

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin IV**

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

**Der Einfluss von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure, Methanol und  
TSH unter verschiedenen Kulturbedingungen  
auf den <sup>125</sup>I-Stoffwechsel von kultivierten Thyreozyten  
und deren RAR $\alpha$ - und RXR $\alpha$ -Rezeptoren**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Zahnheilkunde**

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

**vorgelegt von**

**CHRISTINE BEYER**

**aus**

**Neustadt / Aisch**

**2004**

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Wahl
2. Berichterstatter:	Privatdozentin Dr. E. Fröhlich

**Meinen lieben Eltern gewidmet**



## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	- Abbildung
AP	- alkalische Phosphatase
APL	- akute Promyelozytenleukämie
Bq	- Becquerel, 1 Zerfall pro Sekunde
kBq	- Kilo-Becquerel
CPM	- counts per minute
DPM	- desintegrations per minute
EGF	- epidermal growth factor
Excel	- Statistikprogramm von Microsoft
IGF I	- insulin-like growth factor
g	- Gravitation, Erdbeschleunigung
g	- Gramm, $10^{-3}$ Kilogramm
mg	- Milligramm, $10^{-6}$ Kilogramm
$\mu$ g	- Mikrogramm, $10^{-9}$ Kilogramm
h	- Stunde
JMP	- Statistikprogramm von SAS
M	- Mol
mmol	- Millimol, $10^{-3}$ Mol
l	- Liter
ml	- Milliliter
$\mu$ l	- Mikroliter
min	- Minute
n	- Anzahl der Proben
NIS	- Natrium-Iodid-Symporter
p	- statistische Wahrscheinlichkeit
PBS	- phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
RAR $\alpha$	- Retinoic acid receptor $\alpha$
RXR $\alpha$	- Retinoid X receptor $\alpha$
s	- Sekunde
SD	- Standardabweichung

SEM	- Standard Error of the Mean, mittlerer Fehler des Mittelwertes
Tab.	- Tabelle
TSH	- Thyreoidea-stimulierendes Hormon, Thyreotropin
U	- Unit
mU	- Milliunit, $10^{-3}$ Unit
Vit. A	- Vitamin A
Vol %	- Volumen-Prozent

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Einleitung</b>	<b>11</b>
<b>1. Material</b>	<b>16</b>
1.1 Geräte für die Zellkulturen	16
1.2 Kulturgefäße und Filter	16
1.3 Chemikalien und Reagenzien	17
1.4 Medien und Lösungen	18
1.5 Reagenzien zur zytochemischen Darstellung des RAR- / RXR-Rezeptors	19
1.6 Radioaktive Chemikalien	20
<b>2. Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Präparation / Isolierung von Schilddrüsenzellen / Flußdiagramm	21
2.2 Zellzählung	23
2.3 Herstellung der Thyreozytenkulturen und deren Stimulation mit TSH, all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure und Methanol	24
2.4 Kulturbedingungen	26
2.5 Zellernte zur Messung des Iodid- und Thymidineinbaues in die Thyreozyten	27
2.6 Messung des Iodideinbaues und [6- <sup>3</sup> H]-Thymidin-Einbaues in die Thyreozyten	27
2.7 Mycoplasmennachweis	28
2.8 Auswertung der Radioaktivitätsmessung	28
2.9 Zytochemische Darstellung des RAR $\alpha$ - / RXR $\alpha$ -Rezeptors	28
2.10 Statistische Auswertung	30

<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten	31
3.1.1	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von Methanol, von unterschiedlichen Konzentrationen an Retinol und von TSH, kultiviert in Vitamin A-freiem Medium	31
3.1.2	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von TSH und von TSH + unterschiedlichen all-trans-Retinol Konzentrationen. Die Thyreozyten wurden sowohl in Vitamin A-freiem als auch in Vitamin A-haltigem Medium kultiviert.	33
3.1.3	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von TSH, Methanol, all-trans-Retinol und 13-cis-Retinsäure, kultiviert in Vitamin A-haltigem oder Vitamin A-freiem Kulturmedium.	41
3.1.4	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme und [6- <sup>3</sup> H]-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von TSH und c-AMP, kultiviert in Vitamin A-haltigem Kulturmedium	44
3.1.5	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen all-trans-Retinol-Konzentrationen, Methanol, 13-cis-Retinsäure, TSH und der Kombination aus TSH + all-trans-Retinol. Zellen kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium mit 0,6 µM oder 0,1 µM Retinol oder in Vitamin A-freiem Medium.	49
3.1.6	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von all-trans-Retinol oder Methanol oder TSH und der Kombination aus TSH + all-trans-Retinol, sowie Natriumperchlorat, kultiviert in Vitamin A-haltigen (1,8; 0,6; 0,1 µM) Medien oder in Vitamin A-freiem Medium	59

3.2	Einfluss von TSH von TSH + all-trans-Retinol und von TSH + 13-cis-Retinsäure auf den RAR $\alpha$ - / RXR $\alpha$ -Rezeptor von Schweinethyreozyten die in Vitamin A-haltigem (Vitamin A: 0,6 $\mu$ M) oder Vitamin A-freiem Medium kultiviert wurden.	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
4.1	Methoden	85
4.2	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure, TSH und Methanol bei unterschiedlich hohe Vitamin A-Konzentrationen des Kulturmediums.	86
4.3	<sup>125</sup> I-Radioiodaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluss von TSH / cAMP in Vitamin A-haltigem Kulturmedium.	91
4.4	Darstellung des RAR $\alpha$ - und RXR $\alpha$ -Rezeptors.	92
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>124</b>



## Einleitung

Schilddrüsenerkrankungen kommen in Deutschland bei ca. 50% der Bevölkerung vor. Sie treten als häufigste endokrinologische Erkrankung, vor allem als endemische Struma infolge eines alimentären Jodmangels in Erscheinung (Bauch et al. 1989, Meng et al. 1992, Hampel et al. 1993).

20-30% der Bevölkerung, das sind ungefähr 20 Mio. Deutsche, sind nach Pfannenstiel, P. (1991) bzw. Pfannenstiel et al. (1997) behandlungsbedürftig.

Die Aufgabe der Schilddrüse ist die Versorgung des Organismus mit Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ).

Iod als Spurenelement ist gewichtsmäßig der größte Bestandteil von  $T_3$  und  $T_4$ . Der tägliche Iodbedarf beträgt nach Berechnungen der WHO ungefähr 150-250µg. Umgerechnet auf das ganze Leben sind das nur 4-5 g.

Die Resorption des mit der Nahrung aufgenommenen Iods erfolgt nahezu vollständig als anorganisches Iodid im Dünndarm. Gespeichertes Iodid kann aber auch von den Thyreozyten wieder sezerniert oder durch Abbau von  $T_3$  und  $T_4$  freigesetzt werden. Aus der Blutbahn wird Iodid gegen ein Konzentrationsgefälle energieabhängig in die Schilddrüse transportiert. Das Transportprotein ist der Natrium-Iodid-Symporter (NIS), der in der basalen Zellmembran lokalisiert ist und durch Perchlorat kompetitiv gehemmt werden kann (Lawrence et al. 2000).

Unter physiologischen Bedingungen wird der NIS durch TSH stimuliert (Dai et al. 1996 und Schmutzler und Koehrle 1998).

TSH gilt in vivo nicht als obligater, sondern als fakultativer Wachstumsfaktor für die Schilddrüse. Weitere Wachstumsfaktoren für Schilddrüsen-Parenchym sind EGF und insbesondere IGF I. Nitsch et al. (1980), Roger et al. (1983 und 1987) und Goretzki et al. (1987) berichten über die wachstumsfördernde Wirkung des TSH auf Schilddrüsenzellen. Fayet et al. (1979), Westermark et al. (1979), Wadeleux und Winand (1981), Valente et al. (1983), Eggo et al. (1984), Watanabe et al. (1985), Davies et al. (1985) und Greil et al. (1985) stellen die wachstumsfördernde Wirkung des TSH auf Thyreozyten in Frage.

Nach heutigen Vorstellungen dient TSH der Differenzierung und Regulation zellulärer Funktionen, IGF I und insbesondere bei Malignomen auch EGF der Proliferation (Saji et al. 1987, Gärtner et al. 1992 und 1993, Jockenhövel et al. 1993). Spezifische Rezeptoren für EGF mit hoher Affinität lokalisierten Atkinson et al. (1983) auf Schweine-Thyreozytenmembranen.

Für eine Wachstumsstimulation der Schilddrüse können aber auch andere Faktoren verantwortlich gemacht werden. Einer dieser Faktoren ist das Vitamin A (Retinol) und seine Derivate, die Retinoide.

Retinol und seine Derivate haben beim Menschen essentielle Effekte:

- Für den Sehvorgang ist Retinal wichtig. Es ist ein lichtabsorbierendes Chromophor;
- Die Aufrechterhaltung eines funktionstüchtigen Haarzellenepithels durch Retinol im Innenohr dient dem Hörvorgang;
- Am Riechepithel und den Geschmackspapillen entfaltet Retinol seine Wirkung;
- Als Wachstumsfaktor spielt Retinol vor allem bei Kindern eine wichtige Rolle;
- Bei der Embryonalentwicklung / Fortpflanzung wird Retinol benötigt;
- An der Spermatogenese sind Retinol und Retinal beteiligt;

Vitamin A und seine Derivate modulieren auch die Differenzierung und Proliferation einer Vielzahl von Zellen, wie zum Beispiel die reversible Verhornung der Schleimhaut (Hanck 1991). Die Schilddrüsenproliferation und Genregulation unter Vitamin A wurde von Morley et al. (1980) und Schreck et al. (1994) beschrieben.

Retinoide besitzen auch einen Effekt auf den Schilddrüsenhormon-Metabolismus. Vitamin A-Mangel bei Ratten wurde mit gestiegenen Serumkonzentrationen von Schilddrüsenhormonen assoziiert (Morley et al. 1978 und Garcin et al. 1983). Hirsch (1967) untersuchte die jahreszeitlichen Schwankungen hyperthyreoter Patienten, die in umgekehrtem Verhältnis zum Vitamin A-Angebot stehen.

Ein Übermaß an Vitamin A scheint einen hemmenden Effekt auf die Schilddrüsenfunktion auszuüben. Hyperthyreote Patienten, die mit hohen Dosen von Vitamin A behandelt wurden, zeigten eine deutliche Besserung ihres hyperthyreoten Zustandes. (Simkins et al. 1947). Die toxischen Nebenwirkungen dieser Therapie waren jedoch so groß, daß die Möglichkeiten dieser Therapie nicht weiter verfolgt wurden.

Retinoide zeigen insbesondere bei bestimmten Malignomen auch starke antiproliferative Effekte, die zur Krebstherapie, vor allem bei Promyelozytenleukämie, Gebärmutterhalskrebs, metastatischem und squamösem Hautkrebs genutzt werden (Smith et al. 1992, Weis et al. 1994, Fenaux et al. 1996 und Camacho 2003). Zur Akne und Psoriasis-therapie werden Retinoide seit längerem eingesetzt (Marghescu 1982, Stüttgen 1980). Ihre günstige Wirkung bei der Therapie von differenzierten Schilddrüsen-Malignomen beruht zum einen auf der Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod, durch den, die Möglichkeit besteht, gezielt Zellen absterben zu lassen (Iwata et al. 1992, Nagy et al. 1995, Fröhlich und Wahl 1999, Zhang et al. 1995). Zum anderen können nicht mehr Radioiod speichernde Schilddrüsen-Malignomzellen unter Retinolbehandlung zur Wiederaufnahme von Iod befähigt werden. Dadurch werden die Tumorzellen dann einer Radioiodtherapie zugänglich gemacht (Simon et al. 1996).

Molekularbiologisch wirken Retinoide als Liganden von nukleären Transkriptionsfaktoren, die durch Bindung an Hormon-responsive Sequenzen der DNA die Transkription von benachbarten Zielgenen beeinflussen (Mangelsdorf et al. 1992). Um einen Hinweis auf die Wirksamkeit der Retinoide auf molekularer Ebene zu erhalten, ist die Identifikation der retinoid-sensitiven Gene ein wichtiges Hilfsmittel. Nach heutigem Wissensstand wird die durch Retinoide verstärkte Iodaufnahme durch einen Anstieg der Expression des thyreoidalen Iodid-Transportproteins verursacht (Dai et al. 1996). Entgegen einem elektrochemischen Gradienten erfolgt der von TSH stimulierte und von einer  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase abhängige aktive Transport entlang dieses Transportproteins. Der Iodidtransport in die Zelle ist an einen gleichzeitigen Import von Na-Ionen gebunden. Dieser sogenannte  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ -Symporter (NIS) ist

ein intrinsisches Membranprotein (MG ca. 65 kD), dessen kodierende mRNA aus 1854 Nukleotiden besteht und vor kurzem kloniert und sequenziert wurde (Dai et al. 1996). Der NIS enthält 13 transmembrane Segmente mit einem extrazellulären N- und einem intrazellulären C-Terminus und einer 2:1 Na:I – Stöchiometrie (De la Vieja et al. 2000). Die NIS Genexpression kann, wie von Trapasso et al. (1999) bewiesen, dosis- und zeitabhängig von TSH gesteigert werden. Schmutzler et al. (2000) haben die TSH-abhängige NIS-Expression nochmals bestätigt.

Die Effekte von Retinsäure auf die NIS-Expression sind ebenfalls konzentrations- und zeitabhängig (Kogai et al. 2000). Untersuchungen von Fröhlich et al. (2001) bezüglich des Einflusses von TSH, Retinol und Retinsäure auf die Proliferation und die Bildung von Schweineschilddrüsen-Follikeln, die Thyreoglobulin-immunreaktiv sind, haben gezeigt, daß bei Kulturen, die mit 13 µM Retinol oder Retinsäure stimuliert werden, jeweils gleiche Effekte auftreten. Konzentrationen größer als 40 µM Retinol reduzieren die Bildung der Follikel, wohingegen mehr als 13 µM Retinsäure keinen Einfluß auf die Follikelbildung zeigt.

TSH scheint in gewissem Umfang Retinol zu benötigen, um Stoffwechselwirkungen einzuleiten. Dies ist eine mögliche Erklärung der in-vivo- Wirkung von Retinsäure bei der Behandlung von follikulären Schilddrüsenmalignomen (Schmutzler et al. (1996), Schreck et al. (1994)).

Bislang ging man davon aus, das der NIS unter Retinoidbehandlung wiederhergestellt wird (Schmutzler et al. 2001). Möglicherweise enthalten diese Malignome einfach kein Retinol, so daß vorhandenes TSH keine Wirkung zeigen kann. Über diese Interaktion zwischen Retinol und TSH herrscht bislang aber noch Unklarheit.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluß pharmakologischer Dosen von all-trans-Retinol und 13-cis-Retinsäure sowie deren Lösungsmittel Methanol auf

den Stoffwechsel und die Morphologie von Schweinethyreozyten zu untersuchen.

Für die meisten der hier durchgeführten Versuche wurde Retinol eingesetzt, weil sich gezeigt hat, dass Retinol in der Schilddrüsenzellkultur stärker wirkt als entsprechende äquimolare Konzentrationen von all-trans-Retinsäure (Fröhlich et al. 2001). Nach Arai et al. (1991) wird die Wirkung von Retinol und Retinsäure auf Schweinethyreozyten als gleichwertig betrachtet, wobei der maximal inhibitorische Effekt auf den TSH stimulierten Iodidmetabolismus hierbei nach 48h auftritt.

Die hier verwendeten Thyreozyten wurden entweder in primär retinoidfreiem Medium oder in Medium mit „physiologischer“ Retinol-Konzentration kultiviert. Dabei handelt es sich um Retinol in niedriger Konzentration (0,6 $\mu$ M), wie es in den meisten handelsüblichen Medien enthalten ist. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit TSH oder cAMP. Der Rezeptor für TSH hat einen intra- und extrazellulären Anteil, cAMP wird nur intrazellulär gebildet. Ein Vergleich in der Stimulierbarkeit der Zellen durch TSH und / oder cAMP ließe daher einen Rückschluss auf die Rolle des extrathyreoidalen Anteils des TSH Rezeptors zu. Die Thyreozyten aggregieren sich darunter zu dreidimensionalen follikelartigen Strukturen und bilden somit ein in-vitro-System mit in-vivo-Merkmalen (Fröhlich, E. und Wahl, R. 1999).

In einem weiteren Teil der Arbeit wird der Einfluss der o. g. Stimulanzen (all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure und TSH) auf den RAR $\alpha$ - bzw. RXR $\alpha$ -Rezeptor der Schilddrüsenzellen mittels Immunenzymtechnik untersucht.

## **1. Material**

### **1.1 Geräte für die Zellkulturen**

- Sterile Werkbank, Ceag Shirp, Typ C636 H, (Selm, Borg).
- Zentrifuge Hettich Rotixa / RP (Hettich, Tuttlingen).
- Zentrifuge Hettich Roto Silenta / K (Hettich, Tuttlingen).
- Zellharvester: Inotech AG Typ ICH 280 (Inotech, Dottikon, CH).
- Lichtmikroskop Carl Zeiss Typ 5100671
- Inkubator (Uni-I-trol CO<sub>2</sub>-Inkubator Modell 329, (Forma scientific, Marietta, Ohio, USA).
- Multi – crystal gamma counter, LB 2101, (Berthold, Wildbad, D).
- Multi – crystal gamma counter, LB 2103, (Berthold, Wildbad, D).
- Liquid scintillation counter, Wallac 1410, (Pharmacia, Freiburg, D).

### **1.2 Kulturgefäße und Filter**

- Kulturgefäße, 48 well Platten, Costar 3548, (Corning Incorporated, NY 14831, USA).
- Kulturgefäße, 6 well Platten, Costar 3506, (Corning Incorporated, NY 14831, USA).
- Zentrifugenröhrchen, 50ml, Falcon®, 35 2070 Blue Max™, (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg, D).
- Sterile Einwegfilter, SM 17598 K, 0,45µm und SM17597 K 0,2µm, (Sartorius, Göttingen, D).
- Glasfaserfilter für Zellharvester, Filter Mat 11731, (Scatron Instruments AS, Lier, N).
- Eppendorf – Reaktionsgefäße, 1,5ml, (Greiner – Labortechnik, Nürtingen, D).
- Neubauer – Zählkammer

### 1.3 Chemikalien und Reagenzien

- Natriumbicarbonat, 7,5%, 100ml, (Gibco BRL, Life Technologies).
- Ciprobay 200 (Ciproflaxin), 100ml-Infusionslösung, (Bayer).
- Amphotericin B, Ampulle mit Trockensubstanz, N1, (Squibb).
- Ultrosor G, insulinhaltiger Serumersatz, Lyophilisat, (Biosepra).
- Dispase II, neutrale Protease, 0,5 U/mg, Bac. Polymyxa, grade II, (Roche).
- Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (500x), Penicillin 50 000 U/ml, Streptomycin 50 mg/ml, Lyophilisat, (Roche).
- Erythrosin B, 1%, Indikator für Mikroskopie, (Merck, Darmstadt).
- DbcAMP, Dibutyryl-A-3:5-MP, cyclisch, (Roche).
- Ultima gold<sup>®</sup> XR, Szintillationscocktail, (Packard BioScience Company).
- Hydrocortison 100, Mischampulle mit 133,67mg Hydrocortison 21-hydrogensuccinat, Na-Salz, (Pharmacia & Upjohn GmbH).
- D+ -Sucrose, (Fluka Biochemica, Buchs, CH)
- Gummi arabicum, fein gepulvert, (Merck, Darmstadt).
- Edisonite / Schnellreiniger,(Merz, Frankfurt).
- $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$ , (Merck, Darmstadt).

## 1.4 Medien und Lösungen

- NCTC-135-Medium mit L-Glutamin, ohne Vitamin A, Sonderanfertigung (Gibco, Paisley, GB).
- NCTC-135-Medium mit Vitamin A: Vitamin A-Trockensubstanz (Sigma), aufgelöst in NCTC-135-Medium mit L-Glutamin, ohne Vitamin A, Sonderanfertigung (Gibco, Paisley, GB).
- EBSS, gepufferte Salzlösung nach Earle (10x), ohne  $\text{NaHCO}_3$ , (Gibco, Paisley, GB).
- Ampuwa<sup>®</sup>, Infusionsflaschen zu 1000ml, pH 5,3 – 7,0, (Boehringer Ingelheim).
- Penicillin-Streptomycin-Stammlösung (500x), s.o., in 10ml PBS aufgelöst.
- Spinnerlösung: 100ml EBSS + 900ml Ampuwa<sup>®</sup> mit  $\text{NaHCO}_3$  (6 – 8 ml) auf pH 7,2 eingestellt.
- Lösung für den Transport der Schilddrüsen vom Schlachthof zum Labor: Spinnerlösung + 50ml Ciprobay 200 / Liter, (s.o.)  
+ in 10ml Ampuwa<sup>®</sup> aufgelöstes Amphotericin B einer Ampulle.
- Dispase-Lösung, 5g Dispase II gelöst in 80ml Spinnerlösung, sterilfiltriert und mit Spinnerlösung auf 1l aufgefüllt.
- All-trans Retinol, 100nmol/10 $\mu$ l, 100mg-Ampulle, (Sigma), gelöst in Methanol.
- All-trans-Retinsäure, 100nmol/10 $\mu$ l, 100mg-Ampulle, (Sigma), gelöst in Methanol.
- 13-cis-Retinsäure, 100nmol/10 $\mu$ l, 100mg-Ampulle, (Sigma), gelöst in Methanol.
- Methanol, (Merck).
- TSH (Schwein), 10U / Fläschchen, (Sigma); verdünnt mit Ampuwa<sup>®</sup> auf 1mU/ 10 $\mu$ l oder 0,26mU/ 10 $\mu$ l.

