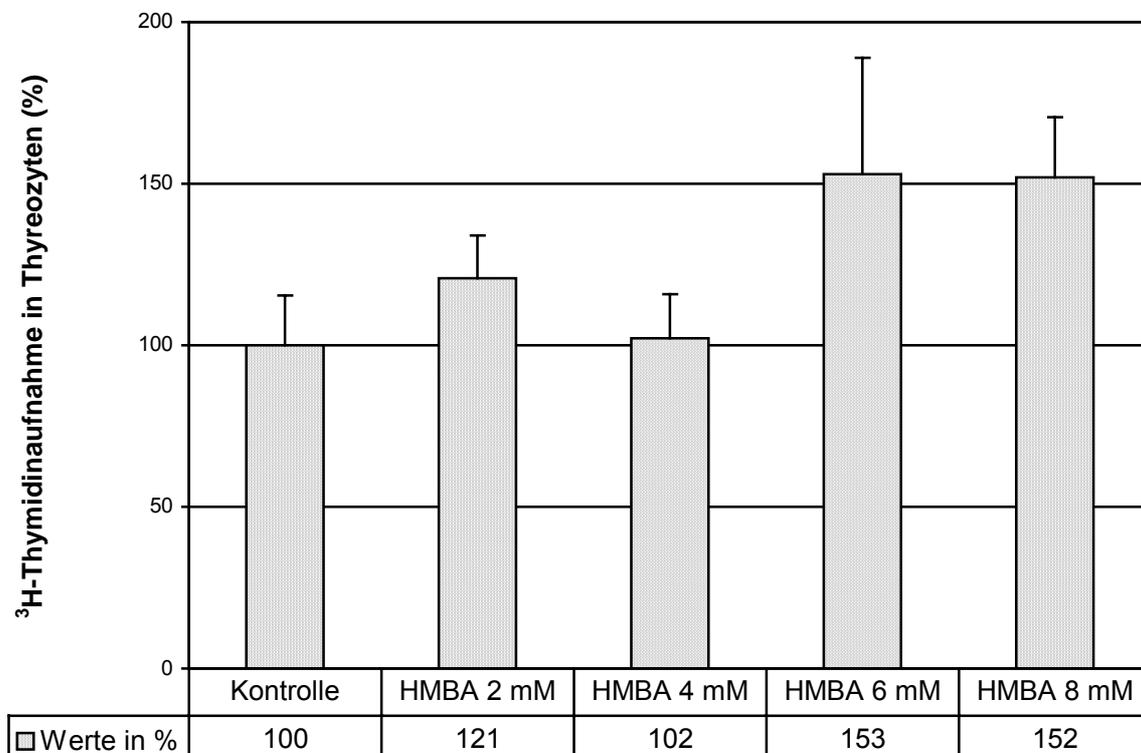


Abb. 19a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 19 normiert auf die Kontrolle

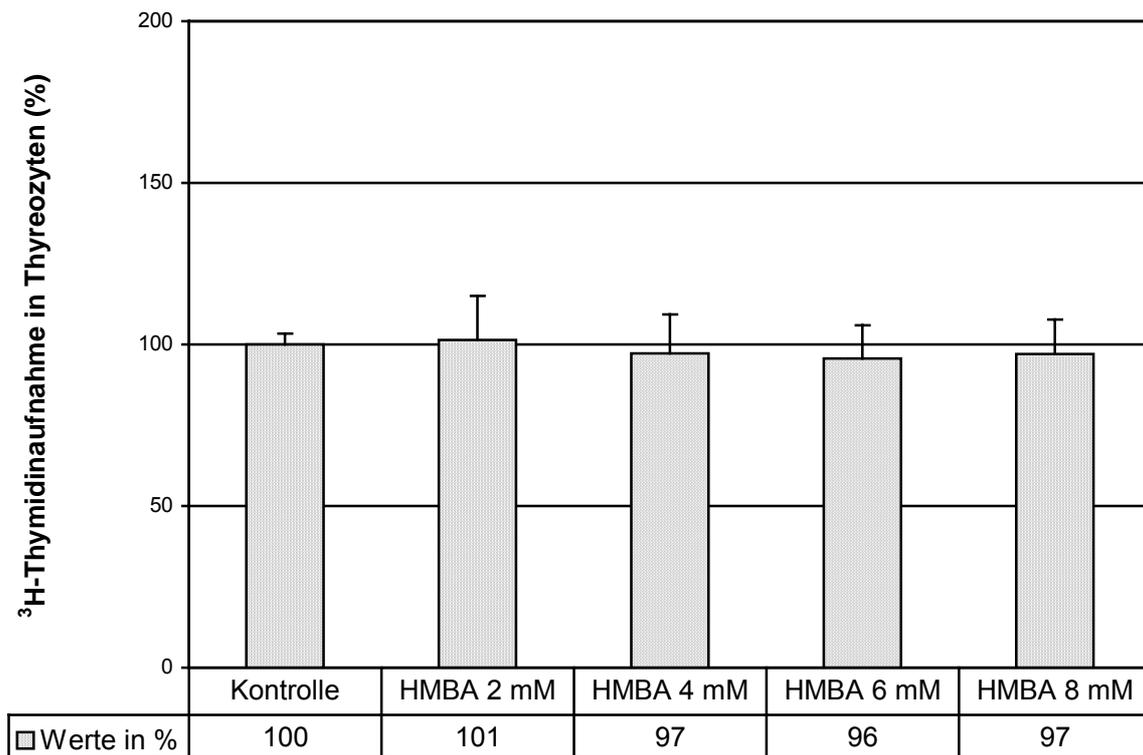


Abb. 20a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 20 normiert auf die Kontrolle

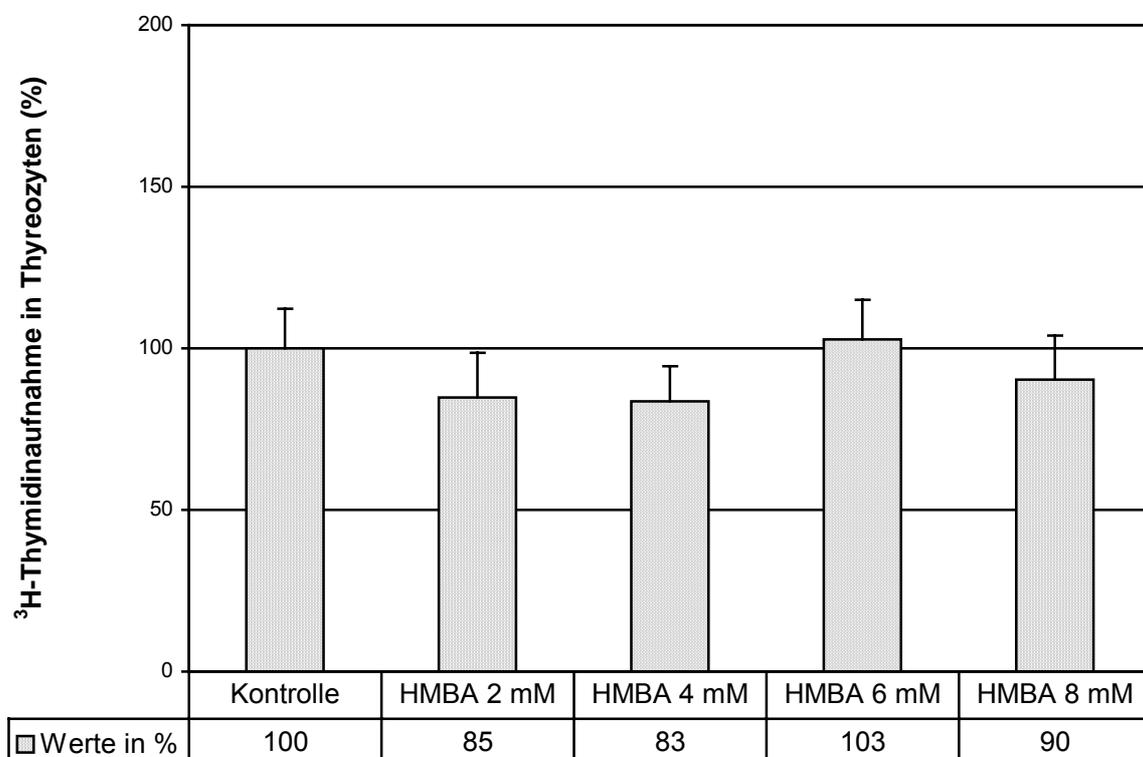


Abb. 21a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 21 normiert auf die Kontrolle

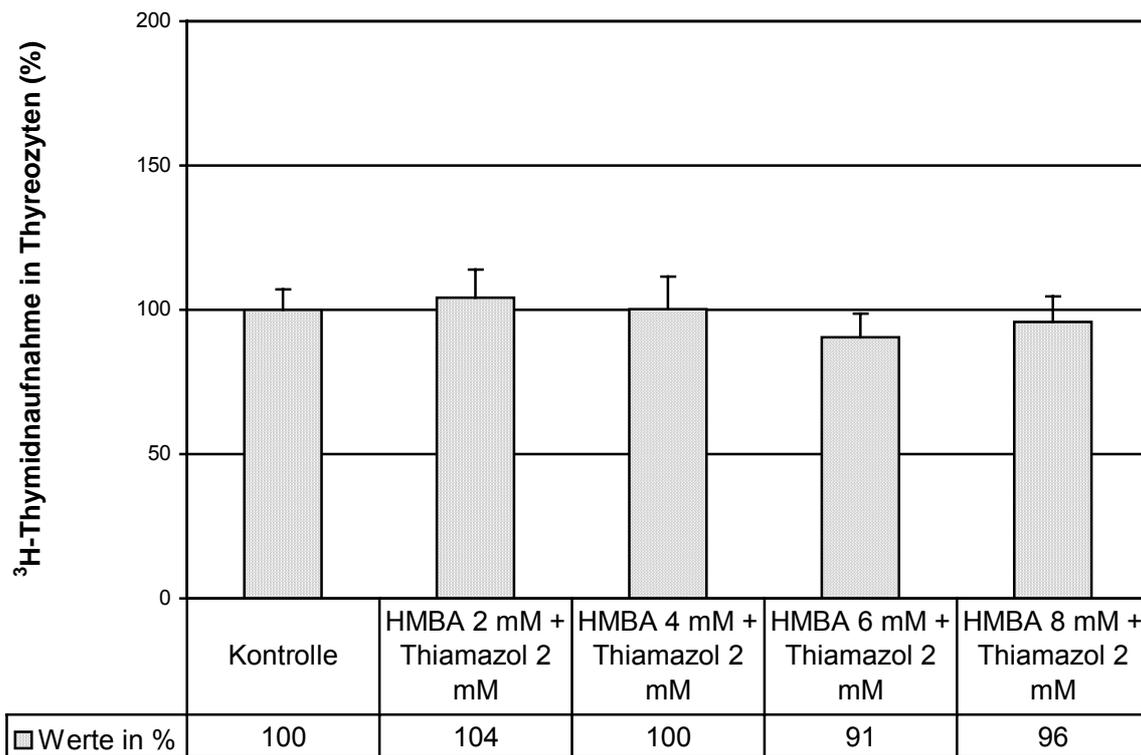


Abb. 22a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 22 normiert auf die Kontrolle

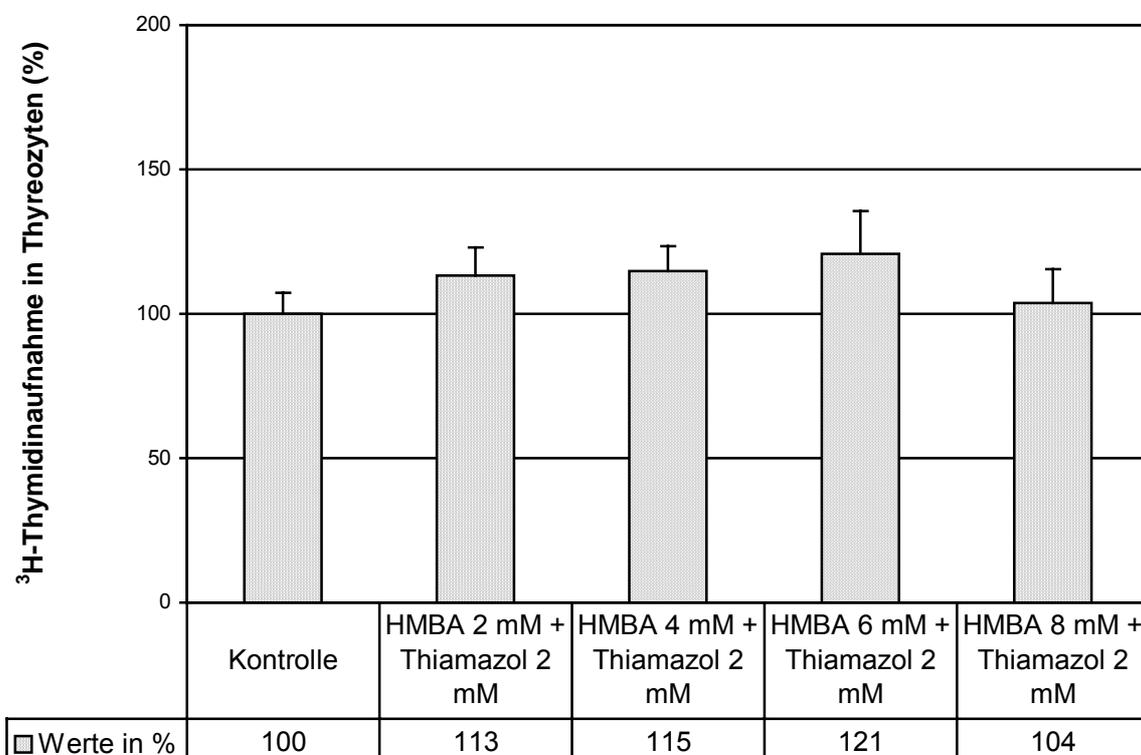


Abb. 23a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 23 normiert auf die Kontrolle

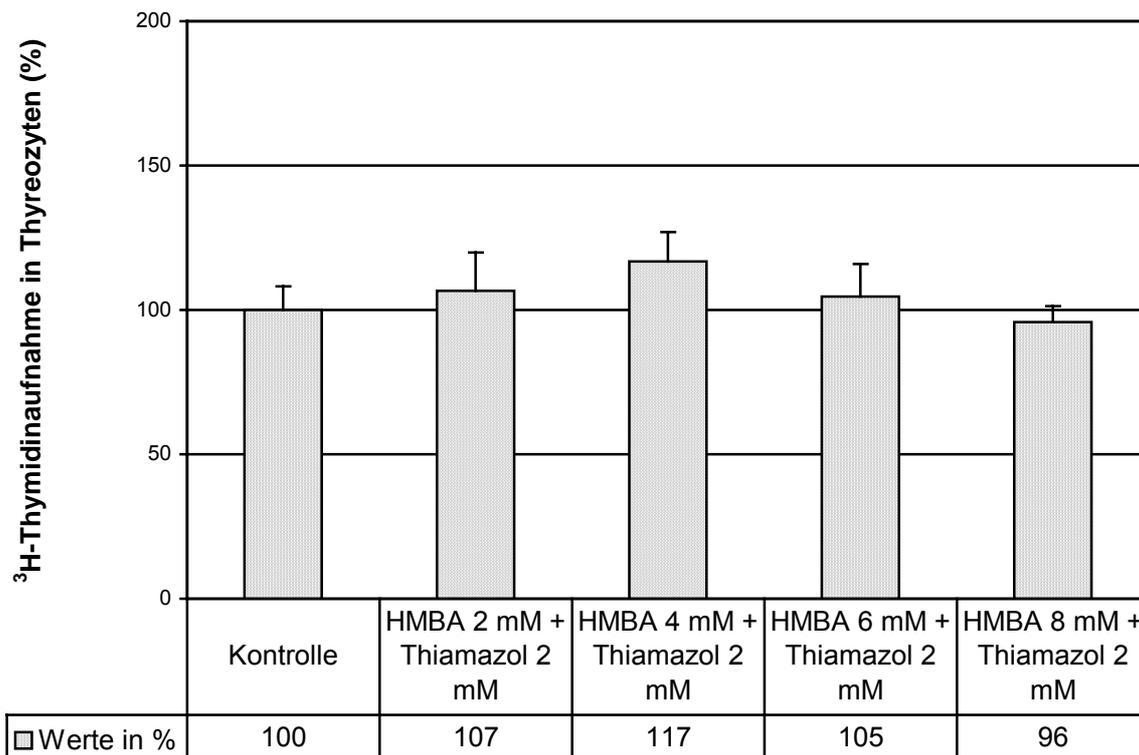


Abb. 24a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 24 normiert auf die Kontrolle