### 1.5 Reagenzien zur zytochemischen Darstellung des Na-I-Symporters

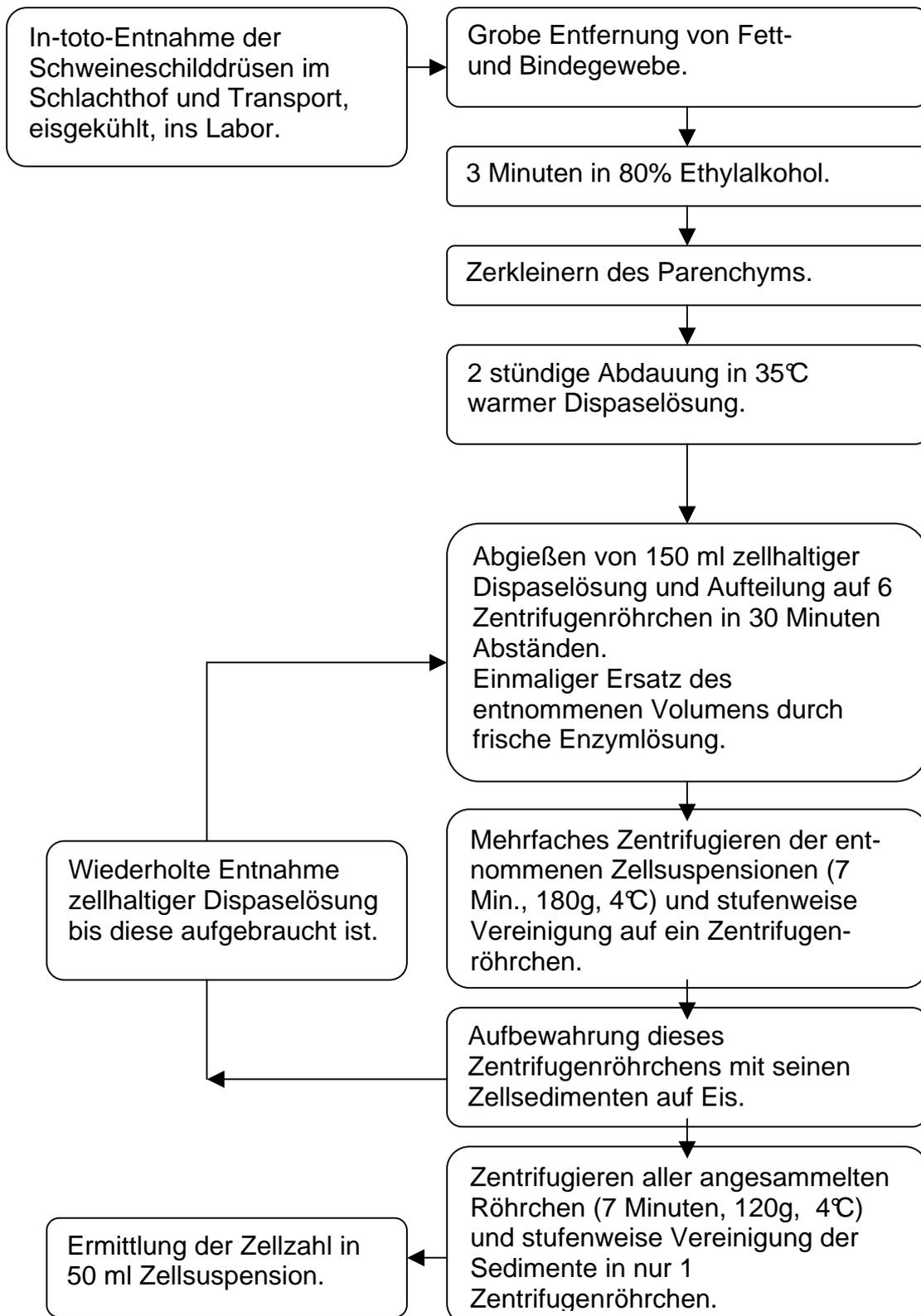
- PBS-Puffer (pH 7,4)  
Zusammensetzung für 2 Liter:  
14g NaCl, 5,72g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,8g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- Präinkubationspuffer, Zusammensetzung für 20ml:  
1ml NGS (normal goat serum), 100µl Triton X, 0,2g BSA (Rinderserumalbumin)
- Biotinylierter Antikörper – Ziege-anti-Kaninchen-Serum (goat-anti-rabbit serum), Dianova, Hamburg
- Antikörper-Verdünnungspuffer, Zusammensetzung für 20ml:  
1ml normal-goat-serum, 100µl Triton X
- Blockfixierung an Zellkulturen:  
100ml neutral gepuffertes Formol nach Lillie (Lillie,1954 in Romeis, 1989):  
10ml Formol 37% +  
90ml Aqua dem. +  
0,4g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O +  
0,65g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> , Lösungsgemisch eingestellt auf pH 7  
zu 100ml 30g D(+)Sucrose ,hergestellt nach Romeis (1989).
- Streptavidin-AP-Konjugat, Dako, Dänemark
- Holt´sches Gemisch: 30g Sucrose + 1g Gummi arabicum mischen und anschließend 100ml Aqua dem. zufügen.
- Chromogen-Substratlösung, Zusammensetzung:  
4mg Naphthol-AS-MX-Phosphat gelöst in 100µl Dimethylformamid (DMFA); 4,9ml 0,1M Trispuffer pH 8,2; 1,5mg 1M Levamisole, Sigma;  
5mg Fast-red TR salt (F2768), Sigma.
- Kaisers Glyceringelatine, ( Merck).

## 1.6 Radioaktive Chemikalien

- [ $^{125}\text{I}$ ]-TSH, 11kBq, (bovine,Rind), (Medipan, Selchow).
- $\text{Na}^{125}\text{I}$ , in NaOH Lösung, 37 MBq / ml, (Amersham pharmacia biotech).
- [6 –  $^3\text{H}$ ]- Thymidin, 37 MBq / ml, (Amersham pharmacia biotech).

## 2. Methoden

### 2.1 Präparation / Isolierung von Schilddrüsenzellen / Flußdiagramm



Für die folgenden Versuche wurden 10-20 in toto entnommene Schilddrüsen von ca. 9 Monate alten, frisch geschlachteten Schweinen präpariert. Die Schilddrüsen mitsamt umgebendem Fett- und Bindegewebe wurden möglichst aseptisch den Schweinen im Verlauf des Schlachtvorganges entnommen und in eisgekühlter, antibiotika- und antimykotikahaltiger Spinnerlösung ins Labor transportiert. Dort erfolgte die weitere Präparation.

Unter sterilen Bedingungen wurden mittels Schere und Pinzette die Schilddrüsen vom umgebenden Bindegewebe befreit und anschließend für 3 Minuten in 80%igen Ethylalkohol überführt. Die hierdurch anfixierte Kapsel und das septale Bindegewebe konnten jetzt gut mit zwei Pinzetten entfernt werden. Das verbleibende Parenchym wurde manuell mittels Skalpell zu Würfeln mit einer Kantenlänge von 2-3 mm zerschnitten. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten erfolgte die Aufbewahrung des Schilddrüsengewebes jeweils in eisgekühlter Spinnerlösung. Das zerkleinerte Parenchym wurde nun in ein Trypsiniergefäß überführt. In 35°C warmer Dispaselösung (ca. 1Liter) erfolgte unter ständigem Rühren eines heizbaren Magnetrührers das Abdauen des Parenchyms vom interstitiellen Bindegewebe. Die Thyreozyten gingen dabei in Suspension.

Es wurde zunächst eine Inkubationszeit von 2 Stunden eingehalten und danach jeweils 150 ml der Enzymlösung mit den darin suspendierten Zellen über 2 ineinander gestellte Teesiebe abgegossen, um gröbere Zell- und Bindegewebsbestandteile zurückzuhalten. Das fehlende Volumen wurde anfangs durch frische vorgewärmte Proteaselösung ersetzt. Danach wurde solange zellhaltige Enzymlösung entnommen, bis das Gefäß bis auf ein zurückbleibendes Bindegewebskonglomerat leer war.

Das filtrierte Volumen wurde sogleich auf 6 Zentrifugenröhrchen (50 ml, Falcon 35 2070) verteilt, diese mit Spinnerlösung auf 50 ml aufgefüllt und bei 4°C und 180g ( ca. 1000 U/min) 7 Minuten lang zentrifugiert.

Nach dem Dekantieren der Überstände wurden die Zellen in den 6 Röhren verbliebenen Restvolumen aufgeschwemmt, dann auf 3 Röhren verteilt und diese mit Spinnerlösung jeweils wieder auf 50 ml aufgefüllt und erneut bei 4°C, 180g, 7 Minuten zentrifugiert. Der Überstand über den Zellpellets der 3 Zentrifugenröhren wurde abdekantiert, die Zellen resuspendiert, in einem Röhren vereint und dieses mit NCTC-135-Medium ohne Vitamin A auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (bei 4°C, 120g (820U/min), 7 Minuten) mit dem Ziel, eine möglichst reine Thyreozyten-Suspension ohne Erythrozyten zu erhalten. Die Zwischenlagerung der sich nicht in der Zentrifuge befindlichen Röhren erfolgte auf Eis. Der Präparationsvorgang wurde wiederholt bis sämtliche Proteaselösung aufgebraucht war. Die Zellpellets aller Röhren wurden schließlich vereinigt. Danach erfolgte mehrmaliges Waschen mit Spinnerlösung und entsprechendes Abzentrifugieren, bis das Zellsediment makroskopisch keinen Erythrozytensaum mehr erkennen ließ.

### 2.2 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Mit 1%igem Erythrosin B (10µl Erythrosin B + 145µl Spinnerlösung + 45µl Zellsuspension) erfolgte eine Ausschlussfärbung.

Devitale Zellen wurden im Gegensatz zu vitalen durch Erythrosin B rot angefärbt, ihr Anteil an der Gesamtzellzahl betrug ca. 10%.

Bei der Zellzählung wurden jeweils 4 Eckquadrate rasch ausgezählt (=n). Ein Eckquadrat hat ein Volumen von 0,1µl. Die Zellzahl n in 50ml 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, all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure und Methanol**

Als Medium wurden NCTC-135 ohne Vitamin A (Sonderanfertigung) verwendet. Dadurch konnten die Vitamin A-Konzentrationen variiert werden.

Folgende Bereiche wurden gewählt:  $0,1\mu\text{M}$  = subnormale Konzentration;  $0,6\mu\text{M}$  = „physiologische“ Konzentration und  $1,8\mu\text{M}$  = 3-fache „physiologische“ Vitamin A Konzentration. (Der Begriff „physiologisch“ wurde deswegen verwendet, weil diese Konzentration in den meisten handelsüblichen Kulturmedien enthalten ist.) Dem verwendeten Medium wurde pro Liter 4ml Penicillin-Streptomycin-Stammlösung, 3% Ultroser G und  $1\mu\text{g} / \text{ml}$  Hydrocortison zugegeben.

Die isolierten Thyreozyten wurden mittels eines Magnetrührers in Suspension gehalten, um sie gleichmäßig mit einer Multipipette (Multipipette, Eppendorf, Hamburg) in die Kulturlöcher aussäen zu können. Wegen der relativ großen Variabilität der Stimulanzen innerhalb eines Versuches wurden die übrigen hinzuzufügenden Substanzen direkt den einzelnen Kulturen zupipettiert.

Die Zahl der vitalen Thyreozyten wurde im komplettierten Medium auf ca. 1300000 Zellen / ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils  $200\mu\text{l}$  mit ca. 260000 Thyreozyten in die 48 Kulturlöcher der Costar®-Platten ausgesät. Jedem Kulturloch wurde wahlweise  $4\text{ kBq Na}^{125}\text{I}$  oder  $0,4\text{ kBq }^{125}\text{I}$ -TSH und verschiedene Testsubstanzen zugeführt.

Um eine ausreichende statistische Aussage zu erreichen, wurde pro Ansatz jede Versuchsreihe mindestens 5-fach angelegt.

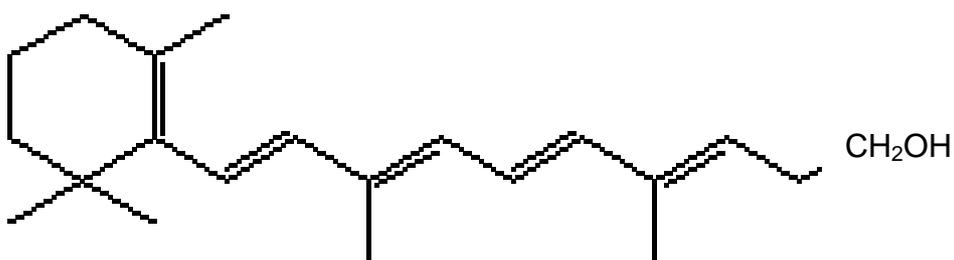
In die 6 Loch – Kulturgefäße von Costar wurden jeweils  $4,5\text{ ml}$  des zellhaltigen Mediums (ca. 3000000 Thyreozyten) einpipettiert und mit Testsubstanzen ergänzt.

Die Kulturen in den Costar®-Platten mit 48 Kulturlöchern enthielten wahlweise folgende Stimulanzen:

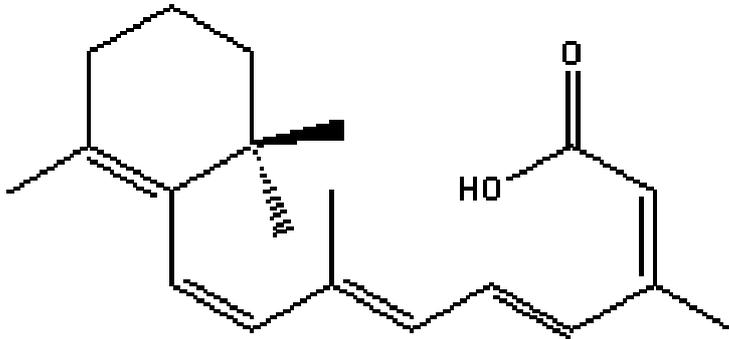
- TSH 0,26 mU in 10 µl physiologischer NaCl. Endkonzentration 0,26 mU / 200 µl Medium;
- All-trans-Retinol:
  - 2,6 nmol / 200 µl entsprechend einer Endkonzentration im Medium von 13 µM;
  - 5,2 nmol / 200 µl entsprechend einer Endkonzentration im Medium von 26 µM;
  - 7,8 nmol / 200 µl entsprechend einer Endkonzentration im Medium von 39 µM;
- 13-cis-Retinsäure mit 2,6 nmol / 200 µl entsprechend einer Endkonzentration im Medium von 13 µM;

Strukturformeln der Retinolderivate:

all-trans-Retinol:  $C_{20}H_{29}OH$



13-cis-Retinsäure: C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>COOH



Retinol und seine Derivate wurden, damit sie in Lösung gehen, in reinem Methanol aufgelöst.

Um einen generellen Effekt von Methanol auf die Thyreozyten zu erfassen, wurde bei den meisten Versuchen eine Kontrolle mit Methanol mitgeführt.

Um eine Zersetzung von Retinol oder seiner Derivate durch Licht zu umgehen, wurden die Versuche im abgedunkelten Raum durchgeführt.

#### 2.4 Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden unter Lichtabschluß in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37°C mit 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> begast und unterschiedlich lange inkubiert (mind. 18h). Die vitalen Zellen haben sich mit zunehmender Inkubationsdauer am Plattenboden verankert.

### **2.5 Zellernte zur Messung des Iodid- und Thymidineinbaues in die Thyreozyten**

Zur Messung der Iodid- und Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurden dem Medium  $\text{Na}^{125}\text{I}$  und  $6\text{-}^3\text{H}$ -Thymidin zupipettiert. Nach Inkubation, zeitabhängig vom Versuch (aber mindestens 18h), erfolgte die Zellernte mittels eines Zellharvesters (INOTECH AG Typ ICH 280) auf Glasfasermatten. Die geernteten Zellen wurden zweimal mit Aqua demineralisata nachgespült.

Die Filtermatten mit den an ihnen haftenden Zellen wurden in Meßröhrchen überführt und die darin enthaltene Radioaktivität gemessen. Diese entspricht der aufgenommenen Aktivität von  $\text{Na}^{125}\text{I}$  oder  $^3\text{H}$ -Thymidin durch die Thyreozyten.

Von der angelegten Zellkultur wurde ab Inkubationsbeginn im Abstand von 6 Stunden jeweils ein Teil der Zellen mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert, um den Eigenrhythmus der Iodidaufnahme (Shimura et al., 1997) zu erfassen.

### **2.6 Messung des Iodideinbaues und $[6\text{-}^3\text{H}]$ -Thymidin-Einbaues in die Thyreozyten**

Pro Kulturloch der 48-well-Platten wurden  $10\ \mu\text{l}$   $\text{Na}^{125}\text{I}$  (4kBq) und  $10\ \mu\text{l}$   $[6\text{-}^3\text{H}]$ -Thymidin (12kBq) einpipettiert. Nach Inkubation erfolgte die Zellernte mittels Zellharvester (s.o.). Einbringen der ausgestanzten und mit Zellen beladenen Filterpapiere in 6ml-Szintillationsgefäße + 5 ml des handelsüblichen Szintillationscocktails Ultima gold<sup>®</sup>. Die Messung erfolgte simultan in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler mit entsprechender Spektrum-Einstellung für  $^{125}\text{I}$  und  $^3\text{H}$ -Thymidin. Proben, die nur  $^{125}\text{I}$  enthielten, wurden im Gamma-Counter gemessen. Ein Zusatz von Szintillationsflüssigkeit war hier nicht erforderlich.

### 2.7 Mycoplasmennachweis

Bei den vorliegenden Zellkulturen handelt es sich um Primärkulturen. Da das Ausgangsmaterial hierfür aus dem Schlachthof stammt, besteht eine verstärkte Möglichkeit der Kontamination mit Mycoplasmen. Mycoplasmen nehmen ebenfalls Thymidin auf. Wenn solche kontaminierenden Mycoplasmen mitgemessen werden, kann das Ergebnis des Thymidineinbaues in die Thyreozyten verfälscht werden. Da der Durchmesser der Mycoplasmen ca. 0,8  $\mu\text{m}$  beträgt, dürften diese auf den Glasfaserfiltern mit einer Porengröße von 1,5  $\mu\text{m}$  beim Absaugen und Spülen allerdings kaum zurückgehalten werden und können die Poren passieren.

Es wurden nur Mycoplasmen-freie Proben verwendet. Die Mycoplasmenbestimmung wurde nach Testanleitung mit dem Mycoplasma Detection Kit 1296744, Enzyme Immunoassay (Roche), durchgeführt.

### 2.8 Auswertung der Radioaktivitätsmessungen

Pro Versuchsreihe wurde jeder Ansatz mindestens 5-fach angelegt. Zur Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung sind 5 Meßwerte in die Berechnung mit einbezogen worden.

Ganz offensichtlich fehlerhafte Ansätze (Ausreißer), die auf Pipettierfehler zurückzuführen waren, wurden ausgeklammert und nicht in die Berechnung des Mittelwertes aufgenommen.

### 2.9 Zytochemische Darstellung des RAR $\alpha$ -/RXR $\alpha$ -Rezeptors

Die Präparation und Herstellung der Zellkulturen erfolgte wie oben beschrieben. Nach Stimulation der Zellkulturen mit 3 Mio. Zellen / Kulturloch (sog. 6-well-Platten, Versuch doppelt angelegt) mit TSH, TSH + Retinol (13 $\mu\text{M}$ ), TSH + Retinol (26 $\mu\text{M}$ ), TSH + Retinol (39 $\mu\text{M}$ ), TSH + all-trans-Retinsäure (13 $\mu\text{M}$ )

wurden die Zellen für ca. 48h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen aus jeweils 2 Kulturlöchern vereinigt, in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1060 U/min (entspr. 200g) bei 4°C 3 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Die Zellen wurden in 250µl 0,5 M EDTA-Lösung resuspendiert, um ihr Verklumpen durch Ca<sup>2+</sup>-Entzug zu verhindern und auf Eis zwischengelagert.

Je 50µl der Zellsuspension wurden auf 5 der besseren Haftung wegen mit Chromalaungelatine beschichteten Objektträger aufgetropft und ähnlich einem Blutaussstrich ausgestrichen. Die Objektträger wurden bei 37°C, 2h im Brutschrank getrocknet.

Die Blockfixierung der Zellkulturen erfolgte durch Einstellen der Objektträger in eine neutral gepufferte Formollösung nach Lillie mit 30% Sucrose für 10 Minuten. Danach folgte ein 10-minütiges Bad in Holt'schem Gemisch mit anschließender Lufttrocknung der Objektträger.

Die Objektträger wurden jetzt für 10 Minuten in eisgekühltes Aceton eingestellt, um sie zu entfetten und ihnen Wasser zu entziehen. Dann wurden die Objektträger mit 4N HCl für 20 Min. bei Raumtemperatur vorinkubiert. Spülen der Objektträger mit PBS-Puffer. Nun Aufpipettieren von Präinkubationspuffer (ca.200µl / Objektträger). Inkubation für 30 Minuten in feuchter Kammer, dann abschütteln des Präinkubationspuffers.

Der Nachweis der RXRα-anti RXRα-/ RARα-anti RARα -Komplexe auf der Zelloberfläche erfolgte durch die Immunenzymtechnik nach folgendem Prinzip:

- Bindung des 1. Antikörpers (RXRα/ RARα) an das Antigen.
- Bindung eines biotinylierten Zweitantikörpers an den Erstantikörper.
- Zugabe von enzymmarkiertem Streptavidin, das mit Biotin einen festen Komplex bildet.

- Zugabe von Chromogen-Substratlösung. Das fixierte Enzym wird sichtbar.

Hierzu erfolgte nach der Vorbehandlung jetzt die Auftragung von 1:20 verdünntem RXR $\alpha$ -/ RAR $\alpha$  – Antikörper (ca.200 $\mu$ l / Objektträger) und die Inkubation bei 4°C über Nacht in einer feuchten Kammer.

Die Objektträger wurden nun mit PBS gespült und verdünnter biotinylierter Ig G Zweit-Antikörper (goat-anti-rabbit Ig G 1: 100 mit Antikörperverdünnungspuffer verdünnt) für 60 Min. bei Zimmertemperatur zugegeben. Anschließendes Spülen mit PBS-Puffer und Auftrag des Streptavidin-alkalische Phosphatase (AP)-Konjugates (1:150 in PBS verdünnt) für 40 Min. bei Zimmertemperatur. Erneutes Spülen mit PBS und Aufbringen von Chromogen-Substratlösung für AP. Inkubation ca. 50 Min. bei Zimmertemperatur. Dadurch wurde der Retinsäure-Rezeptor-Komplex rot anfärbt. Zuletzt erfolgt ein Abgießen und Deckeln der Objektträger mit Glyceringelatine + Deckgläschen. Die Auswertung der zytochemischen Darstellung des RAR $\alpha$  / RXR $\alpha$  erfolgte durch Auszählen der markierten RAR $\alpha$ - / RXR $\alpha$ -positiven Zellen unter dem Mikroskop.

### 2.10 Statistische Auswertung

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

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

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 <sup>125</sup>I-Radioiodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten

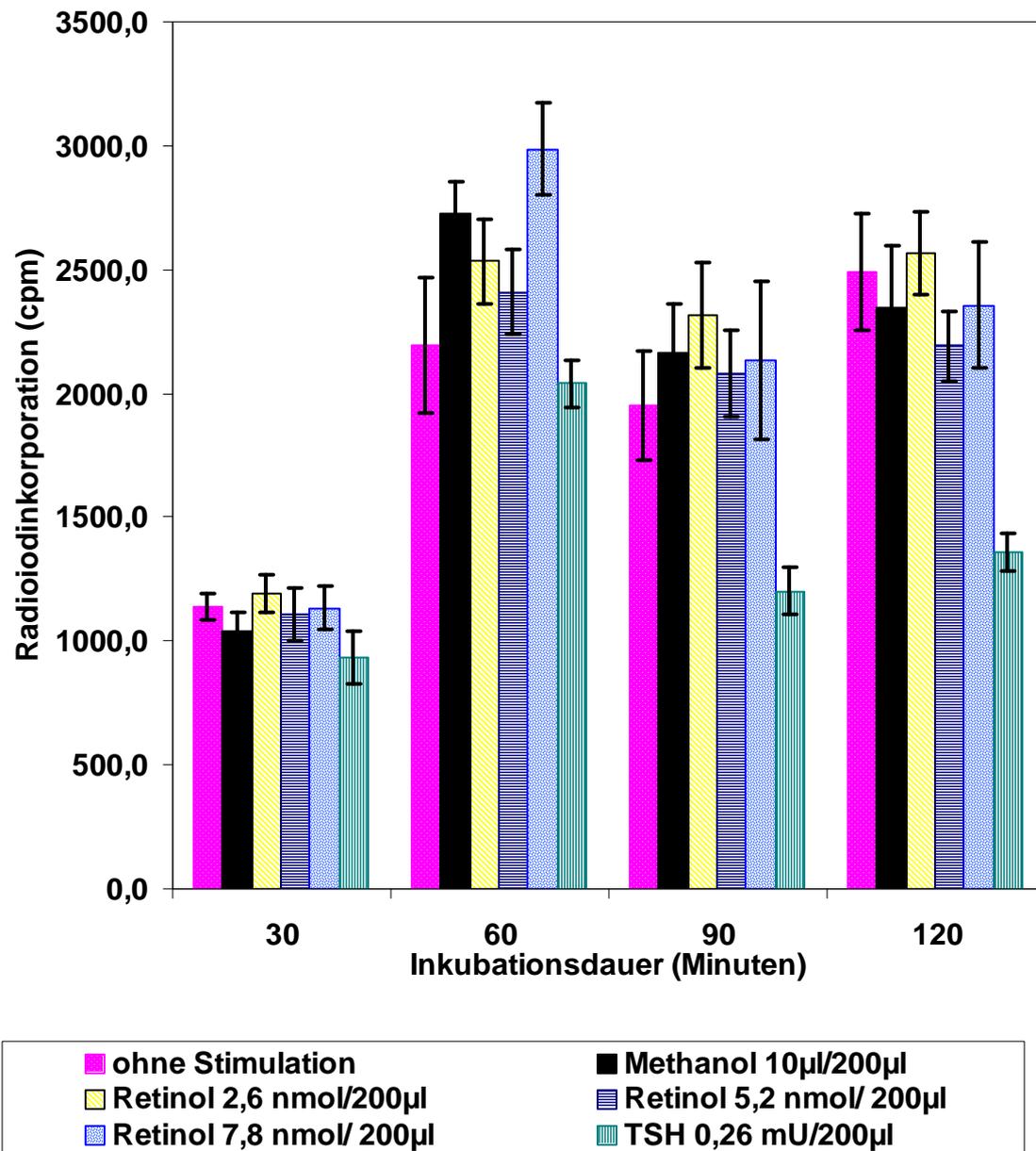
##### 3.1.1 <sup>125</sup>I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von Methanol, von unterschiedlichen Konzentrationen an Retinol und von TSH, kultiviert in Vitamin A-freiem Medium

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 10 µl Methanol oder 2,6; 5,2; und 7,8 nmol all-trans-Retinol / 200 µl Medium oder 0,26 mU TSH / 200 µl Medium stimuliert. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch Methanol, Retinol oder TSH stimuliert wurden. Die Radioiodaufnahme wurde nach 30, 60, 90 und 120 Minuten gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die von Anfang an mit Methanol, steigenden Konzentrationen von Retinol und TSH stimuliert wurden. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen und der Zeit sind in Abb. 1 dargestellt. Die Ergebnisse der Versuche werden als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung  $p < 0,05$  war.

Wie Abb. 1 zeigt, konnte unter den verwendeten Stimulanzien 10µl reines Methanol / 200µl Medium, Retinol 2,6 nmol / 200 µl und 5,2 nmol / 200 µl nach einer Stunde Inkubationsdauer nur ein tendenziell leichter Anstieg der Radioiodaufnahme im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

Die Radioiodinkorporation unter TSH (0,26 mU / 200 µl) entspricht nach 60 Minuten etwa der der unbehandelten Thyreozytenkultur. Dagegen zeigt sich nach der gleichen Inkubationsdauer ein signifikanter Effekt im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe bei Stimulation mit der höchsten gewählten Retinol-Konzentration (7,8 nmol / 200 µl).

Unter TSH (0,26 mU / 200  $\mu$ l) bleibt der gemessene  $^{125}$ I-Einbau zu jeder Zeit unterhalb der Kontrolle. Nach 120 Minuten zeigen die nicht stimulierten Schweinethyreozyten die höchste Radioiodinkorporation.

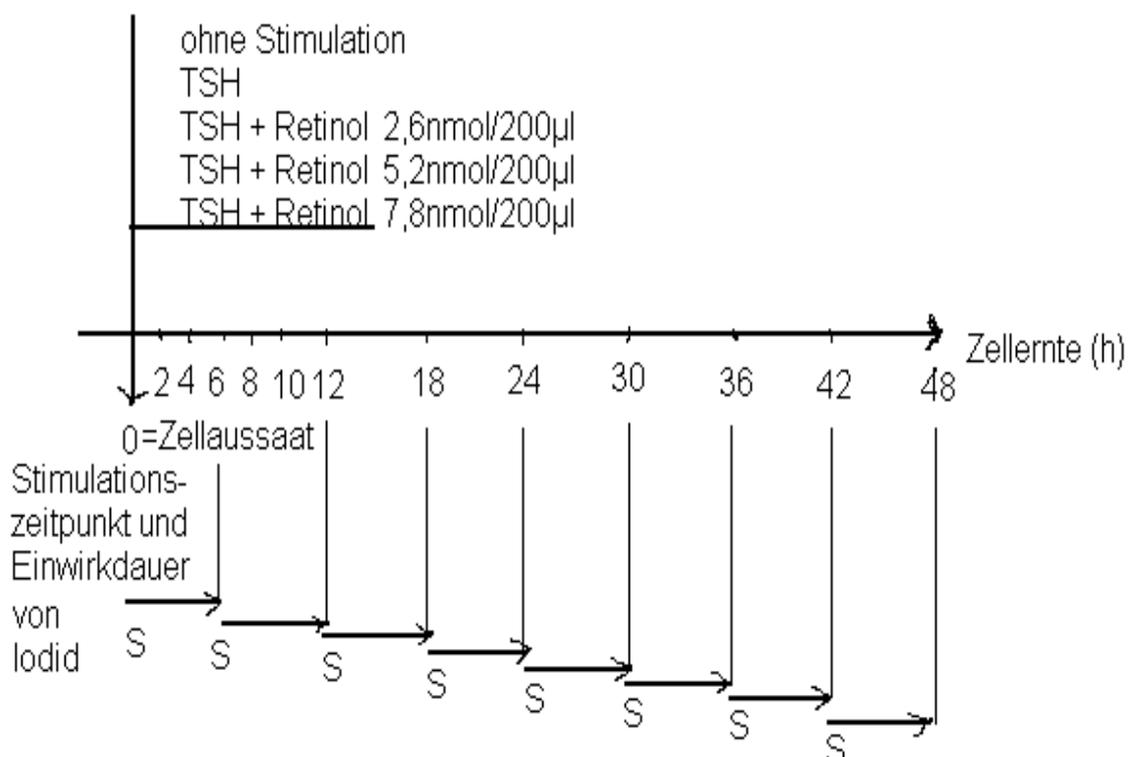


**Abb. 1** Einfluss von all-trans-Retinol, Methanol und TSH in Vitamin A-freiem Kulturmedium auf die  $^{125}$ I-Inkorporation in kultivierte Schweine-thyreozyten. Die Zugabe der Stimulanzen erfolgte 18 Stunden nach Zellaussaat = Stunde 0. Gemessen wurde die  $^{125}$ I-Inkorporation nach 30, 60, 90, 120 Minuten

Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=5). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu$ l.  $^{125}$ I -Iodzugabe: 4 kBq Na  $^{125}$ I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 1 im Anhang).

### 3.1.2 $^{125}$ I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von TSH und von TSH + unterschiedlichen all-trans-Retinol Konzentrationen. Die Thyreozyten wurden sowohl in Vitamin A-freiem als auch in Vitamin A-haltigem Medium kultiviert.

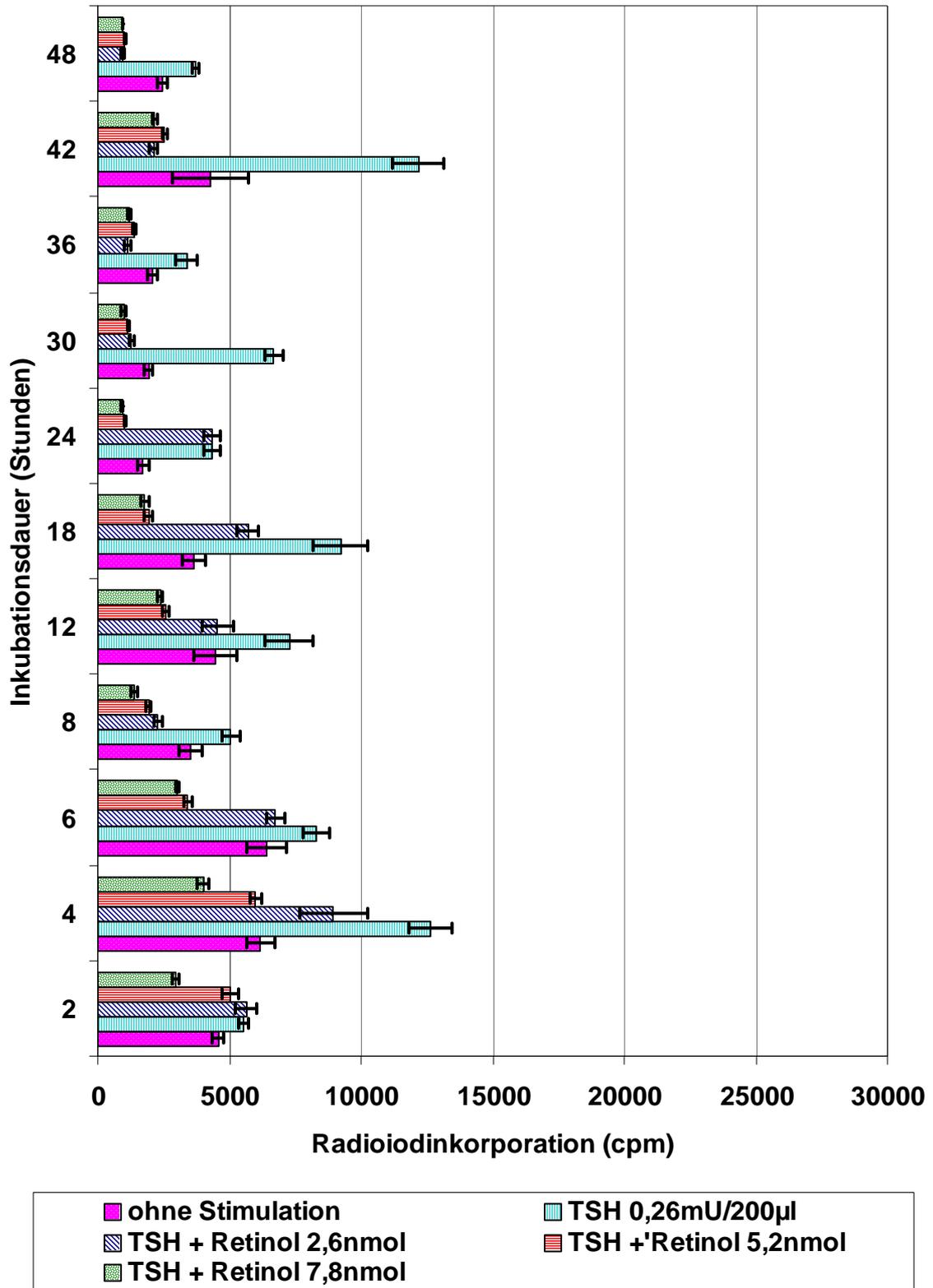
Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 0,26 mU TSH / 200  $\mu$ l Medium oder 0,26 mU TSH / 200  $\mu$ l + 2,6; 5,2 oder 7,8 nmol Retinol /200  $\mu$ l stimuliert. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch Retinol oder TSH stimuliert wurden. Der Zeitpunkt der Stimulation der Kulturen mit  $^{125}$ I und dessen Einwirkdauer auf die Zellen ergibt sich aus dem Schema zur Stimulation mit Radioiod.



Die Thyreozyten waren maximal 6h dem Radioiod ausgesetzt. Die Radioiodaufnahme wurde nach 2, 4, 6, 8, (10), 12, 18, 24, 30, 36, 42 und 48 Stunden gemessen.

Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die von Anfang an mit TSH, steigenden Konzentrationen von Retinol und TSH stimuliert wurden. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen und der Zeit sind in Abb. 2 und Abb. 3 dargestellt.

Aufgrund der benötigten sehr großen Zellzahl stammen die Thyreozyten in Abb. 2 und Abb. 3 aus zeitlich unterschiedlichen Präparationen mit gleichem Präparationsschema. Die Ergebnisse der Versuche werden als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung  $p < 0,05$  war.



Legende zu Abb. 2 siehe S. 36

**Abb. 2** Einfluss von TSH und TSH + unterschiedliche all-trans-Retinol-Konzentrationen auf die  $^{125}\text{I}$ -Inkorporation in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Kulturmedium. Die Zugabe der Stimulanzen erfolgte 18 Stunden nach Zellaussaat = Stunde 0. Zugabe von  $^{125}\text{I}$  unmittelbar oder jeweils 6, 12, 18, 24, 30, 36 oder 42 Stunden nach Inkubationsbeginn. Die Messung der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, denen zur Stunde 0  $^{125}\text{I}$  zugefügt wurde, erfolgte nach 2, 4 und 6 Stunden Inkubationsdauer. Die Messung der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten, zu deren Medium  $^{125}\text{I}$  erst zur Stunde 6 zugefügt wurde, erfolgte nach 8 und 12 Stunden, gerechnet vom Beginn der Inkubation. Die weiteren Zugaben von  $^{125}\text{I}$  zum Medium erfolgten in 6-stündigem Rhythmus, so dass  $^{125}\text{I}$  maximal 6 Stunden auf die Zellen einwirken konnte. Die letzte Messung des  $^{125}\text{I}$ -Einbaues erfolgte nach 48 Stunden Inkubationsdauer. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwerte und SEM ( $n=5$ ). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 2 im Anhang).

Da die verwendeten Schilddrüsenzellen die Tendenz eines Eigenrhythmus in der Radioiodaufnahme aufweisen und als Gemeinsamkeit ein relatives oder absolutes Speichermaximum für Radioiod bei 12,18 und 42 Stunden über verschiedene Versuche hinweg zeigen - auch wenn die Zellen aus unterschiedlichen Präparationen stammen - bietet sich ein Vergleich der Radioiodaufnahme nach 12,18 und 42 Stunden an.

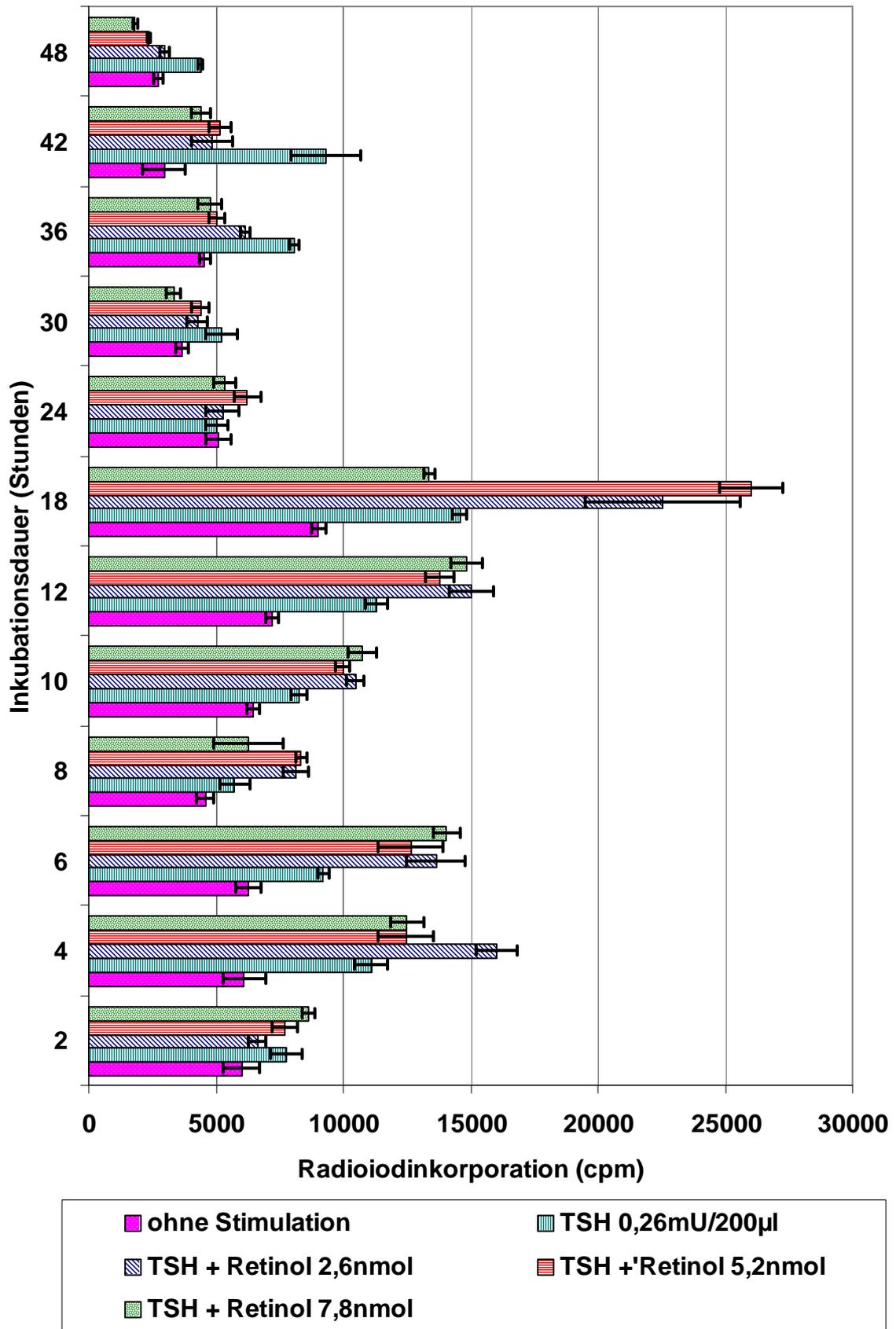
In Abb. 2 liegen die Radioiod-Einbauraten in die Thyreozyten, stimuliert mit 0,26 mU TSH / 200  $\mu\text{l}$  liegen über den gesamten Versuchszeitraum über denen der unbehandelten Thyreozytenkultur. Nach 12, 18 und 42 Stunden Inkubationsdauer ist sogar eine signifikante  $^{125}\text{I}$ -Radioiodinkorporation im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

Der  $^{125}\text{I}$ -Einbau in die Thyreozyten unter TSH + 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  ist nach 4 Stunden Inkubation innerhalb dieser Versuchsgruppe signifikant am größten. Danach zeigt sich unter dieser kombinierten Stimulation bis einschließlich 24 Stunden Inkubationsdauer eine tendenziell verstärkte

### 3. Ergebnisse

Radioiodaufnahme gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. In den Zeiten danach liegt die  $^{125}\text{I}$ -Einbaurrate deutlich unterhalb der Kontrolle.