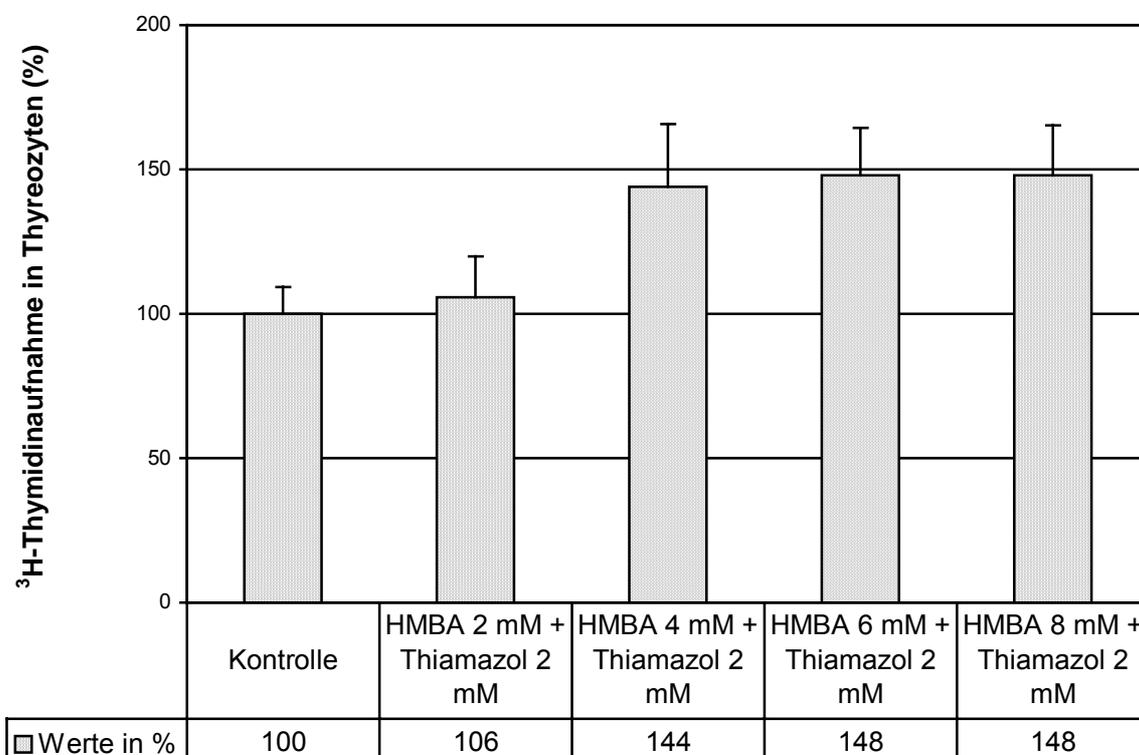


Abb. 25a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 25 normiert auf die Kontrolle

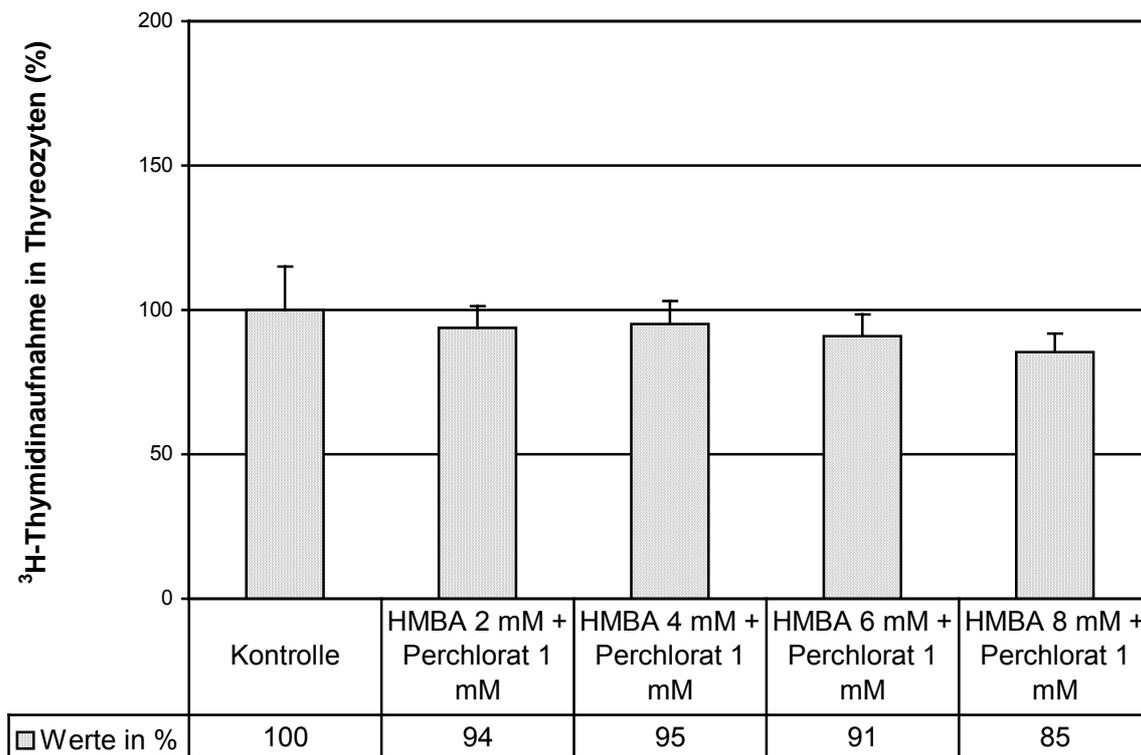


Abb. 26a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 26 normiert auf die Kontrolle

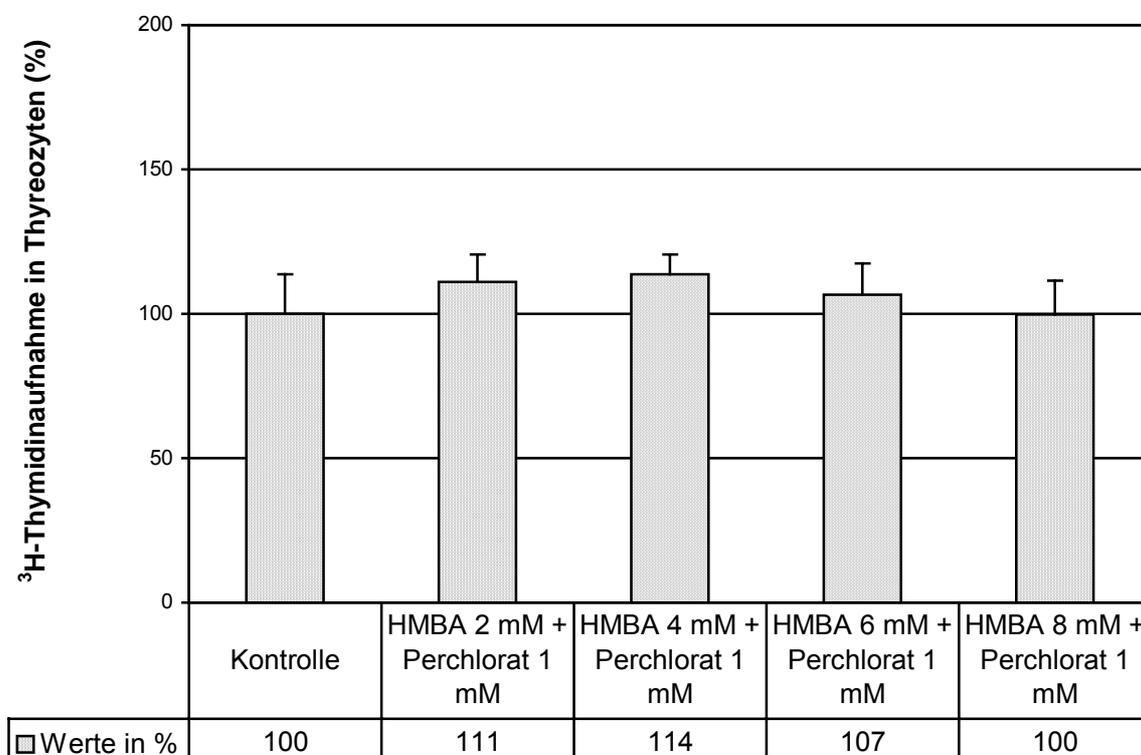


Abb. 27a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 27 normiert auf die Kontrolle

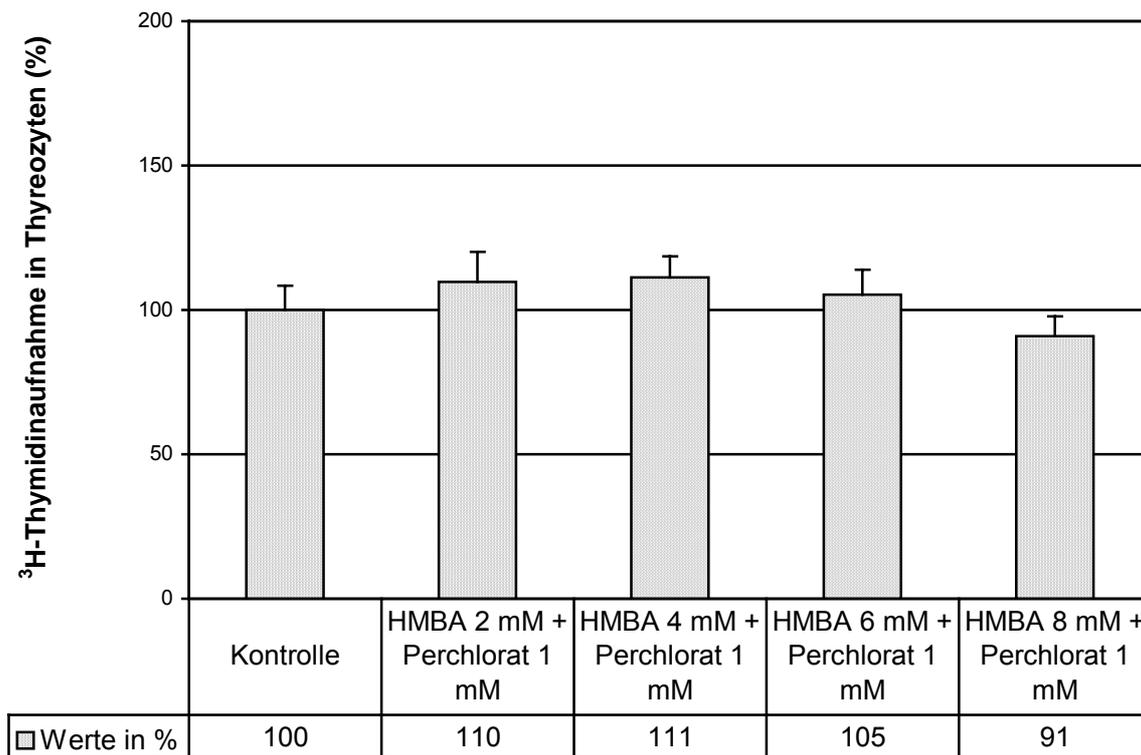


Abb. 28a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 28 normiert auf die Kontrolle

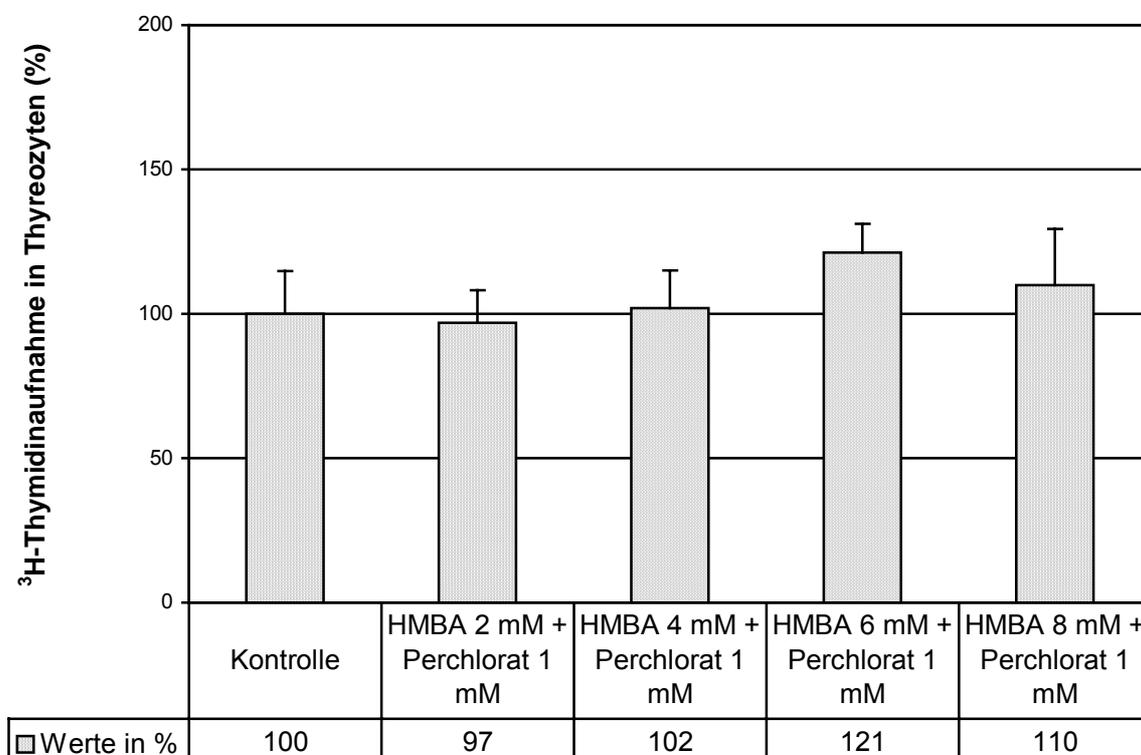


Abb. 29a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 29 normiert auf die Kontrolle