Bei höheren Konzentrationen an Retinol (5,2 nmol bzw. 7,8 nmol / 200  $\mu\text{l}$  Medium) kombiniert mit 0,26 mU TSH bleibt der gemessene  $^{125}\text{I}$ -Einbau in die Thyreozyten zu jeder Zeit unterhalb der Kontrollgruppe.



Legende zu Abb.3 siehe S. 39

**Abb. 3** Einfluss von TSH und TSH + unterschiedliche all-trans-Retinol-Konzentrationen auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodinkorporation in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A -haltigem Medium. Die Zugabe der Stimulanzen erfolgte 18 Stunden nach Zellaussaat = Stunde 0. Zugabe von  $^{125}\text{I}$  unmittelbar oder jeweils 6, 12, 18, 24, 30, 36 oder 42 Stunden nach Inkubationsbeginn.

Die Messung der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, denen zur Stunde 0  $^{125}\text{I}$  zugefügt wurde, erfolgte nach 2, 4 und 6 Stunden Inkubationsdauer. Die Messung der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten, zu deren Medium  $^{125}\text{I}$  erst zur Stunde 6 zugefügt wurde, erfolgte nach 8, 10, 12 Stunden, gerechnet vom Beginn der Inkubation. Die weiteren Zugaben von  $^{125}\text{I}$  zum Medium erfolgten in 6-stündigem Rhythmus, so dass  $^{125}\text{I}$  maximal 6 Stunden auf die Zellen einwirken konnte. Die letzte Messung des  $^{125}\text{I}$ -Einbaues erfolgte nach 48 Stunden Inkubationsdauer. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwerte und SEM ( $n=5$ ). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 3 im Anhang).

Die Thyreozyten der Versuche aus Abb. 2 und Abb. 3 entstammen verschiedenen Zellpräparationen.

Wie der Vergleich von Abb. 2 und 3 zeigt, ergeben sich in den  $^{125}\text{I}$ -Einbauraten in die Thyreozyten Unterschiede, je nachdem, ob das Kulturmedium „physiologische“ Vitamin A-Konzentrationen enthält, oder nicht.

Wie Abb. 3 zeigt, kann, im Vergleich zum Versuch in Abb. 2, die Kombination von TSH+2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  oder TSH+5,2 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  den Iodeinbau nach 10, 12 und 18 Stunden Inkubationsdauer gegenüber der unbehandelten Kontrolle signifikant steigern. Dasselbe gilt für die Kulturen, die mit TSH+7,8 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  stimuliert wurden nach 10 und 12 Stunden Inkubation. Nach 18 Stunden fallen die Radioiod-Einbauraten hier deutlich ab.

TSH (0,26 mU) zeigt nach 4, 10, 12 und 36 und schließlich wieder nach 42 Stunden einen signifikant gesteigerten Iodeinbau im Vergleich zur Kontrolle.

Der Vergleich des  $^{125}\text{I}$ -Einbaues unter Stimulation mit 0,26 mU TSH zeigt in Vitamin A-freiem und Vitamin A-haltigem Medium nach 12 und 18 Stunden einen signifikanten Unterschied. Die Radioiodinkorporation ist bei einer

Inkubationsdauer von 18 Stunden in Vitamin A-haltigem Medium fast doppelt so hoch wie in Vitamin A-freiem Medium.

Der Iodeinbau in die Thyreozyten zeigt nach 4, 6, 10, 12, 18, 36 und 42 Stunden Inkubationsdauer unter TSH + Retinol 2,6 nmol / 200µl einen signifikanten Unterschied, wenn Vitamin A-haltiges Medium verwendet wird.

Der Vergleich des <sup>125</sup>I-Einbaues unter Stimulation mit 0,26 mU TSH+ 2,6 nmol / 200 µl zeigt in Vitamin A-freiem und Vitamin A-haltigem Medium nach 12, 18 und 42 Stunden einen signifikanten Unterschied.

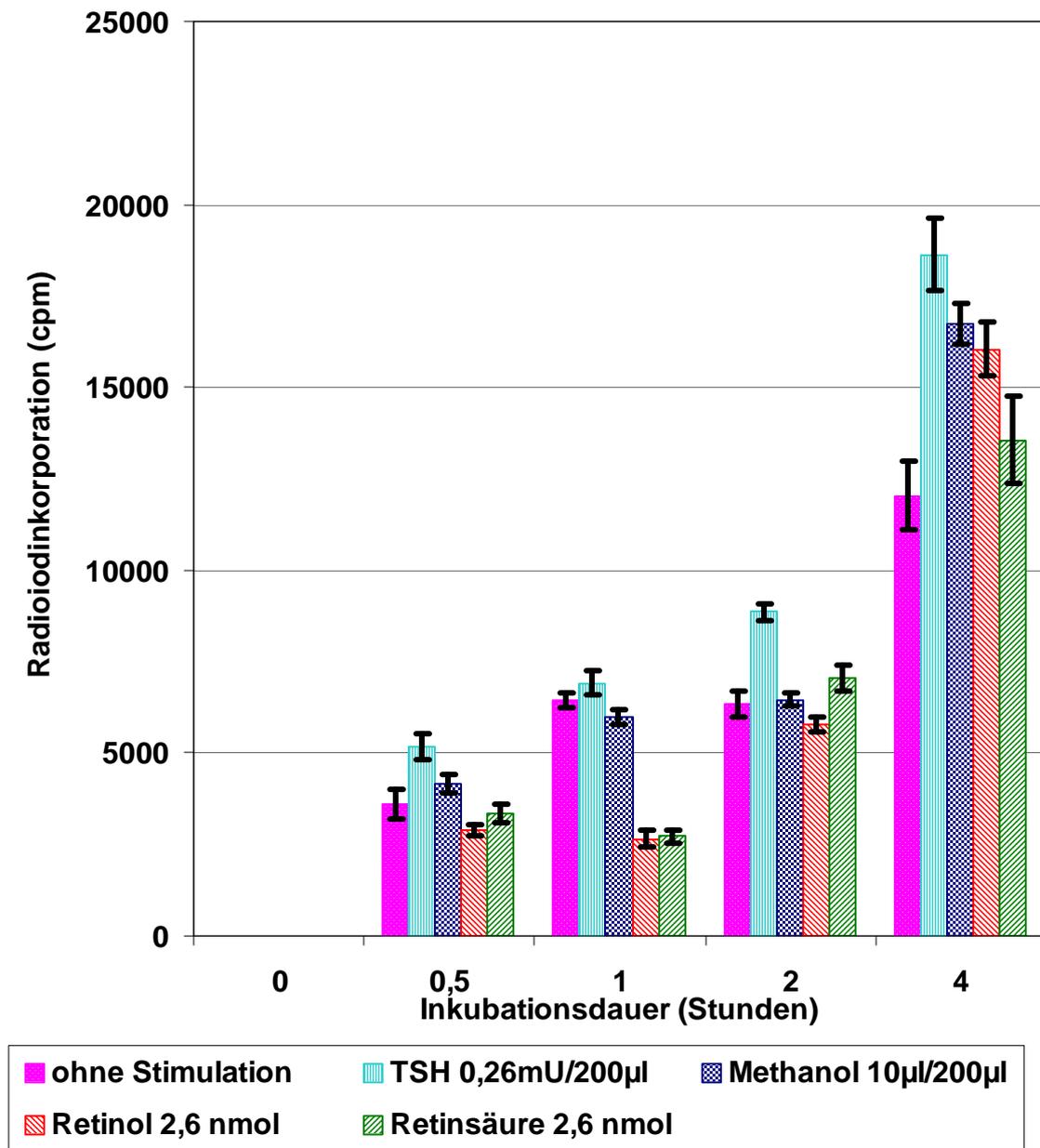
Die Radioiodinkorporation ist nach 18 Stunden Inkubation in Vitamin A-haltigem Medium fast viermal so groß wie bei Verwendung von Vitamin A-freiem Medium.

#### **3.1.3 <sup>125</sup>I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von TSH, Methanol, all-trans-Retinol und 13-cis-Retinsäure, kultiviert in Vitamin A-haltigem oder Vitamin A-freiem Kulturmedium**

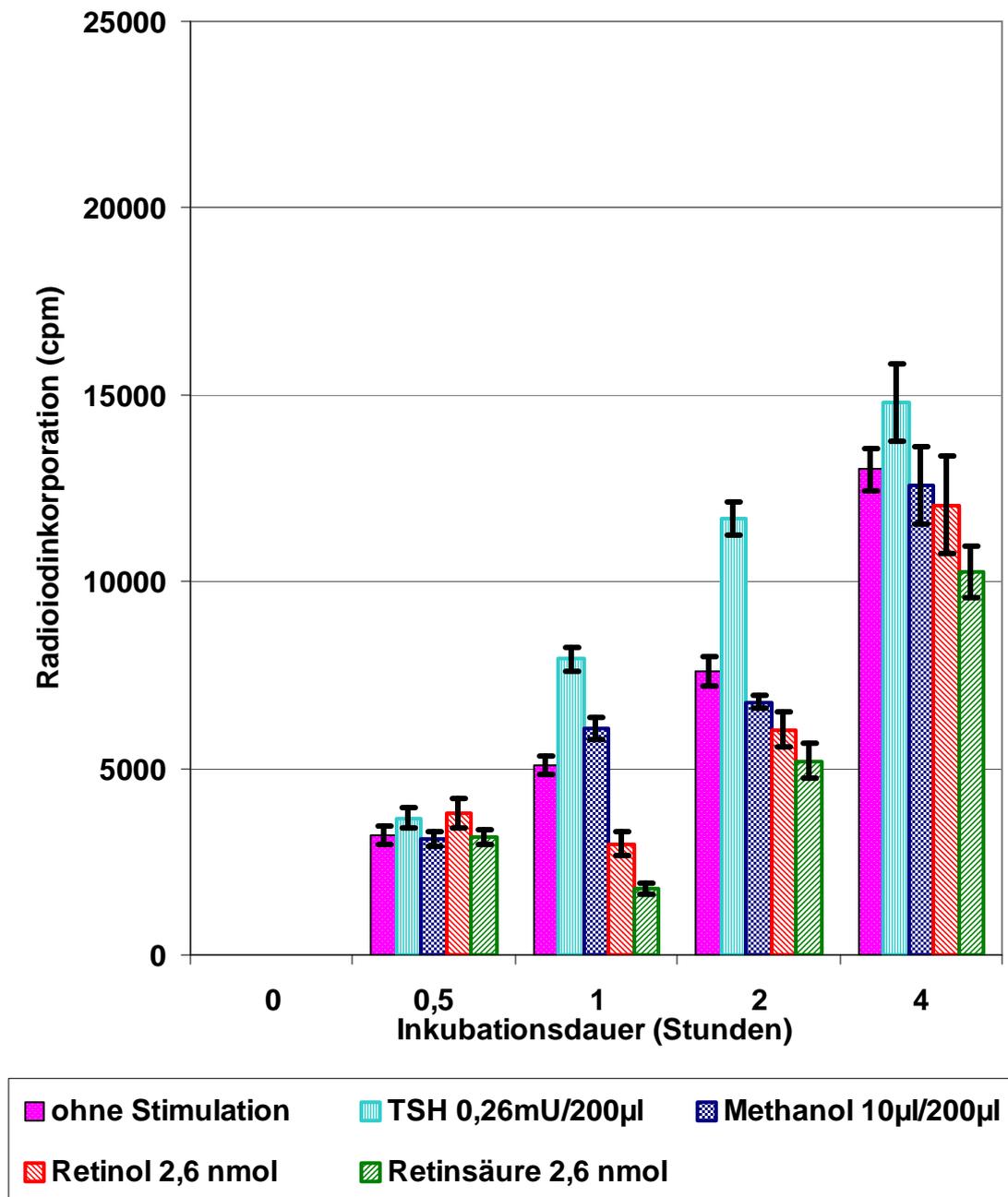
Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 0,26 mU TSH / 200 µl Medium, 10 µl Methanol / 200 µl Medium, 2,6 nmol Retinol / 200 µl und 2,6 nmol Retinsäure / 200 µl stimuliert. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch Methanol, Retinol bzw. Retinsäure oder TSH stimuliert wurden. Die Radioiodaufnahme wurde nach 0,5; 1; 2; 4 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die mit Methanol, Retinol bzw. Retinsäure oder TSH von Anfang an stimuliert wurden. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen und der Zeit sind in Abb. 4 und Abb. 5 dargestellt. Die Ergebnisse der Versuche werden als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung  $p < 0,05$  war.

Wie Abb. 4 deutlich macht, zeigt sich nach 4 Stunden Inkubationsdauer unter TSH, Methanol und Retinol ein signifikanter Anstieg der Radioiodinkorporation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur. 13-cis-Retinsäure zeigt im Vergleich zur Kontrolle keine Steigerung der Iodaufnahme. Methanol hat nach 4 Stunden einen signifikant stimulierenden Eigeneffekt auf die <sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten verglichen mit der Kontrolle.

13-cis-Retinsäure wirkt schwächer als Retinol wenn gleiche molare Konzentrationen verglichen werden. Retinol und Methanol induzieren nahezu die gleiche <sup>125</sup>I-Radioiodinkorporation.



**Abb. 4** Einfluss von TSH, Methanol, all-trans-Retinol und 13-cis-Retinsäure auf die  $^{125}\text{I}$ -Inkorporation in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium. Zugabe der Stimulanzen mit der Zellaussaat (Stunde 0). Gemessen wurde der  $^{125}\text{I}$ -Einbau nach 0,5, 1, 2, 4 Stunden Inkubationsdauer. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200 µl Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 4 im Anhang).

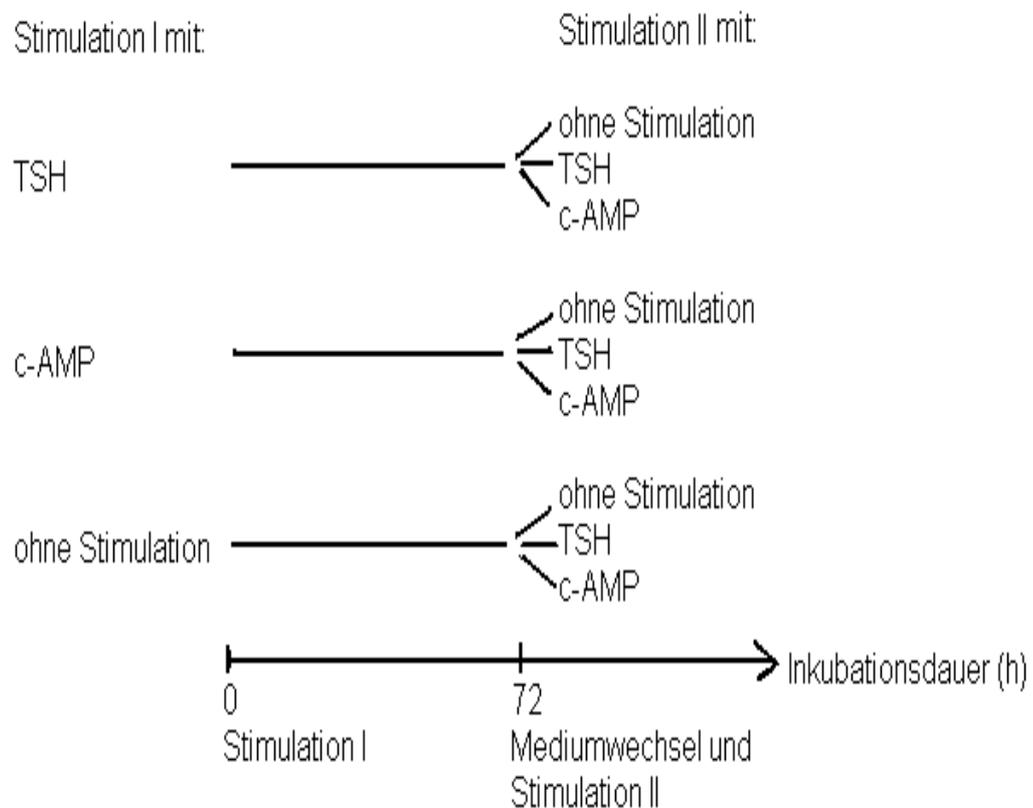


**Abb. 5** Einfluss von TSH, Methanol, all-trans-Retinol und 13-cis-Retinsäure auf die  $^{125}\text{I}$ -Inkorporation in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Medium. Zugabe der Stimulanzen mit der Zellaussaat (Stunde 0). Gemessen wurde der  $^{125}\text{I}$ -Einbau nach 0,5, 1, 2, 4 Stunden Inkubationsdauer. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200 µl Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 5 im Anhang).

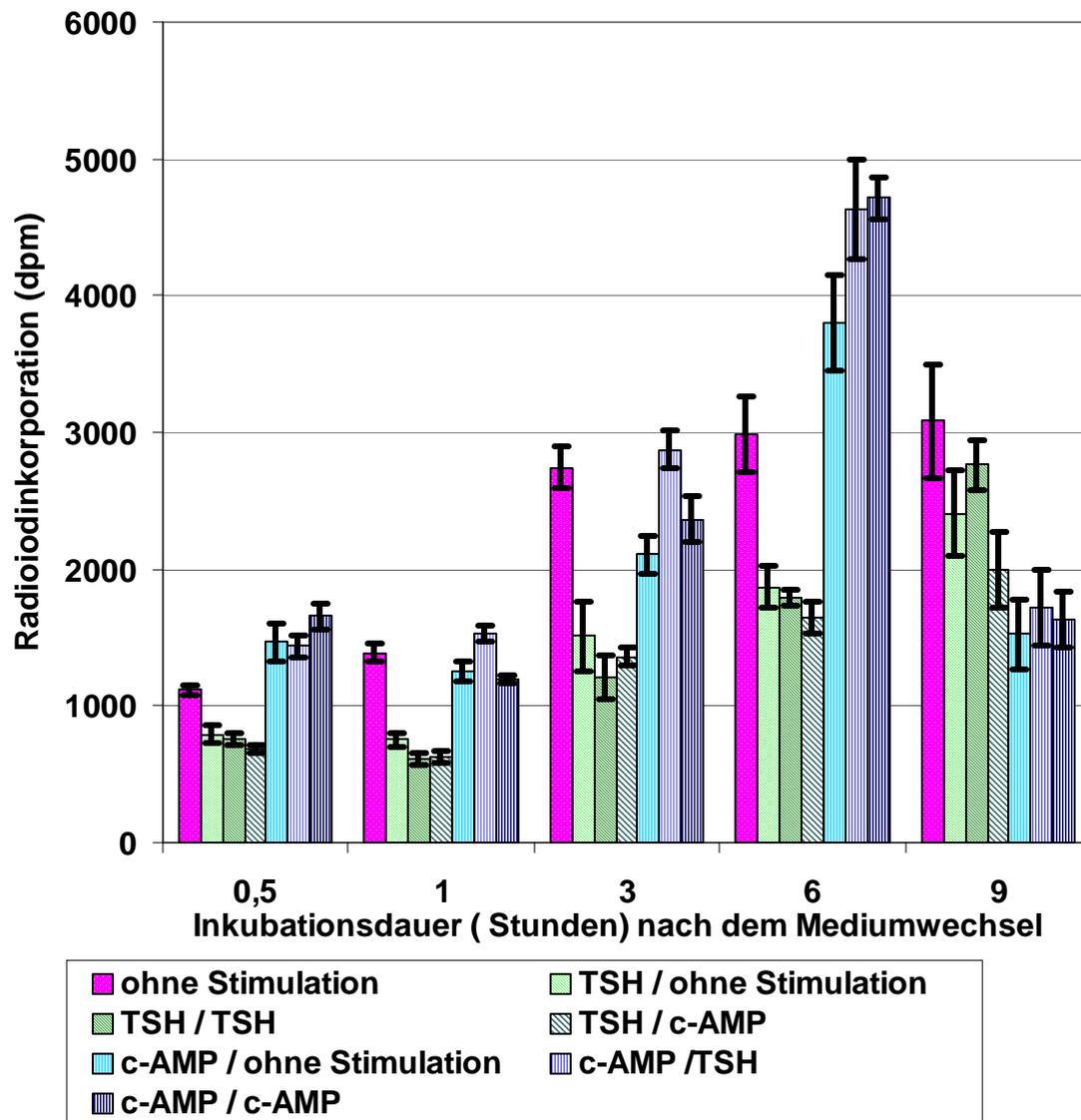
Nach 4 Stunden Inkubationsdauer ergab die Stimulation der Thyreozyten mit TSH, Methanol, Retinol oder Retinsäure im Vergleich zur unbehandelten Thyreozytenkultur keine signifikanten Unterschiede in der  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme. Unter alleiniger Stimulation mit TSH wurde während der gesamten Inkubation jeweils die höchste Radioiodinkorporation gemessen. Die Meßwerte der Radioiodaufnahme lagen unter allen übrigen Stimulanzen im Bereich der Kontrolle oder sogar darunter.