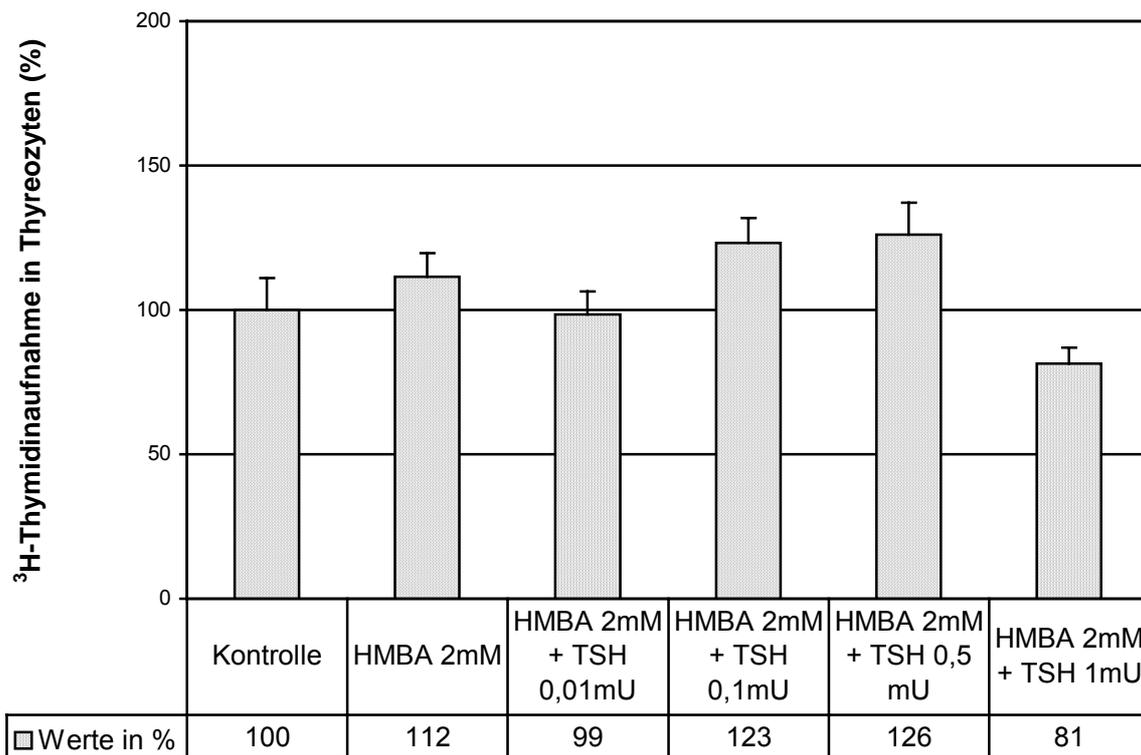


Abb. 30a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 30 normiert auf die Kontrolle

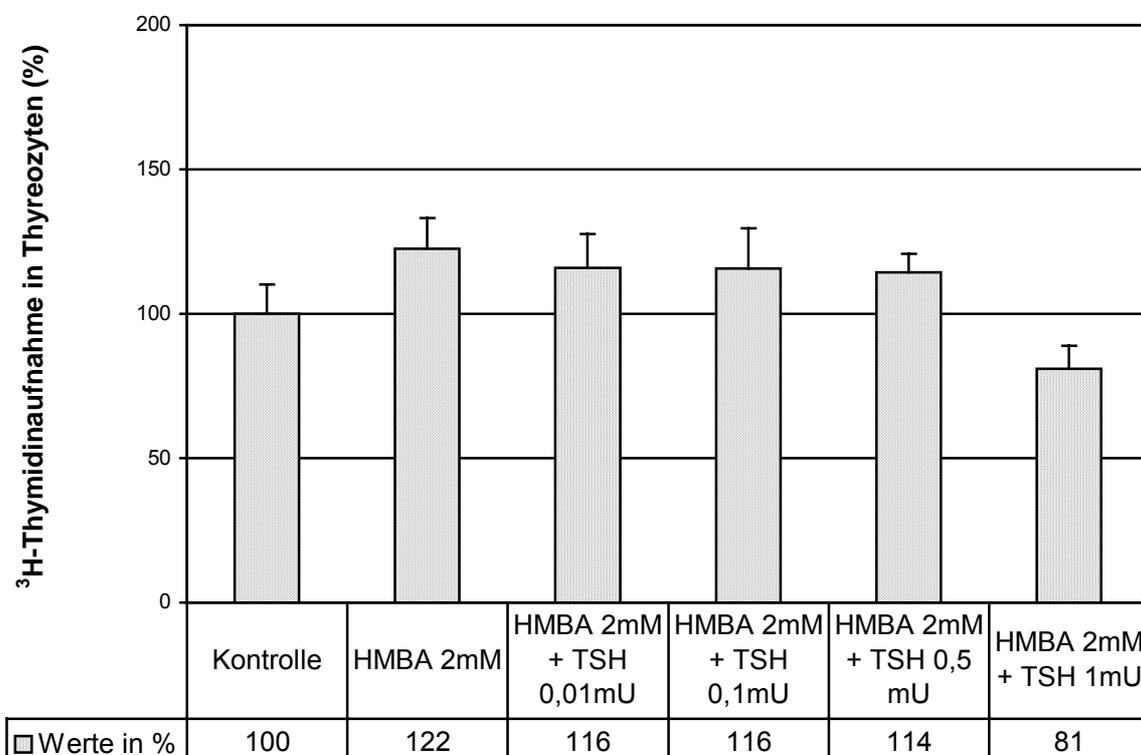


Abb. 31a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 31 normiert auf die Kontrolle

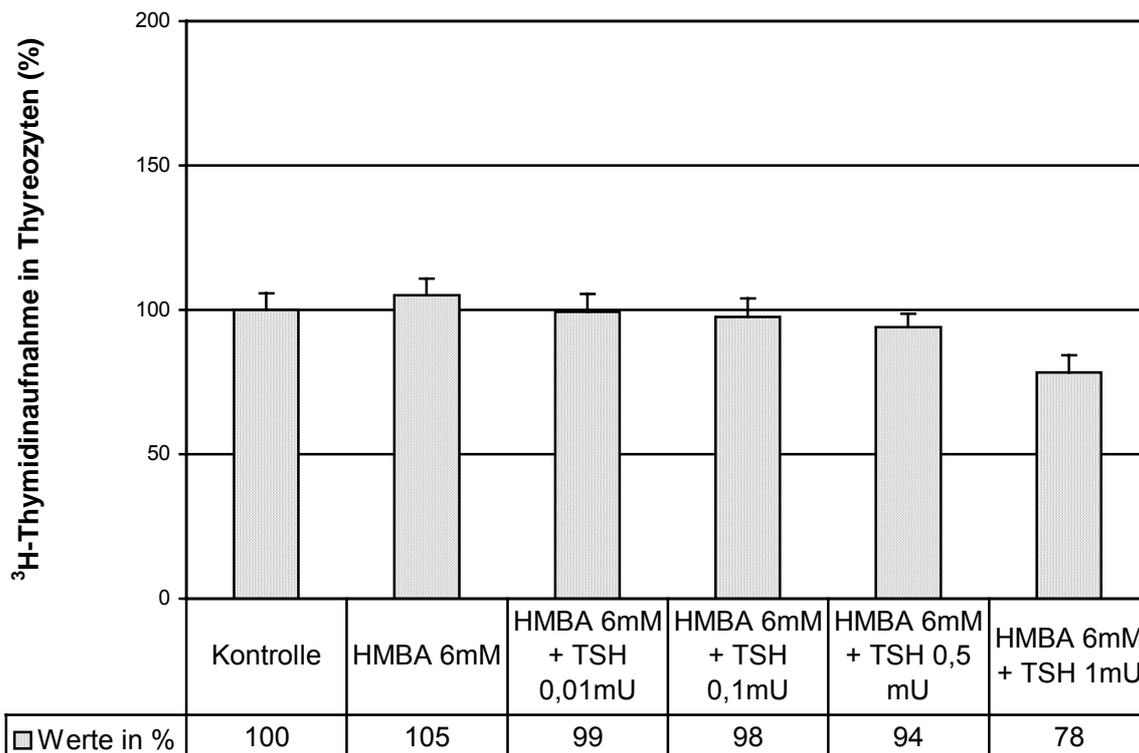


Abb. 32a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 32 normiert auf die Kontrolle