#### **3.1.4 $^{125}\text{I}$ -Radioiodaufnahme und $[6\text{-}^3\text{H}]$ -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von TSH und c-AMP, kultiviert in Vitamin A-haltigem Kulturmedium**

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 0,26 mU TSH / 200  $\mu\text{l}$  Medium und 0,4 mM c-AMP / 200  $\mu\text{l}$  Medium stimuliert. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Nach 72 Stunden wurde ein Wechsel des Vitamin A-haltigen Mediums sowie eine erneute Stimulation mit o.g. Stimulanzen durchgeführt. Gleichzeitig wurden dem Medium  $^{125}\text{I}$ -Radioiod und  $[6\text{-}^3\text{H}]$ -Thymidin zupipettiert. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch c-AMP oder TSH stimuliert wurden. Die Stimulation ist in folgendem Schema veranschaulicht:



Die Radioiodaufnahme wurde 0,5; 1; 3; 6; 9 Stunden nach der 2. Stimulation gemessen. Die Ergebnisse der Radioiod- und Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit denen jener Gruppen verglichen, die von Anfang an mit c-AMP oder TSH stimuliert wurden. Die Ergebnisse der Radioiod- bzw. Thymidininkorporation in die Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen und der Zeit sind in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellt. Die Ergebnisse der Versuche werden als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung  $p < 0,05$  war.



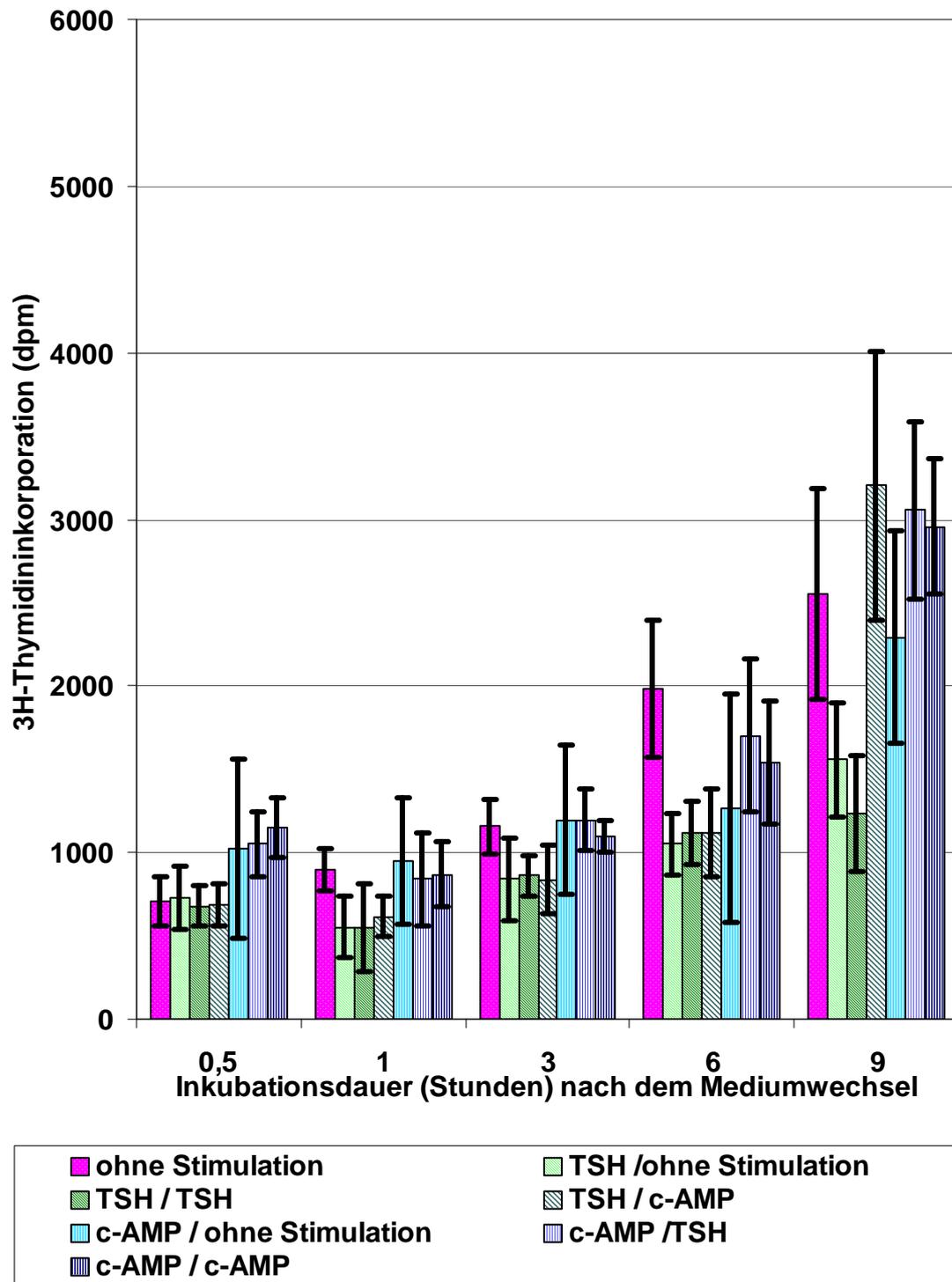
**Abb. 6** Einfluss von TSH (0,26 mU / Kultur mit 200  $\mu$ l) und c-AMP (0,4 mM / Kultur mit 200  $\mu$ l) auf den Einbau von  $^{125}$ I in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium. Die Zugabe der Stimulanzen erfolgte bei der Zellaussaat. Ein Mediumwechsel mit ebenfalls Vitamin A-haltigem Medium wurde nach 72h durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte eine 2. Stimulation mit TSH oder c-AMP und jeweils 4 kBq  $^{125}$ I. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte Zellen. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme 0,5; 1; 3; 6; 9 Stunden nach der 2. Stimulation. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu$ l

*Medium. Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 6 im Anhang).*

Aus Abb. 6 wird ersichtlich, daß die Iodidaufnahme bis zu 6 Stunden nach der 2. Stimulation bei Thyreozyten, denen beim Anlegen der Zellkultur bereits cAMP zupipettiert wurde, verstärkt wird. Dies steht im Gegensatz zu den Thyreozyten, denen bei Zellaussaat TSH zupipettiert wurde.

Die höchste Einbaurate an <sup>125</sup>I zeigt sich 6 Stunden nach der 2. Stimulation unter cAMP, wobei die Radioiodaufnahme bei der zeitlichen Kombination von Stimulanzen „cAMP vor und cAMP nach Mediumwechsel“ bzw. „cAMP vor und TSH nach Mediumwechsel“ signifikant über der Kontrollgruppe liegen. Die Einbauraten bei den Kombinationen „TSH vor und ohne Stimulation nach Mediumwechsel“, „TSH vor und TSH nach Mediumwechsel“ und „TSH vor und cAMP nach Mediumwechsel“ liegen signifikant unterhalb der Kontrollkultur. Die Kombination aus „cAMP-Zugabe vor Medienwechsel / ohne Stimulation nach Medienwechsel“ zeigt einen tendenziell verstärkenden Effekt auf die Iodidaufnahme.

Nach 9 Stunden Inkubationsdauer sinkt die Iodaufnahme in allen stimulierten Kulturen unter die Radioiodeinbaurate der Kontrollkultur. Unter Stimulation mit „cAMP vor und ohne Stimulation nach Mediumwechsel“, „cAMP vor und cAMP nach Mediumwechsel“ bzw. „cAMP vor und TSH nach Mediumwechsel“ ist eine signifikante Abnahme der Radioiodaufnahme meßbar.



**Abb. 7** Einfluss von TSH (0,26 mU / Kultur mit 200  $\mu$ l) und c-AMP (0,4 mM / Kultur mit 200  $\mu$ l) auf den Einbau von [6-<sup>3</sup>H]-Thymidin in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium. Die Zugabe der Stimulanzen erfolgte bei der Zellaussaat. Ein Mediumwechsel mit ebenfalls Vitamin A-haltigem Medium wurde nach 72h durchgeführt. Gleichzeitig erfolgte eine 2. Stimulation

*mit TSH, c-AMP und 12kBq [6-<sup>3</sup>H]-Thymidin. Als Kontrolle dienten nicht-stimulierte Zellen. Gemessen wurde die Radiothymidinaufnahme 0,5; 1; 3; 6; 9 Stunden nach der 2. Stimulation. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200 µl Medium. Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7 im Anhang).*

Abb. 7 zeigt, daß die Stimulation der Schweinethyreozyten mit cAMP bis zu 6 Stunden nach der 2. Stimulation eine tendenziell höhere Thymidininkorporation bewirkt als bei den Zellen, die ausschließlich mit TSH stimuliert wurden. Signifikante Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe sind bis zur Stunde 3 nicht festzustellen.

Bei einer Inkubationsdauer von 6 Stunden weist die Stimulation mit „TSH/ohne Stimulation“, „TSH/TSH“, „TSH/cAMP“ bzw. „cAMP/ohne Stimulation“ eine signifikant verringerte [6-<sup>3</sup>H] –Thymidinaufnahme im Vergleich zur Kontrolle auf. Nach 9 Stunden kommt es unter „TSH/ohne Stimulation“ und „TSH/TSH“ zu einer signifikanten Abnahme der Thymidinaufnahme in die Thyreozyten.

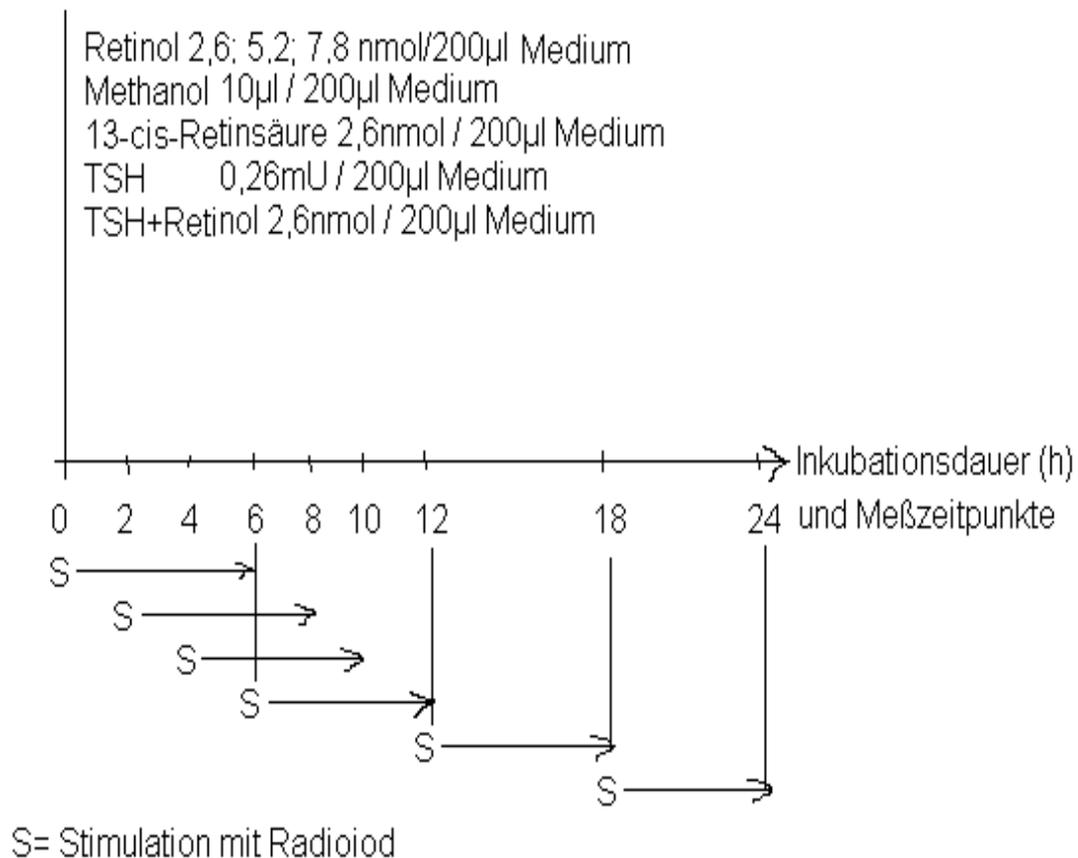
Durch Stimulation mit „TSH/cAMP“ sowie „cAMP/ohne Stimulation“, „cAMP/TSH“ und „cAMP/cAMP“ kann die Thymidinaufnahme gegenüber der Kontrollkultur in der Tendenz gesteigert werden. Signifikante Unterschiede waren allerdings nicht feststellbar.

#### **3.1.5 <sup>125</sup>I-Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen all-trans-Retinol-Konzentrationen, Methanol, 13-cis-Retinsäure, TSH und der Kombination aus TSH + all-trans-Retinol. Zellen kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium mit 0,6 µM oder 0,1 µM Retinol oder in Vitamin A-freiem Medium.**

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 2,6 nmol; 5,2 nmol und 7,8 nmol Retinol / 200 µl Medium, 10 µl Methanol / 200 µl Medium, 2,6 nmol Retinsäure / 200 µl, 0,26 mU TSH / 200 µl sowie der Kombination aus 0,26 mU TSH / 200 µl + 2,6 nmol Retinol / 200 µl stimuliert. Die stimulierenden Agenzien wurden den

### 3. Ergebnisse

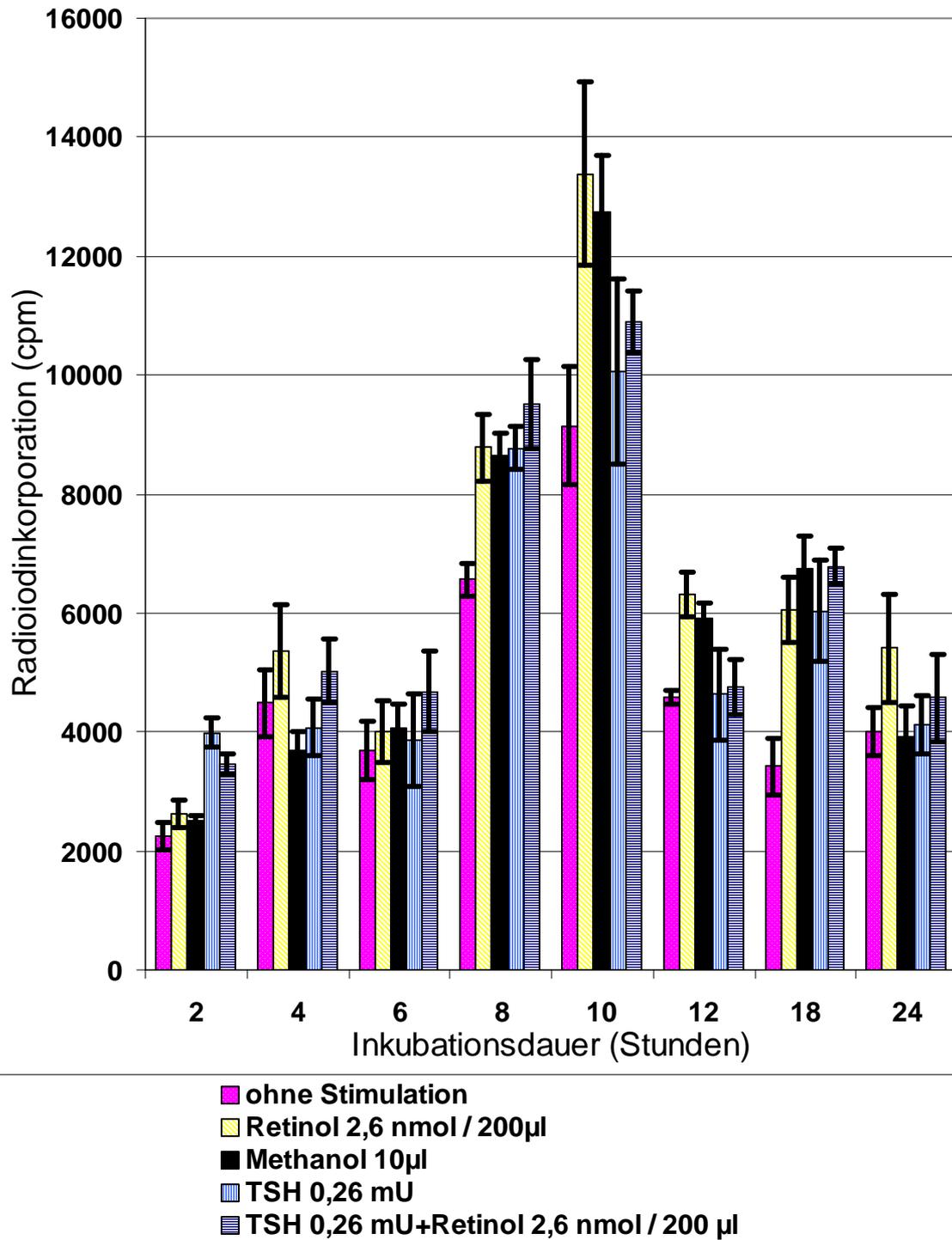
Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht durch o. g. Stimulanzen stimuliert wurden. Die Stimulation ist in folgendem Schema veranschaulicht:



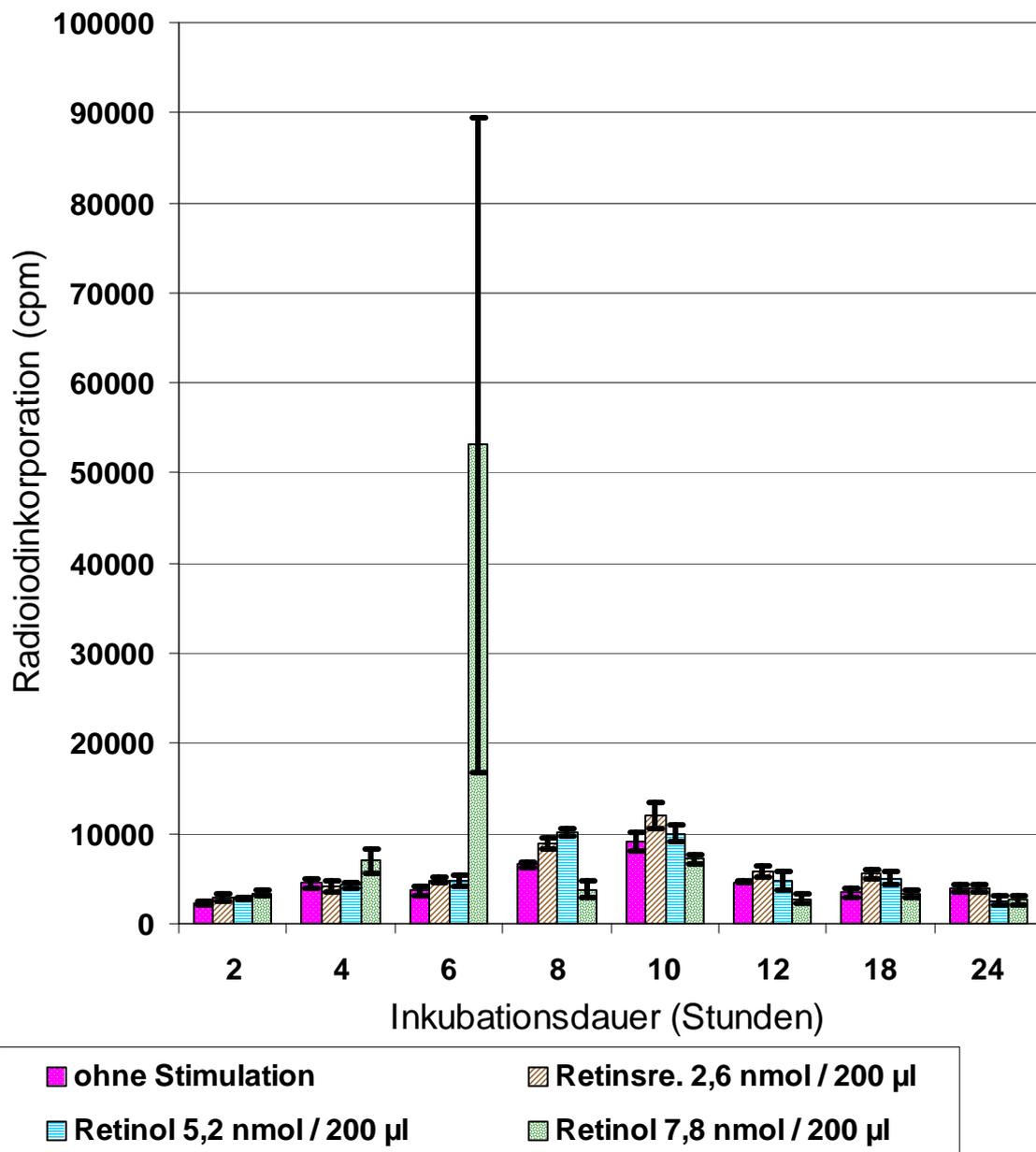
Die Radioiodaufnahme wurde nach 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24 Stunden gemessen. Bezugsgröße für den Vergleich waren die Thyreozyten der Kontrollgruppe. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in Thyreozyten in Abhängigkeit von den Stimulanzenkonzentrationen, den Medien und der Zeit sind in Abb. 8 bis 12 dargestellt.