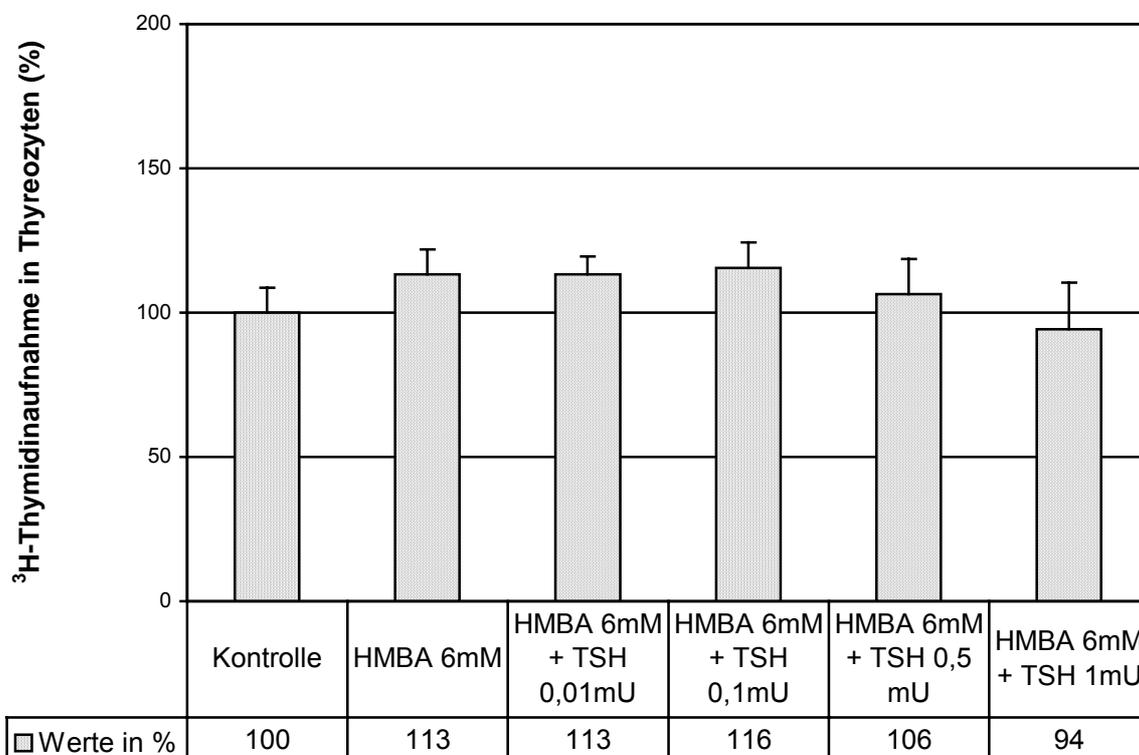


Abb. 33a: Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 33 normiert auf die Kontrolle

7. Literatur

- AMPHOUX-FAZEKAS, T.; FAYET, G. ; HOVSEPIAN, S.; AOUANI, A.; SAMIH, N. (1997)**
Hexamethylene bisacetamide (HMBA) prevents the loss of TSH-sensitivity in porcine thyroid monolayer cell.
C. R. Acad. Sci. Paris **320**, 1-11
- AMPHOUX-FAZEKAS, T.; FAYET, G. ; HOVSEPIAN, S.; AOUANI, A.; SAMIH, N. (1997)**
Hexamethylene bisacetamide (HMBA) induces follicle formation, prevents the loss in cell-TSH sensitivity but inhibits iodide metabolism and decreases cell protein levels in porcine thyroid cells.
J. Endocrinol. Invest. **20** (Suppl.), 42
- AMPHOUX-FAZEKAS, T.; SCHULTE, K-M.; GORETZKI, P.; RÖHER, H-D.; HOVSEPIAN, S.; FAYET, G. (1999)**
Hexamethylene bisacetamide (HMBA) and retinoic acid (RA), two putative inducers of differentiation in anaplastic and papillary human cancer thyroid cells. In vitro studies on mRNA expression of the sodium/iodide symporter (NIS) and TSH-receptor (TSH-R).
J. Endocrinol. Invest. **22**, 67
- ARAI, M.; TSUSHIMA, T.; ISOZAKI, O.; DEMURA, H.; SHIZUME, K.; EMOTO, N.; MIYAKAWA, M.; NOZOE, Y.; MURAKAMI, H.; OHMURA, E. (1995)**
Effects of transforming growth factor alpha (TGF-alpha) on DNA synthesis and thyrotropin-induced iodine metabolism in cultured porcine thyroid cells.
Eur J Endocrinol. **132**(2), 242-8
- ARREBOLA, F.; ZABITI, S.; CANIZARES, F.J.; CUBERO, MA.; CRESPO, PV.; FERNANDEZ-SEGURA, E. (2005)**
Changes in intracellular sodium, chlorine, and potassium concentration in staurosporine-induced apoptosis.
J. Cell. Physiol. **16**, 234-245
- BECHTNER, G.; SCHOPOHL, D.; RAFFERZEDER, M.; GARTNER, R.; WELSCH, U. (1996)**
Stimulation of thyroid cell proliferation by epidermal growth factor is different from cell growth induced by thyrotropin or insulin-like growth factor I.
Eur. J. Endocrinol. **134**, 639-48
- BRESLOW, R.; JURSIĆ, B.; FAYAN, Z.; FREIDMAN, E.; LENG, L.; NGO, L.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA. (1991)**
Potent cytodifferentiating agents related to hexamethylenebisacetamide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**, 5542-5546
- DAVIES, TF.; PLATZER, M.; SCHWARTZ, AE.; FRIEDMAN, EW. (1985)**
Short- and long-term evaluation of normal and abnormal human thyroid cells in monolayer culture.
Clin. Endocrinol. **23**, 469-479

- DEL SENNO, L.; ROSSI, R.; GANDINI, D.; PIVA, R.; FRANCESCHETTI, P.** (1993)
Retinoic acid induced decrease of DNA synthesis and peroxidase mRNA levels in human thyroid cells expressing retinoic acid receptor alpha mRNA.
Life Sci. **53**, 1039-1043
- DREXHAGE, HA.; BOTTAZZO, GF.; DONIACH, D.; BITENSKY, L.; CHAYEN, J.** (1980)
Evidence for thyroid-growth-stimulating immunoglobulins in some goitrous thyroid disease.
Lancet **2**, 287-292
- DUDEL, J.** (1990)
Grundlagen der Zellphysiologie, 16-19
In: Schmidt, R.F., Thews, G.: *Physiologie des Menschen*
Springer, Berlin, Heidelberg, New York, **24.** Aufl.
- DUMONT, JE.; MAENHAUT, C.; PIRSON, I.; BAPTIST, M.; ROGER, PP.** (1991)
Growth factors controlling the thyroid gland.
Baillieres Clin Endocrinol Metab. **5**(4), 727-54
- EGGO, MC.; BURROW, GN.** (1979)
Synthesis, membrane insertion of thyroglobulin in a completely heterologous system.
Biochem. **86**(4), 1069-1076
- EGGO, MC.; BACHRACH, LK.; FAYET, G.; ERRICK, JE.; KUDLOW, JE.; COHEN, MF.; BURROW, GN.** (1984)
The effects of growth factors and serum on DNA synthesis and differentiation in thyroid cells in culture.
Mol. Cell. Endocrinol. **38**, 141-150
- EGORIN, MJ.; SNYDER, SW.; COHEN, AS.; ZUHOWSKI, EG.; SUBRAMANYAM, B.; CALLERY, PS.** (1988)
Metabolism of hexamethylene bisacetamide and its metabolites in leukemic cells.
Cancer Res. **48**(7), 1712-1716
- EVAIN-BRION, D.; RAYNAULD, F.; TOURNIER, S.; PLET, A.; ANDERSON, WB.** (1991)
Retinoic acid and cellular signal transduction.
In: Saurat H-J, *Retinoids: 10 years on.*
Karger, Basel, 46-55
- FAYET, G.; AMPHOUX-FAZEKAS, T.; AOUANI, A.; HOVSEPIAN, S.** (1996)
Hexamethylene bisacetamide (HMBA) is a growth factor for human, ovine and porcine thyroid monolayer cells.
Mol. Cell Endocrinol. **117**, 111-116
- FAYET, G.; HOVSEPIAN, S.** (1979)
Demonstration of growth in porcine thyroid cell culture.
Biochemie. **61**, 923-930
- FIBACH, E.; REUBEN, RC.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA.** (1977)
Effect of hexamethylenebisacetamide on the commitment to differentiation of murine erythroleukemia cells.
Cancer Res. **37**, 440-444

- FRIEND, C.; SCHER, W.; HOLLAND, JG.; SATO, T. (1971)**
Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **68**, 378-382
- FRÖHLICH, E.; WAHL, R. (1999)**
Effects of retinol on follicular porcine thyrocytes in culture.
J Mol Med. **77**(1): 189-92
- FRÖHLICH, E.; WAHL, R.; REUTTER, K. (1995)**
Basal lamina formation by porcine thyroid cells grown in collagen- and laminin-deficient medium.
Histochem J. **27**(8): 602-8
- FRÖHLICH, E.; WITKE, A.; CZARNOCKA, B.; WAHL, R. (2004)**
Retinol has specific effects on binding of thyrotrophin to cultured porcine thyrocytes.
Eur J Endocrinol. **183**, 617-626
- GÄRTNER, R. (1992)**
Thyroid growth in vitro.
Exp. Clin. Endocrinol. **100** (1-2), 32-35
- GÄRTNER, R. (1993)**
Growth factors of the thyroid.
Exp. Clin. Endocrinol. **101**, 83-91
- GÄRTNER, R.; GREIL, W.; DEMHARTER, R.; HORN, K. (1985)**
Involvement of cyclic AMP, iodide and metabolites of arachidonic acid in the regulation of cell proliferation of isolated porcine thyroid follicles.
Mol. Cell. Endocrinol. **42**, 145-155
- GAZITT, Y.; REUBEN, RC.; DEITCH, AD.; MARKS, PA.; RIFKIND, RA. (1978)**
Changes in cAMP levels during induction of differentiation in murine erythroleukemia cells.
Cancer Res. **38**, 3779-3783
- GORETZKI, PE.; KOOB, R.; KOLLER, C.; ROHER, HD. (1987)**
Thyrotropin (TSH) stimulates cell growth and DANN synthesis in monolayer cultures of human thyrocytes independent of the adenylate-cyclase system.
Acta Endocrinol (Copenh) Suppl **281**, 273-280
- GREIL, W.; GÄRTNER, R.; DEMHARTER, R.; HORN, K. (1985)**
Thyrtroponin is not a growth factor for porcine thyroid cells in vitro.
Acta Endocrinol. Suppl. **267**, Abstract 85
- GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; BUCHAN, G.; SADEGHI, R.; KISSONERGHIS, M.; LONDEI, M.; TURNER, M.; PIRICH, K.; ROKA, R.; NIEDERLE, B.; KASSAL, H. ET AL. (1989)**
Transforming growth factor beta regulates thyroid growth. Role in the pathogenesis of nontoxic goiter.
J Clin Invest. **83**(3): 764-70
- HELDIN, N. A.; KARLSSON, F. A.; WESTERMARK, B. (1985)**
Inhibition of cyclic AMP formation by iodide in suspension cultures of porcine thyroid follicle cells.
Mol. Cell. Endocrinol. **41**, 61-67

- HOFBAUER, LC.;** RAFFERZEDER, M.; JANSSEN, OE. (1995)
Insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles is regulated by thyrotropin and iodine.
Eur J Endocrinol. **132**(5): 605-10
- IWATA, M.;** MUKAI, M.; NAKAI, Y.; ISEKI, S. (1992)
Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes.
Immunol. **149**, 3302-3308
- JOCKENHÖVEL, S.** (1993)
Fragen und Antworten zur Epidemiologie und Ätiologie der Struma.
Z. Ges. Inn. Med. **48**, 565-574
- KENNEDY, R.;** DAVIES, R.; METCALFE, R. (1988)
Interaction between insulin and thyrotropin (TSH) in cultured thyroid cells.
Clin. Sci. 75, Suppl. **19**, Abstr. 182
- KIYOKAWA, H.;** RICHON, VM.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA. (1994)
Suppression of cyclin-dependent kinase 4 during induced differentiation of erythroleukemia cells.
Mol. Cell. Biol. **14**, 7195-7203
- KRAIEM, Z.;** SADEH, O.; SOBEL, E. (1990)
Thyrotropin, acting at least partially via adenosine 3', 5'-monophosphate, exerts both mitogenic and antimitogenic effects in cultured human thyroid cells.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **70**, 497-502
- KRAIEM, Z.;** BOWERS, CY.; SOBEL, E.; LARON, Z. (1995)
Growth hormone (GH)-releasing heptapeptide, but not GH-releasing hormone, inhibits thyrotropin-stimulated thyroid hormone secretion and cAMP formation in cultured human thyroid follicles.
Eur J Endocrinol. **133**(1), 117-120
- LAWRENCE, JE.;** LAMM, SH.; PINO, S.; RICHMAN, K.; BRAVERMAN, LE. (2000)
The effect of short-term low-dose perchlorate on various aspects of thyroid function.
Thyroid. **10**, 659-663
- LÖFFLER, G.;** PETRIDES, P. (1998)
In: Biochemie und Pathobiochemie.
6. Auflage, Springer, S.208ff
- MANGELSDORF, D-J.;** KLIOWER, S-A.; KAKIZUKA, A.; UMESONO, R-M. (1992)
Retinoid receptors.
Recent progress in hormone research, 4899-5121
- MARKS, PA.;** BRESLOW, R.; RIFKIND, RA.; NGO, L.; SINGH, R. (1989)
Polar/apolar chemical inducers of differentiation of transformed cells: strategies to improve therapeutic potential.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **86**, 6358-6362
- MARKS, PA.;** RIFKIND, RA. (1984)
Differentiation modifiers.
Cancer **54**, 2766-2769

- MARKS, PA.; SHEFFERY, M.; RIFKIND, RA. (1987)**
Induction of transformed cells to terminal differentiation and the modulation of gene expression.
Cancer Res. **47**, 659-666
- MARTIN, J. (1994)**
Methodische und vergleichende Untersuchungen zum Wachstum von Schilddrüsen-Einzelzellen und Schilddrüsen-Follikeln.
Inaug. Dissertation, Universität Tübingen
- MICHAELI, J.; BUSQUETS, X.; ORLOW, I.; YOUNES, A.; COLOMER, D.; MARKS, PA.; RIFKIND, RA.; KOLESNICK, RN. (1992)**
A rise and fall in 1,2-diacylglycerol content signal hexamethylene bisacetamide induced-erythropoiesis.
J. Biol. Chem. **267**, 23463-23466
- NAGY, L.; THOMAZY, V.A.; SHIPLEY, G.; FESUS, L.; LAMPH, W.; HEYMAN, R. (1995)**
Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL.60 cell lines.
Mol. Cell. Biol. **15**, 3540-3551
- NITSCH, L.; WOLLMAN, S. (1980)**
Thyrotropin preparations are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **77**, 2743-2747
- O'CONNOR, MK.; MALONE, JF.; CULLEN, MJ. (1980)**
Longterm cultures of sheep thyroid cells.
Acta. Endocrinol. (Copenh) **93**, suppl 231, 5-43
- OLLIS, CA.; DAVIES, R.; MUNRO, DS.; TOMLINSON, S. (1986)**
Relationship between growth and function of human thyroid cells in culture.
J. Endocrinol. **108**, 393-398
- PESSINO, A.; PASSALACQUA, M.; SPARATORE, B.; PATRONE, M.; MELLONI, E.; PONTREMOLI, S. (1995)**
Antisense oligonucleotide inhibition of protein kinase C expression accelerates induced differentiation of murine erythroleukaemia cells.
Biochem. J. **312**, 549-554
- PETRICH, T.; KNAPP, WH.; POTTER, E. (2003)**
Functional activity of human sodium/iodide symporter in tumor cell lines.
Nuklearmedizin. **42**, 15-18
- PISAREV, MA.; CHAZENALK, GD.; VALSECCHI, RM.; BURTON, G.; KRAWIEC, L.; MONTAGUDO, E.; JUVENAL, GJ.; BOADO, RJ.; CHESTER, HA. (1988)**
Thyroid autoregulation. Inhibition of goiter growth and cyclic AMP formation in rat thyroid by iodinated derivatives of arachidonic acid.
J. Endocrinol. Invest. **11**, 669-674
- REUBEN, RC. (1979)**
Studies on the mechanism of action of hexamethylene bisacetamide, a potent inducer of erythroleukemic differentiation.
Biochem. Biophys. Acta. **588**, 310-321
- REUBEN, RC.; KHANNA, PL.; GAZITT, T.; BRESLOW, R.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA. (1978)**