Die Ergebnisse der Versuche werden als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung  $p < 0,05$  war.

Zur Erhöhung der Übersichtlichkeit wird die Darstellung der Stimulanzengruppen auf die Abbildungen 8 und 9 verteilt.



Legende zu Abb. 8 siehe S. 52



**Abb. 8 und Abb. 9** Einfluss von *all-trans*-Retinol, Methanol, *13-cis*-Retinsäure, TSH und TSH + Retinol auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium ( $0,6 \mu\text{M}$ ). Zugabe der Stimulanzen und des  $^{125}\text{I}$  zur Stunde 0 oder nach 2, 4, 6, 12, 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat (Std. 0) mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 2, 4, 6 Stunden Inkubationsdauer. Alle weiteren Messungen erfolgten so, dass  $^{125}\text{I}$  maximal 6 Stunden auf die Thyreozyten einwirkt. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.

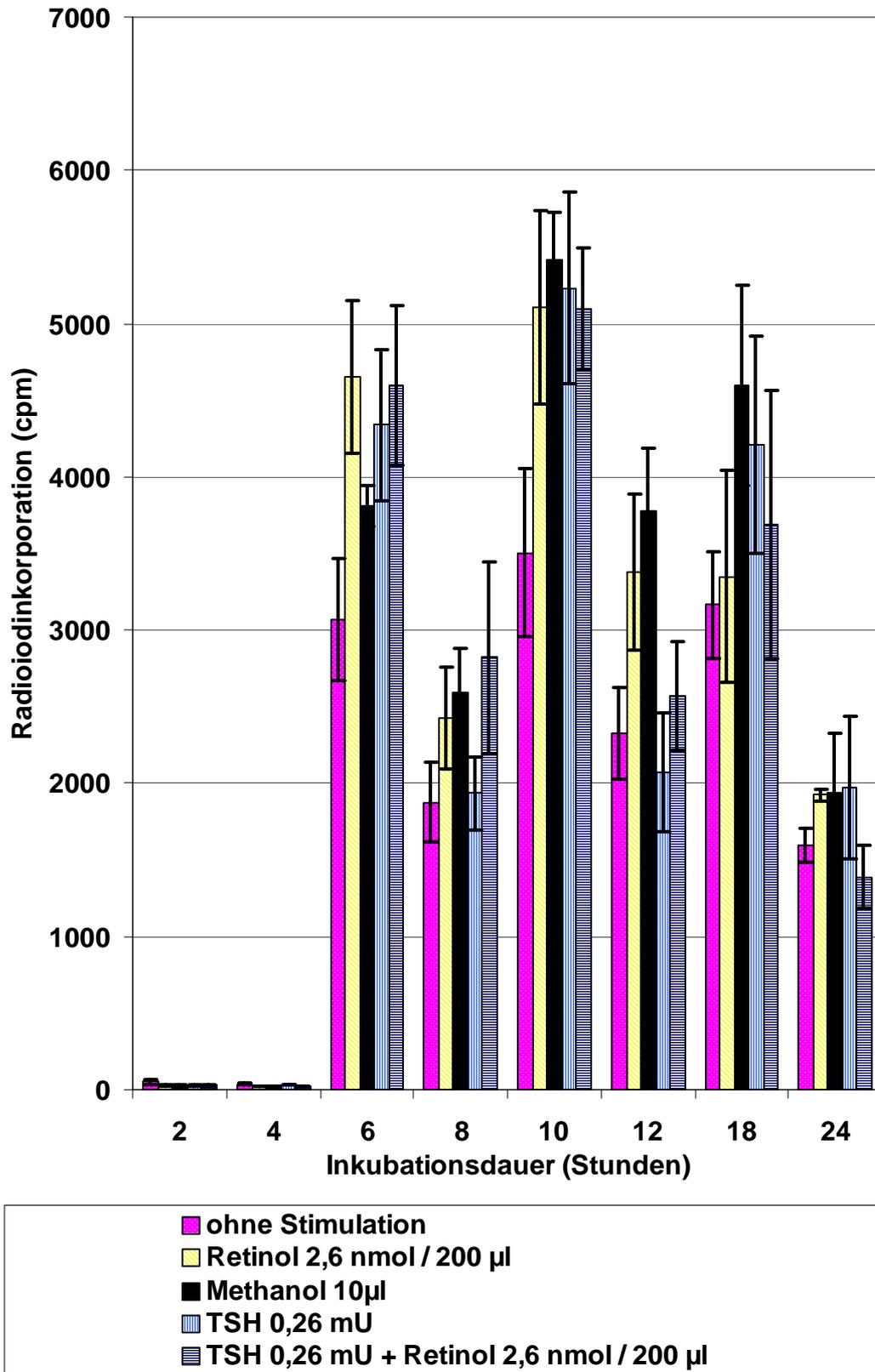
*<sup>125</sup>I-Iodzugabe jeweils: 4 kBq <sup>125</sup>I. Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 8 im Anhang).*

Abb. 8 zeigt, dass es unter Stimulation mit 2,6 nmol all-trans-Retinol / 200 µl über den gesamten Versuchszeitraum im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einer gesteigerten Radioiodaufnahme in die Thyreozyten kommt. Eine ebenfalls gesteigerte Radioiodaufnahme zeigt sich (außer nach 4 und 24 Stunden) bei Stimulation mit 10 µl Methanol, bei Stimulation mit 0,26 mU TSH (ausgenommen nach 4 Stunden) und bei Stimulation der Thyreozyten mit 0,26 mU TSH + 2,6 nmol all-trans-Retinol / 200 µl.

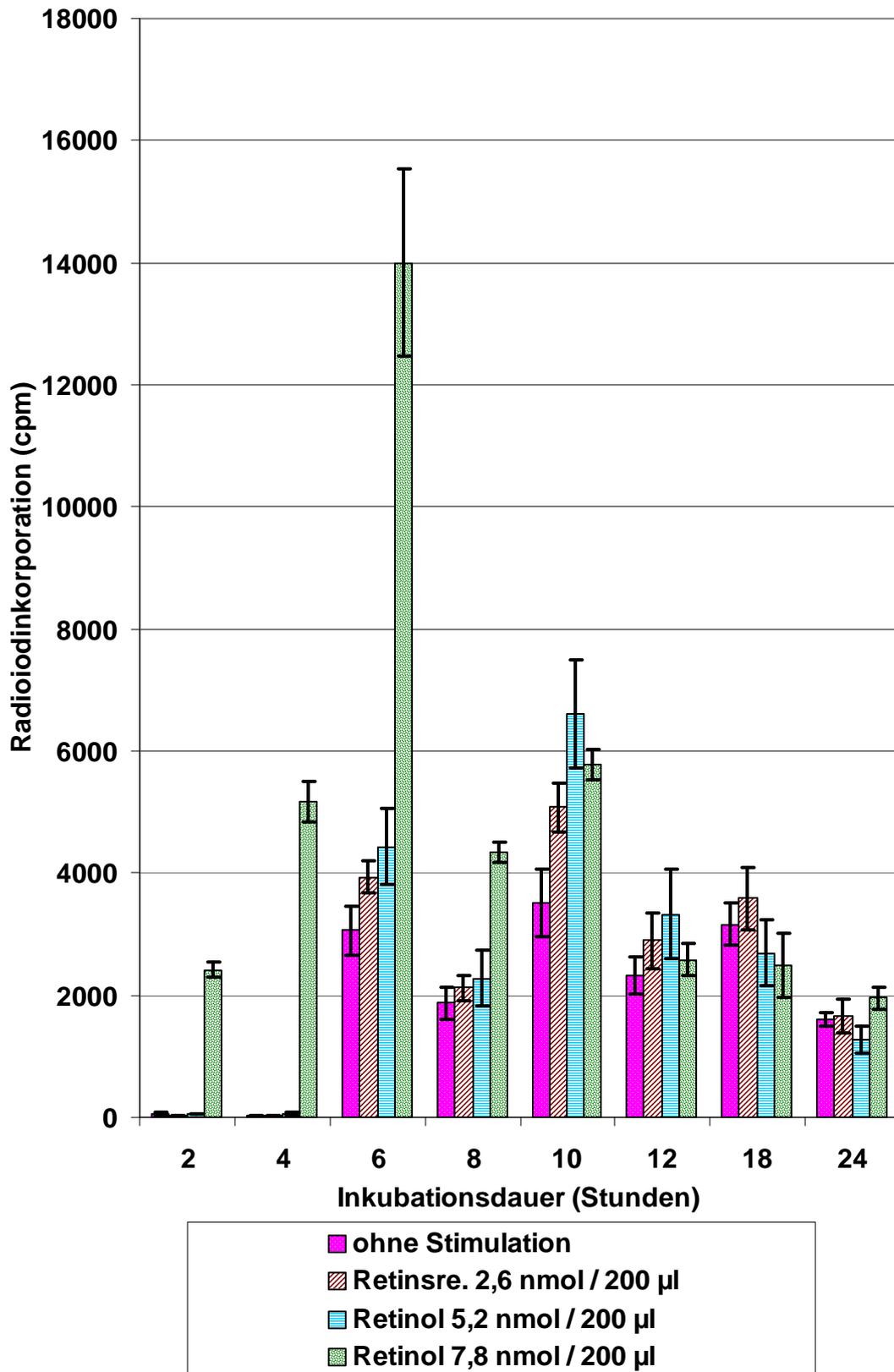
Dauert die Stimulation länger als 10 Stunden, so sinkt die Einbaurrate von Radioiod bei allen Stimulanzien wieder, bleibt aber über dem Niveau der unbehandelten Kontrollkultur.

Nach 18 Stunden Inkubationsdauer zeigt sich wieder ein signifikanter Anstieg der <sup>125</sup>I-Radioiodaufnahme durch die Stimulanzien TSH+Retinol, Methanol, Retinol und TSH.

Eine Konzentration von 7,8 nmol Retinol / 200 µl (Abb. 9) bewirkt nur in den ersten 6 Stunden der Inkubation eine signifikante Zunahme des <sup>125</sup>I-Einbaues in die Thyreozyten und fällt danach unter den Wert der Kontrollgruppe. Nach 10, 12 und 18 Stunden Inkubationsdauer sind weder unter 5,2 nmol Retinol / 200 µl oder 7,8 nmol / 200 µl Medium noch bei 2,6 nmol Retinsäure / 200 µl Medium signifikante Unterschiede der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten feststellbar.



Legende zu Abb. 10 siehe S. 56



Legende zu Abb. 11 siehe S. 56

**Abb. 10 und Abb. 11** Einfluss von all-trans-Retinol, Methanol, 13-cis-Retinsäure, TSH und TSH + Retinol auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Medium. Zugabe der Stimulanzien und des  $^{125}\text{I}$  zur Stunde 0 oder nach 2, 4, 6, 12, 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bei der Aussaat (Std. 0) mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 2, 4 und 6 Stunden Inkubationsdauer. Alle weiteren Messungen zu Stimulationen mit Radioiod erfolgten so, dass Thyreozyten dem  $^{125}\text{I}$  maximal 6 Stunden ausgesetzt sind. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 9 im Anhang).

Wie aus Abb. 10 hervorgeht, zeigen im Untersuchungszeitraum zwischen 6 und 24 Stunden nur jene Kulturen, die mit 10 $\mu\text{l}$  Methanol oder 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  stimuliert wurden, stets eine höhere  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme als die Kontrollen.

Abb. 11 zeigt, dass ein signifikanter Effekt von 7,8 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  auf die  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme nach 6 Stunden Inkubationsdauer sowohl in Vitamin A-freiem als auch in Vitamin A-haltigem Kulturmedium beobachtet werden konnte.

Nach 10 und 12 Stunden Inkubation lässt nur die Stimulation der Thyreozyten mit 5,2 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  eine signifikant gesteigerte Radioiodinkorporation erkennen. Nach 18 und 24 Stunden Inkubationsdauer zeigt keine der verwendeten Stimulanzien eine signifikant gesteigerte  $^{125}\text{I}$ -Radioiodaufnahme gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

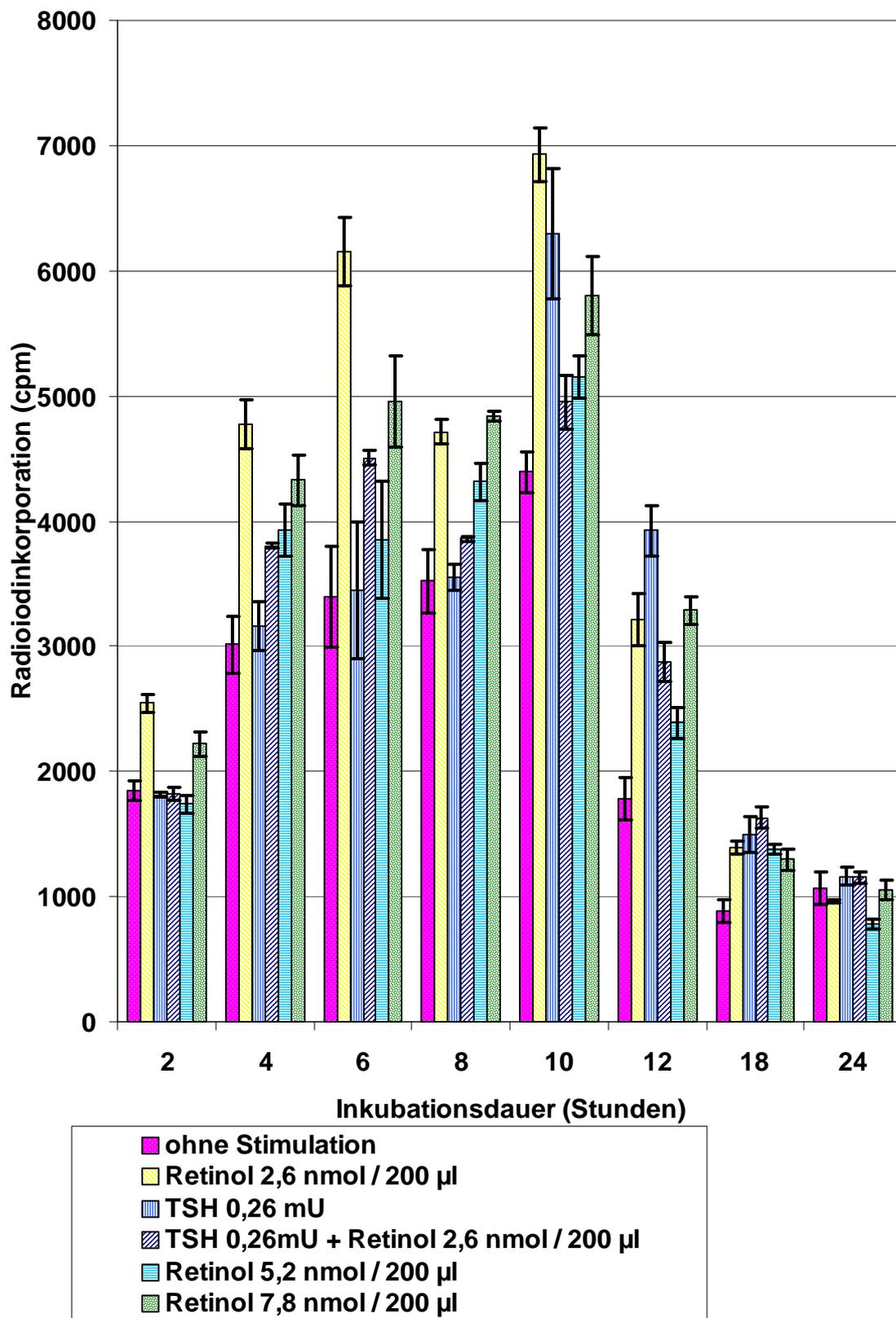


Abb. 12 Einfluss von all-trans-Retinol, Methanol, TSH und TSH + Retinol auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium

*(0,1 µM). Zugabe der Stimulanzen und des <sup>125</sup>I zur Stunde 0 oder nach 2, 4, 6, 12, 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bei der Aussaat (Std. 0) mit <sup>125</sup>I stimuliert wurden, nach 2, 4 und 6 Stunden Inkubationsdauer. Alle weiteren Messungen erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem <sup>125</sup>I ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260.000 Zellen / 200 µl Medium. <sup>125</sup>I-Iodzugabe: 4 kBq <sup>125</sup>I. Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 10 im Anhang).*

Unter Stimulation mit 2,6 nmol Retinol / 200 µl zeigt sich in Abb. 12 nach einer Inkubationsdauer von 10 Stunden eine signifikant gesteigerte <sup>125</sup>I-Inkorporation in Thyreozyten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur. Alle anderen Stimulanzen rufen nach 10 Stunden nur leichte Erhöhungen der Radioiod-Inkorporation im Vergleich zur Kontrollkultur hervor. Nach 12 Stunden Inkubationsdauer beobachtet man bei allen Stimulanzen eine abnehmende <sup>125</sup>I-Radioiodinkorporation, wobei die Stimulation mit TSH +Retinol nun eine signifikant gesteigerte Radioiodinkorporation erkennen läßt.

Nach einer Inkubationsdauer von 18 Stunden tragen alle verwendeten Stimulanzen zu einer signifikanten <sup>125</sup>I-Iodaufnahme gegenüber der Kontrollgruppe bei.

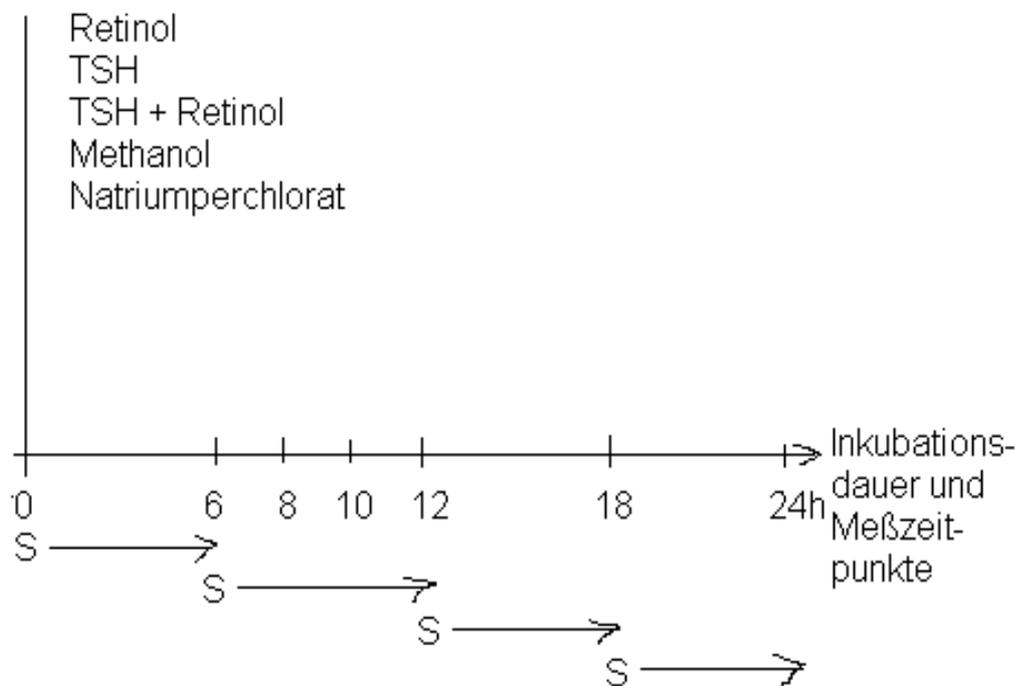
Beim Vergleich der verschiedenen Kulturmedien und ihrem Einfluß auf die Radioiodaufnahme in Thyreozyten (Abb. 8 und Abb. 9) zeigt sich, dass TSH in Medium mit 0,6 µM Vitamin A nach 18 Stunden Inkubationsdauer einen signifikant stärkeren Effekt auf die Radioiod-Inkorporation hat, als TSH in Medium mit niedrigerer Vitamin A-Konzentration. Der Unterschied macht etwa den Faktor 3 aus.

Ein analoger Einfluss zeigt sich bei Stimulation der Thyreozytenkulturen mit TSH und Retinol nach 18 Stunden Inkubation. (Abb. 8, 10, 12)

In Vitamin A-haltigem Medium führt die Stimulation mit TSH und 2,6 nmol Retinol / 200 µl zu einer signifikanten Steigerung der Radioiodaufnahme im Vergleich zu Vitamin A-freiem Kulturmedium oder Kulturmedium mit subnormaler Vitamin A Konzentration (Abb. 8, 10, 12)

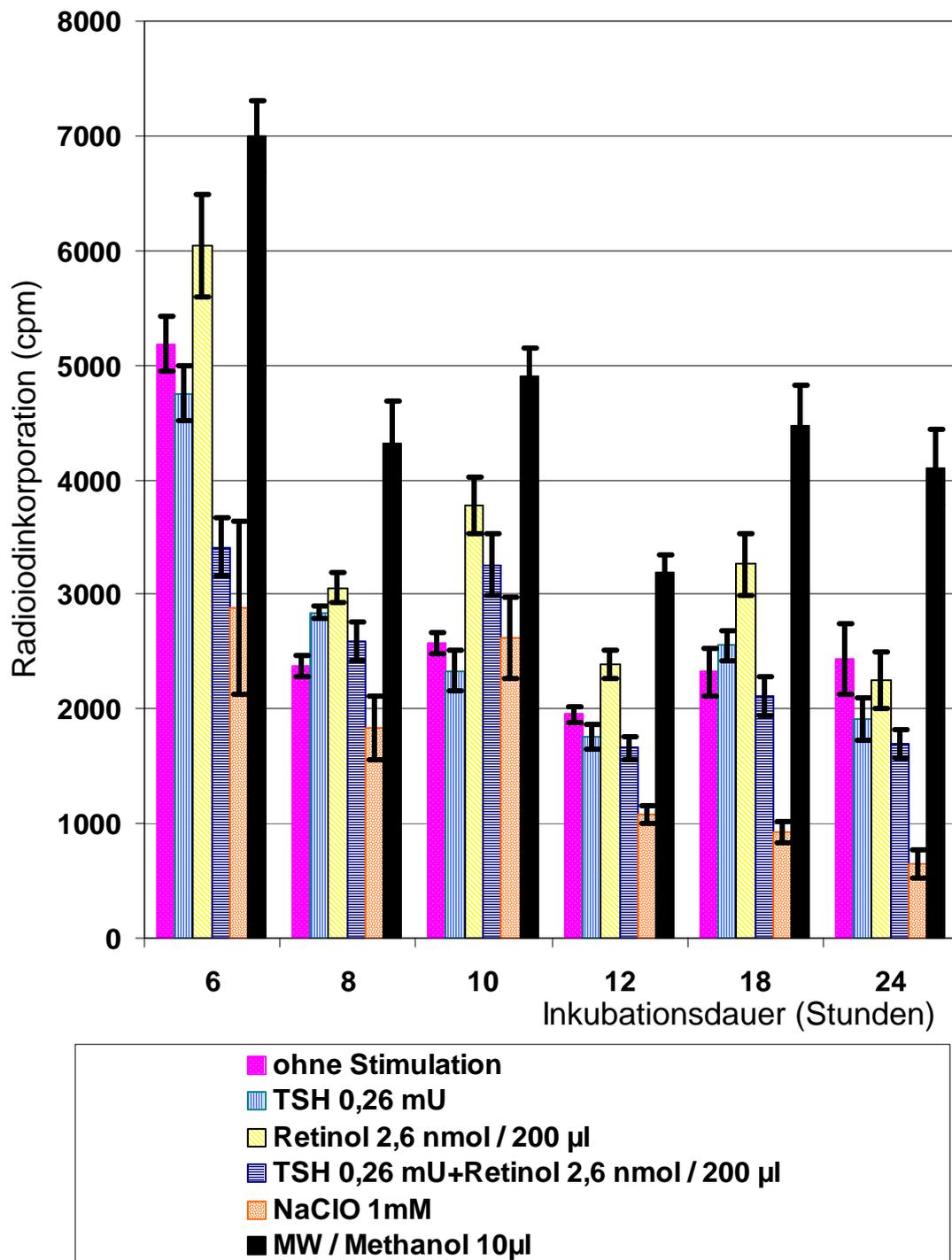
### 3.1.6 $^{125}\text{I}$ -Radioiodaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von all-trans-Retinol oder Methanol oder TSH und der Kombination aus TSH + all-trans-Retinol, sowie Natriumperchlorat, kultiviert in Vitamin A-haltigen (1,8; 0,6; 0,1 $\mu\text{M}$ ) Medien oder in Vitamin A-freiem Medium

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden entweder mit 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  Medium, 0,26 mU TSH / 200  $\mu\text{l}$  Medium oder einer Kombination aus 0,26 mU TSH / 200  $\mu\text{l}$  Medium + 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  Medium oder 10  $\mu\text{l}$  Methanol / 200  $\mu\text{l}$  Medium oder  $\text{NaClO}_4$  (1 mM) stimuliert. Die Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die nicht mit o. g. Agenzien behandelt wurden. Radioiod wurde in zeitlichen Abständen so zugefügt, so dass es nicht länger als 6 Stunden auf die Zellen einwirken konnte. Der Zeitpunkt der Stimulation ergibt sich aus dem folgenden Schema:



S = Stimulation mit Radioiod

Die Radioiodaufnahme wurde somit 6, 12, 18 und 24 Stunden nach Anlegen der Zellkultur gemessen. Die Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der jeweiligen Kontrollgruppe wurden mit jener der zeitlich zugehörigen Gruppen verglichen, die mit Agenzien behandelt wurden. Die Ergebnisse der Radioiod-Inkorporation in Abhängigkeit von den Stimulanzienkonzentrationen, den Medien und der Zeit sind in den Abb. 13 bis Abb. 20 dargestellt. Alle hierfür verwendeten Zellen entstammen der gleichen Präparation. Die Ergebnisse der Versuche werden als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung  $p < 0,05$  war.

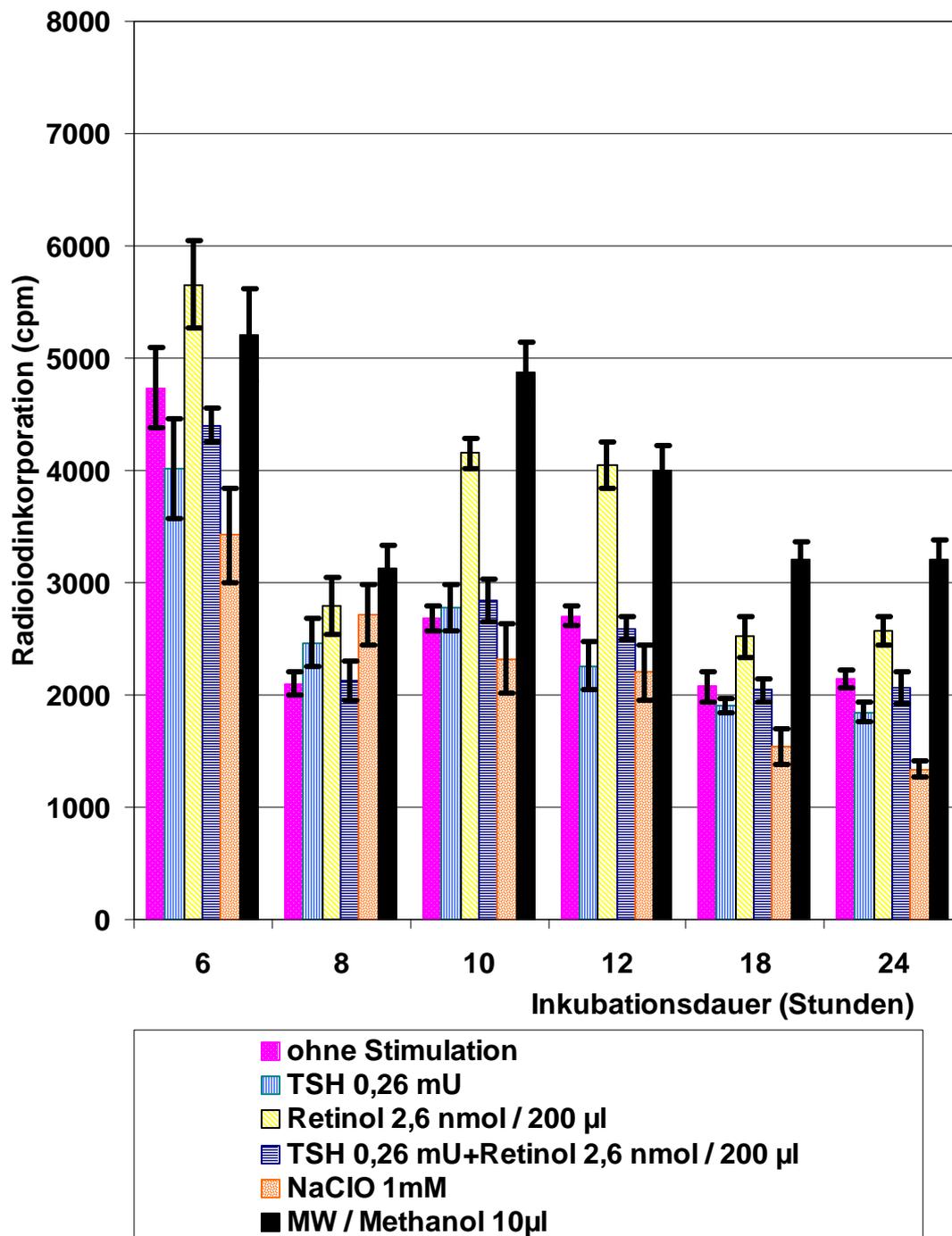


**Abb. 13** Einfluss von all-trans-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium (Vitamin A:  $0,6 \mu\text{M}$ ). Zugabe der Stimulanzen zur Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugaben erfolgen zur Stunde 0 oder nach 6, 12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der

*Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die Messungen der  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Stimulationen mit Radioiod erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem  $^{125}\text{I}$  ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 11 im Anhang).*

Unter Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  reinem Methanol zum Kulturmedium kommt es im Vergleich zur unbehandelten Zellkultur (Abb. 13) zu allen gemessenen Zeiten zu einer signifikanten Steigerung der Radioiodinkorporation. Unter 2,6 nmol Retinol / 200 $\mu\text{l}$  sind die Einbauraten nach 10, 12 und 18 Stunden im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigert. Die Messergebnisse der  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme unter Retinol sind stets niedriger als unter dem Lösungsmittel Methanol. Nach 12 und 24 Stunden kommt es zu einem Abfall der Radioiodaufnahme, allerdings liegt der Messwert unter Stimulation mit 10 $\mu\text{l}$  Methanol noch signifikant über dem der Kontrollgruppe. TSH zeigt keinen signifikanten Effekt im Vergleich zur Kontrolle.

Durch eine kompetitive Hemmung des Natrium-Iodid-Symporters liegt bei einer Stimulation mit  $\text{NaClO}_4$  die Radioiodaufnahme während des Versuchszeitraums deutlich unterhalb der Kontrollkultur. Die Messergebnisse sind nach 6, 12, 18 und 24 Stunden Inkubation signifikant verschieden zur Kontrollkultur.



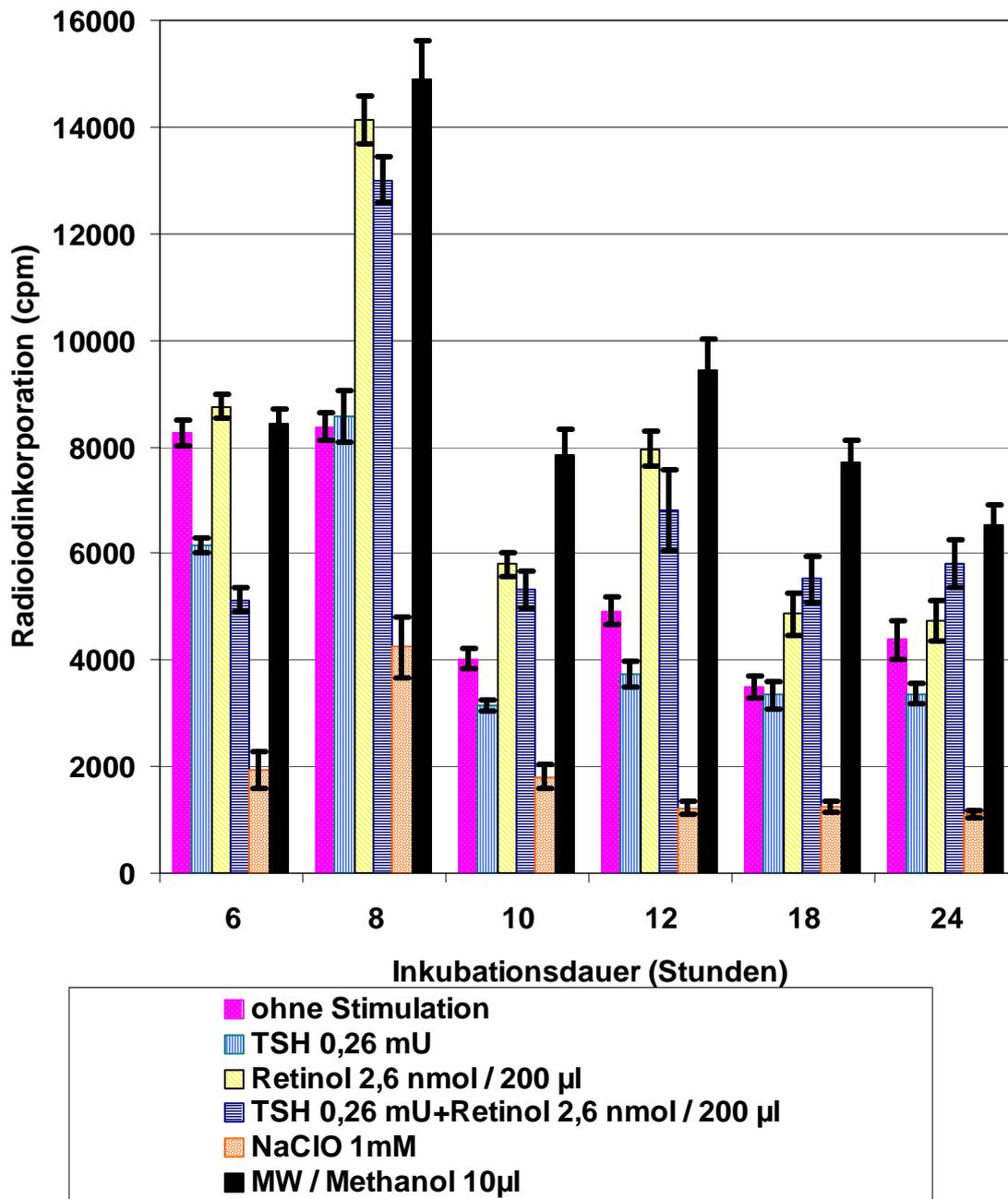
**Abb. 14** Einfluss von *all-trans*-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Medium. Zugabe der Stimulanzien zur Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugabe entweder zur Stunde 0 oder nach 6, 12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die

nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die Messungen der  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Stimulationen mit Radioiod nach 12 und 18 Stunden erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem  $^{125}\text{I}$  ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 12 im Anhang).

Unter Stimulation mit 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  weisen die Thyreozyten zum Messzeitpunkt 10 und 12 Stunden eine signifikant gesteigerte Radioiodinkorporation im Vergleich zur Kontrollkultur auf. Unter Stimulation mit 10  $\mu\text{l}$  Methanol ist die  $^{125}\text{I}$ -Radioiodeinbaurate in kultivierte Thyreozyten nach 8, 10, 18 und 24 Stunden signifikant erhöht.

$\text{NaClO}_4$  hemmt, verglichen mit der Kontrolle, - ausgenommen nach 8 Stunden - den Radioiodeinbau.

Im direkten Vergleich zwischen Vitamin A-freiem und Vitamin A-haltigem Medium, zeigt die 12 Stunden-Einbaurate ohne Stimulation bzw. unter Stimulation mit 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  oder unter 0,26 mU TSH + 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  oder unter  $\text{NaClO}_4$  einen signifikant steigernden Effekt (oft doppelt so hoch) auf den  $^{125}\text{I}$ -Iodeinbau in die Thyreozyten, wenn diese in Vitamin A-freiem Medium kultiviert wurden.

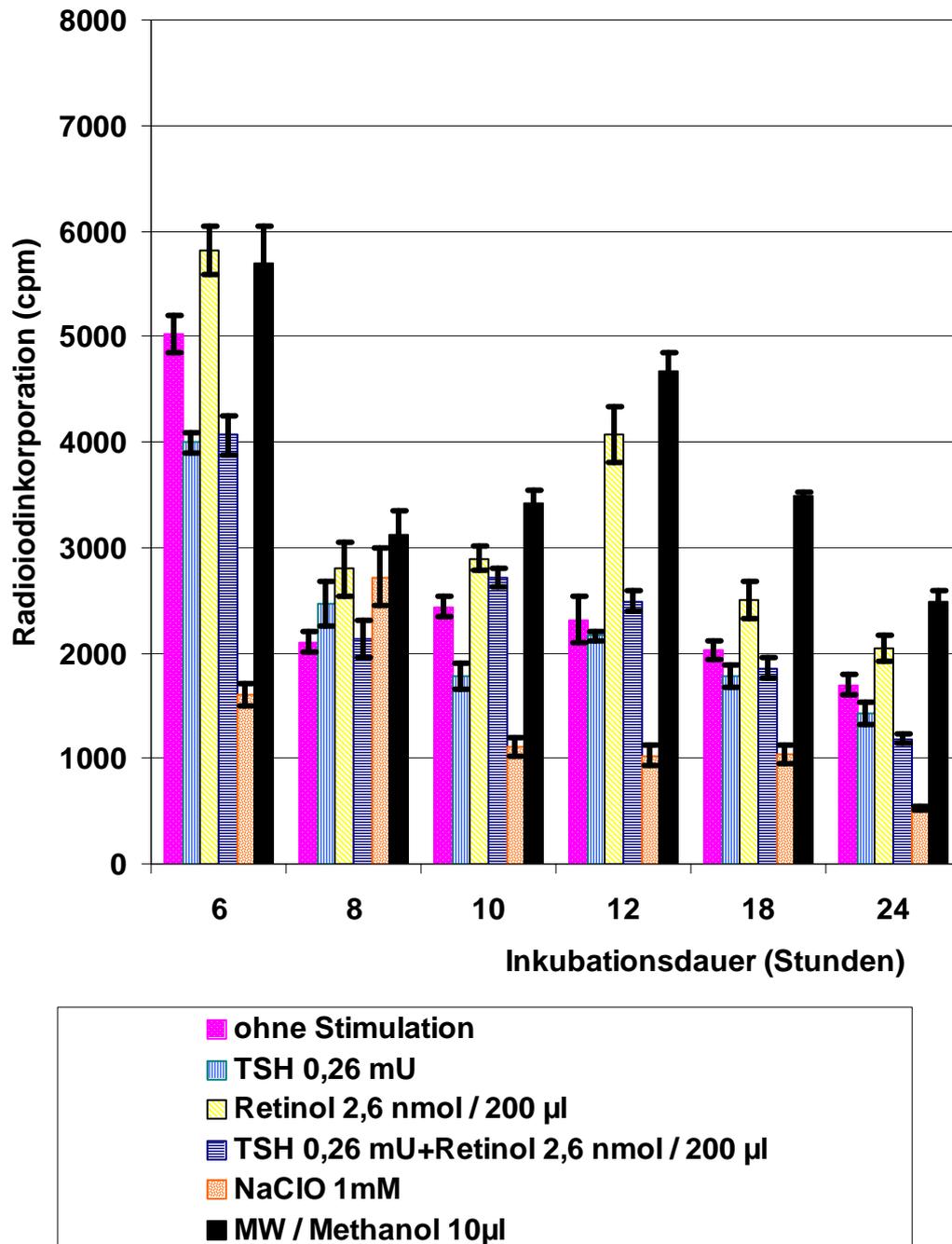


**Abb.15** Einfluss von *all-trans*-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium (Vitamin A:  $1,8 \mu\text{M}$ ). Zugabe der Stimulanzen zur Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugabe entweder zur Stunde 0 oder nach 6, 12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die

*Messungen der  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Stimulationen mit Radioiod nach 12 und 18 Stunden erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem  $^{125}\text{I}$  ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 13 im Anhang).*

Der signifikant verstärkte  $^{125}\text{I}$ -Radioiodeinbau unter 10 $\mu\text{l}$  Methanol, unter 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  und TSH + Retinol nach 8, 10,12 und 18 Stunden Inkubationsdauer gegenüber der Kontrollkultur ist bemerkenswert. Nach 24 Stunden Inkubationsdauer liegen die Einbauraten unter Retinol in der Größenordnung wie jene der unbehandelten Thyreozytenkultur. Die Radioiodinkorporation unter Methanol sowie unter TSH + Retinol liegt auch nach 24 Stunden Inkubation noch signifikant über der der unbehandelten Kontrolle. Während des gesamten Untersuchungszeitraumes liegt die  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme unter Behandlung mit  $\text{NaClO}_4$  signifikant unter dem Niveau der Kontrolle. Es handelt sich hierbei um eine kompetitive Hemmung der Radioiodinkorporation.