- Inducers of erythroleukemic differentiation.
J. Biol. Chem. **253**, 4214-4218
- REUBEN**, RC.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA. (1980)
Chemically induced erythroleukemia differentiation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. **605**, 325-346
- REUBEN**, RC.; WIFE, RL.; BRESLOW, R.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA. (1976)
A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 862-866
- RICHON**, VM.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA. (1992)
Expression of phosphorylation of the retinoblastoma protein during induced differentiation of murine erythroleukemia cells.
Cell. Growth. Differ. **3**, 413-420
- ROGER**, PP.; DUMONT JE. (1983)
Thyrotropin and the differential expression of proliferation and differentiation in dog thyroid cells in primary culture.
J. Endocrinol. **96**, 241-249
- ROGER**, PP.; DUMONT JE. (1983)
Thyrotropin and the differential expression of proliferation and differentiation in dog thyroid cells in primary culture.
J. Endocrinol. Metab. **66**, 1158-1165
- ROGER**, PP.; TATAN, T.; SANDE, J. VAN; DUMONT JE. (1988)
Mitogenic effects of thyrotropin and adenosine 3', 5'-monophosphate in differentiated normal human thyroid cells in vitro.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **43**, 1120-1135
- ROGER**, PP.; DUMONT JE. (1995)
Thyrotropin-dependent insulin-like growth factor I mRNA expression in thyroid cells
Eur. J. Endocrinol. **132**(5), 601-2
- ROUSSET**, B.; PONCET, C.; DUMONT, JE.; MORNEX, R. (1980)
Intracellular and extracellular sites of iodination in dispersed hog thyroid cells.
Biochem. J. **192**, 801-812
- SCHMUTZLER**, C.; KOHRLE, J. (2000)
Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer.
Thyroid **10**, 393-406
- SCHRECK**, R.; SCHNIEDERS, F.; SCHMUTZLER, C.; KÖHRLE, J. (1994)
Retinoids stimulate type I 5'-deiodase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines.
J. Endocrinol. Metab. **79**, 791-798
- SIEGEL**, DS.; ZHANG, X.; FEINMAN, R.; TEITZ, T.; ZELENETZ, A.; RICHON, VM.; RIFKIND, RA.; MARKS, PA.; MICHAELI, J. (1998)
Hexamethylene bisacetamide induces programmed cell death (apoptosis) and down-regulates BCL-2 expression in human myeloma cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**(1), 162-6
- SIMKINS**, S. (1947)
Use of massive dosis of vitamin A in the treatment of hyperthyreodism.
J. Clin. Endocrinol. Metab. **7**, 574-584

- SIMON, D.; KOHRLE, J.; SCHMUTZLER, C.; MAINZ, K.; REINERS, C; ROHER, 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
- SMITH, P.; WILLIAMS, E.; WYNFORD-THOMAS, D. (1987)**
In vitro demonstration of TSH-specific growth desensitising mechanism in rat thyroid epithelium.
Mol. Cell. Endocrinol. **51**, 51-58
- SUCOV, H-M.; EVANS, R-M. (1995)**
Retinoic acid and retinoic receptors in development.
Mol. Neurobiol. **10**(1-2), 169-184
- TANIGUSHI, S.; YOSHIDA, A.; MASHIBA, M. (1989)**
Direct effect of methimazole on rat thyroidal cell growth induced by thyrotropin and insuline-like growth factor I.
Endocrinology **124**, 2046-2051
- THOMAS, JA.; KENNAN, EJ. (1986)**
Thyroid and antithyroidal drug.
In: Principles of Endocrine Pharmacology.
Hrsg. Thomas, JA.; Keenan, EJ.
Plenum Medical Book Company NY, London Kap. 4: 69-91
- TRAMONTANO, D.; MOSES, A.; PICONE, R.; INGBAR, S. (1987)**
Characterization and regulation of the receptor for insulin-like growth factor-I in the FRTL-5 rat thyroid follicular cell line.
Endocrinology **120**, 785-790
- URABE, M. (1989)**
The study of direct effect of methimazole on thymidine incorporation in FRTL-5 cells.
Nippon Naibunpi gakkai Zasshi **65**, 32-41
- WAHL, R. (1991)**
Morphologische und biochemische Untersuchungen an der Schilddrüsenzellkultur.
Theorie und Forschung, Bd. **161**; Roderer, Regensburg
- WATANABE, Y.; AMINO, N.; TAMAKI, H.; IWATANI, Y.; MIYAI, K. (1985)**
Bovine thyrotropin inhibits DNA synthesis inversely with stimulation of cyclic AMP production in cultured porcine thyroid follicles.
Endocrinol. Jpn. **32**, 81-88
- WESTERMARK, B.; KARLSSON, FA.; WALINDER, O. (1979)**
Thyrotropin is not a growth factor for human thyroid cells in culture.
Proc. Natl. Acad. Sci. **76**, 2022-2026
- WU, Y.; GADINA, M.; TAO-CHANG, J-H.; YOULE, RJ. (1994)**
Retinoic acid disrupts the Golgi apparatus and increases the cytosolic routing of specific protein toxins.
J. Cell. Biol. **125**, 743-753
- WYNFORD-THOMAS, D.; SMITH, P.; WILLIAMS, E. (1987)**
Proliferative response to cyclic AMP elevation of thyroid epithelium in suspension culture.
Mol. Cell. Endocrinol. **51**, 163-166

YAMAMOTO-YAMAGUCHI, Y.; OKABE-KADO, J.; KASUKABE, T.; HONMA Y. (2003)

Induction of apoptosis by combined treatment with differentiation-inducing agents and interferon-alpha in human lung cancer cells.

Anticancer Res. **23**(3B), 2537-47

YAMASHITA, T.; WAKAO, H.; MIYAJIMA, A.; ASANO, S. (1998)

Differentiation inducers modulate cytokine signaling pathways in a murine erythroleukemia cell line.

Cancer. Res. **58**(3), 556-561

YU, H.; LU, H.; ZHENG, B.; FAN, H.; XIE, Y. (2002)

Effect of hexamethylene bisacetamine on proliferation and apoptosis of human leukemia cells in vitro and relevant mechanisms.

Zhonghua Yi Xue Za Zhi. **82**(8), 549-552

ZHANG, O.; MILLS, KJ.; DAWSON, MI.; COLLINS, SJ.; JETTEN, AM. (1995)

Evidence of the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-dependent signaling pathway in the induction of tissue transglutaminase and apoptosis by retinoids.

J. Biol. Chem. **270**, 6022-6029

Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. R. Wahl für die Überlassung des Themas. Herr Professor Wahl stand mir immer mit gutem Rat und kritischer Anmerkung zur Seite.

Für die unschätzbare Hilfe von Frau Inge Fink im Isotopenlabor bin ich sehr dankbar.