Der direkte Vergleich zwischen Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium (Vitamin A 0,6 $\mu\text{M}$ , Abb. 13) und Kulturen in Medium mit 3-fach höherer Vitamin A-Konzentration ( Abb. 15) zeigt zu jedem Messzeitpunkt einen signifikant gesteigerten  $^{125}\text{I}$ -Iodeinbau unter erhöhter Vitamin A-Konzentration. Dies gilt für nicht-stimulierte Thyreozyten, sowie Thyreozyten stimuliert mit 0,26 mU TSH, 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$ , TSH und Retinol sowie 10 $\mu\text{l}$  Methanol .

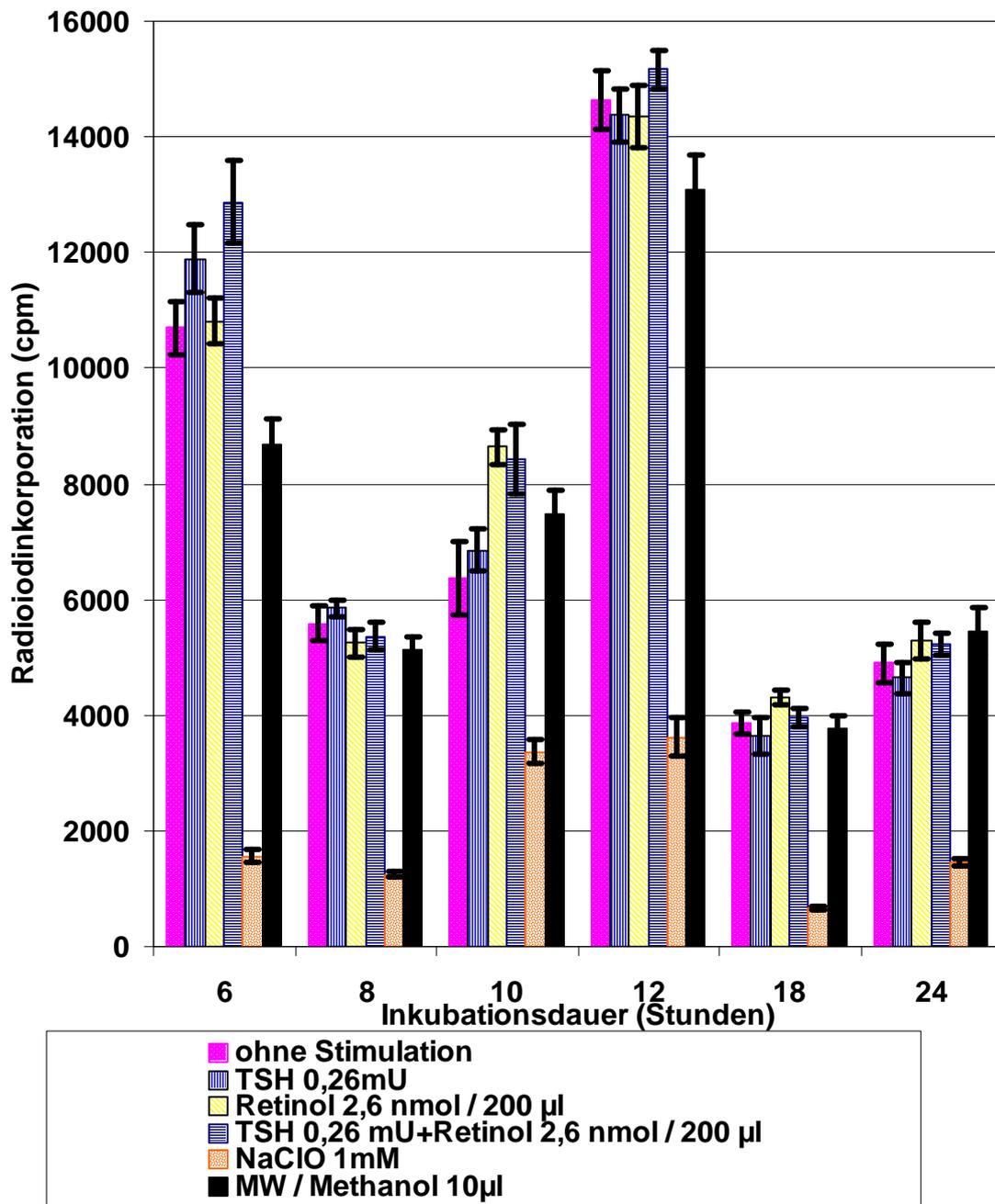


**Abb. 16** Einfluss von *all-trans*-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium mit „subnormaler“ Konzentration ( $0,1 \mu\text{M}$ ). Zugabe der Stimulanzen zur Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugabe entweder zur Stunde 0 oder nach 6,

*12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die Messungen der  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Stimulationen mit Radioiod nach 12 und 18 Stunden erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem  $^{125}\text{I}$  ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 14 im Anhang).*

Wie sich aus Abb. 16 ergibt, liegt die Radioiodinkorporation unter Stimulation mit 10  $\mu\text{l}$  Methanol / 200 $\mu\text{l}$  oder unter 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  ständig über jener der unstimulierten Kontrollkultur. Bei 8,10, 12,18 und 24 Stunden Inkubationsdauer zeigt die Stimulation mit 10  $\mu\text{l}$  Methanol, bei 12, 18 und 24 Stunden Inkubationsdauer die Stimulation mit 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  eine signifikante Steigerung der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrolle. 0,26 mU TSH induziert eine signifikante Abnahme der Iodaufnahme bei 10 Stunden.  $\text{NaClO}_4$  hemmt die Iodidaufnahme signifikant. Eine Ausnahme findet sich hierbei nach 8 Stunden Inkubation.

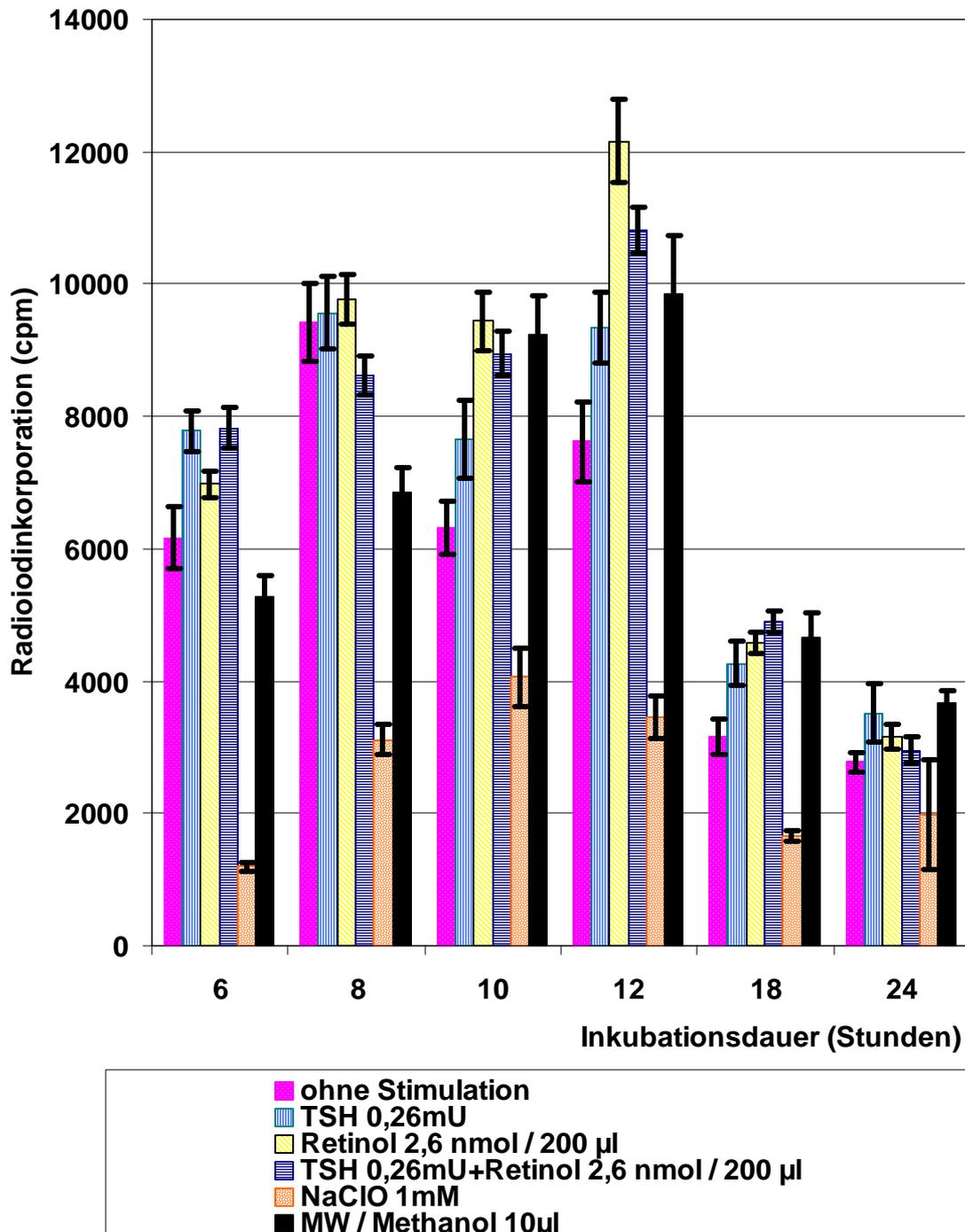
Um die Ergebnisse aus den Abb. 13, 14, 15 und 16 zu verifizieren, wurde der Versuchsansatz zu einem späteren Zeitpunkt an einer anderen Zellpräparation in gleicher Versuchsanordnung wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abb. 17, 18, 19 und 20 dargestellt.



**Abb. 17** Einfluss von all-trans-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium (Vitamin A:  $0,6 \mu\text{M}$ ). Zugabe der Stimulanzen zur

*Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugabe entweder zur Stunde 0 oder nach 6, 12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die Messungen der  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Messungen mit Radioiod nach 12 und 18 Stunden erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem  $^{125}\text{I}$  ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 15 im Anhang). Die Versuchsanordnung ist die gleiche wie in Abb. 13.*

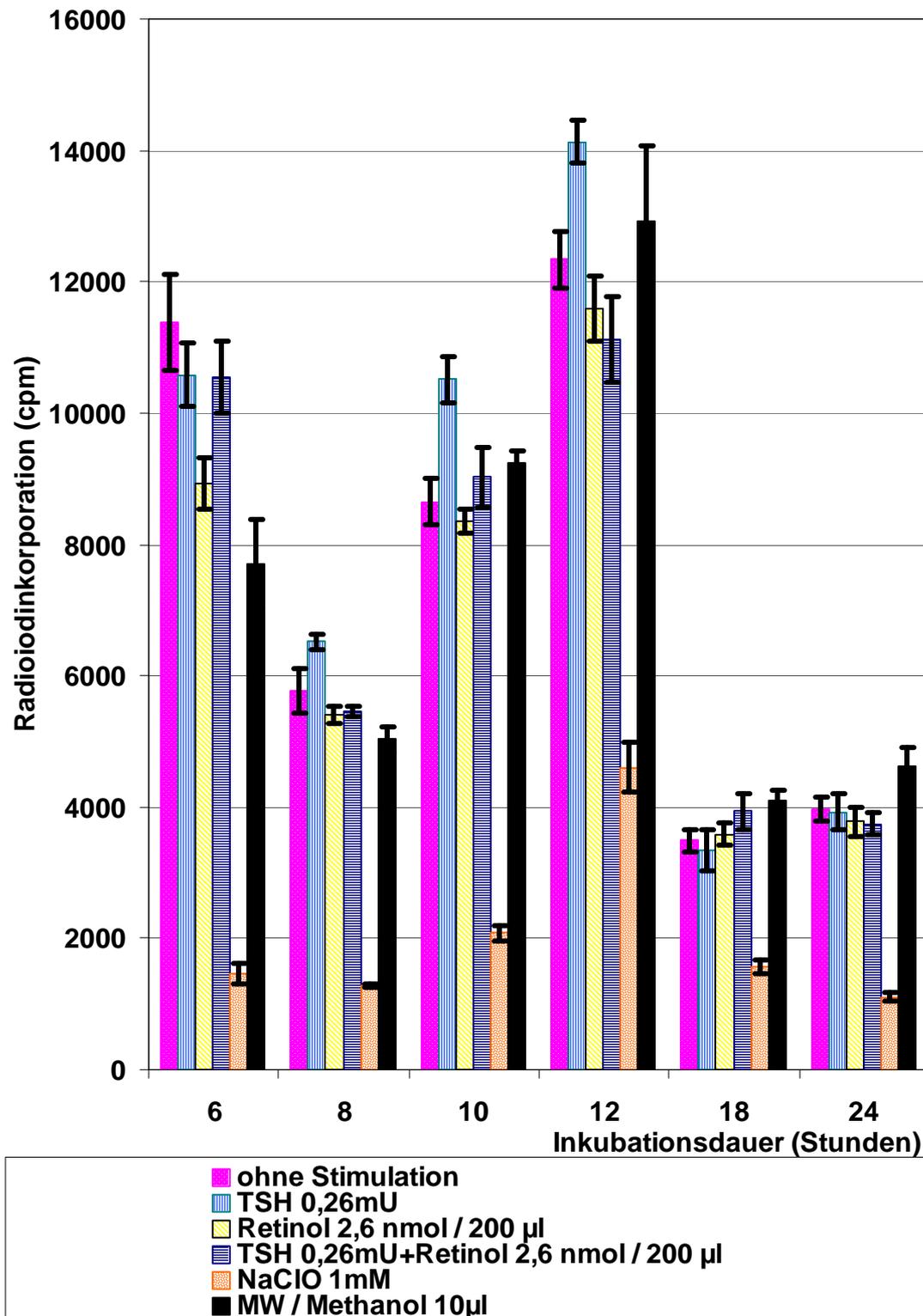
Bei einer Inkubationsdauer von 6, 10, 12, 18 und 24 Stunden ist die Tendenz zu einer gesteigerten  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme in die Thyreozyten in Abb. 17 unter Stimulation mit TSH + 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  erkennbar. Bei 10 Stunden Inkubationsdauer läßt sich unter Stimulation mit 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  und TSH + Retinol eine signifikant gesteigerte Radioiodeinbaurrate im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur feststellen.  $\text{NaClO}_4$  bewirkt durch eine kompetitive Hemmung eine signifikante Abnahme der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrollkultur über den gesamten Versuchszeitraum hinweg.



**Abb. 18** Einfluss von *all-trans*-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Medium. Zugabe der Stimulanzen zur Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugabe entweder zur Stunde 0 oder nach 6, 12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die

*nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die Messungen der <sup>125</sup>I-Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Messungen mit Radioiod nach 12 und 18 Stunden erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem <sup>125</sup>I ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260000 Zellen / 200 µl Medium. <sup>125</sup>I-Iodzugabe: 4 kBq <sup>125</sup>I. Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 16 im Anhang).*

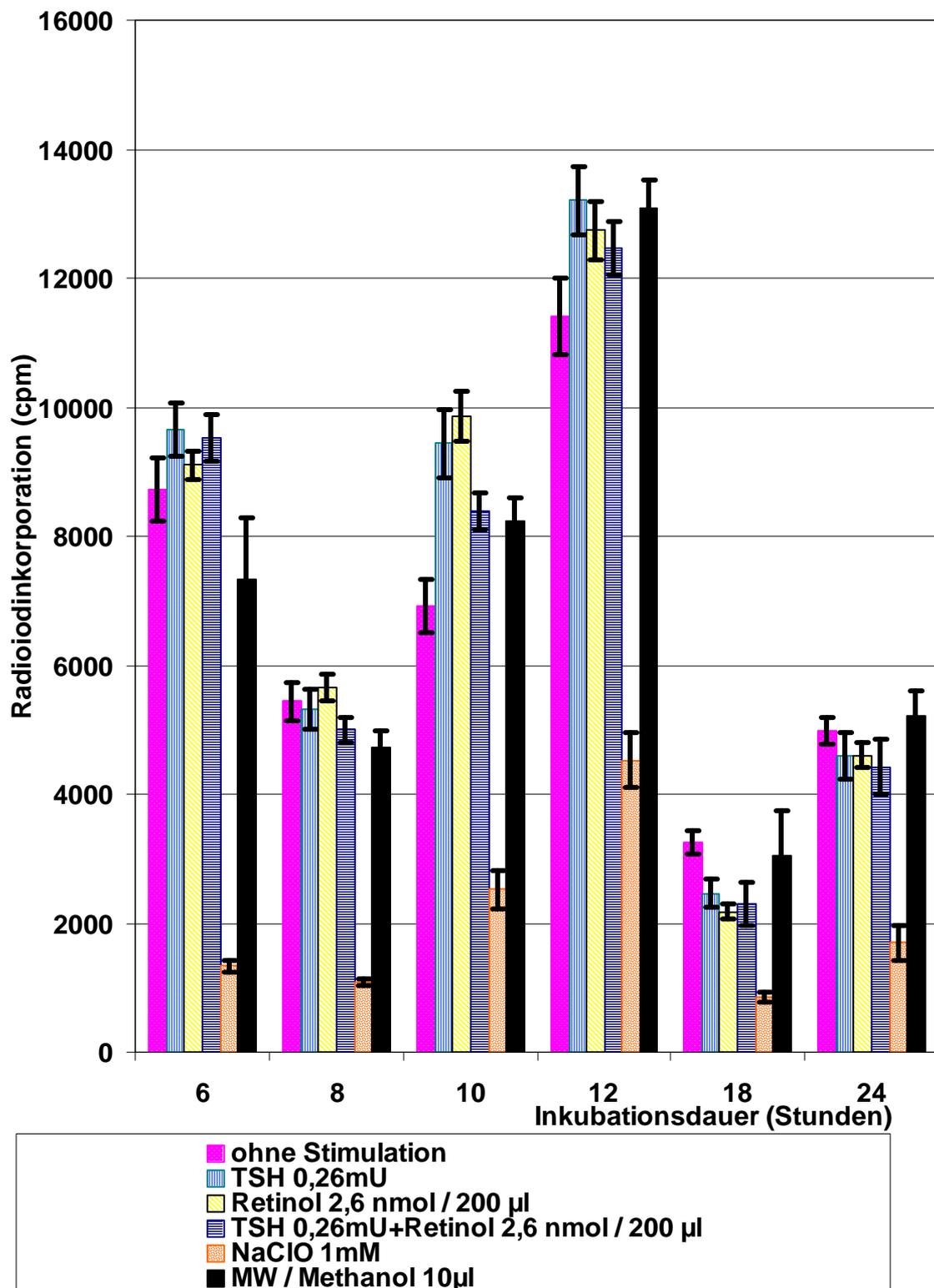
Bei einer Inkubationsdauer von 10, 12 und 18 Stunden kommt es in Abb. 18 unter Stimulation mit 2,6 nmol Retinol / 200 µl bei 6, 10, 12 und 18 Stunden unter TSH + Retinol zu einem signifikanten Anstieg der Radioiodinkorporation; 10µl Methanol steigert nach 10 und 18 Stunden die Iodidaufnahme signifikant gegenüber der Kontrollkultur. Nach 18 Stunden bewirkt die Stimulation mit 0,26 mU TSH eine signifikante Steigerung des Iodideinbaus gegenüber der Kontrolle. NaClO<sub>4</sub> hemmt über den gesamten Versuchszeitraum hinweg die Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrollkultur signifikant.



**Abb. 19** Einfluss von *all-trans*-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium (Vitamin A:  $1,8 \mu\text{M}$ ). Zugabe der Stimulanzen zur

*Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugabe entweder zur Stunde 0 oder nach 6, 12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die Messungen der  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Stimulationen mit Radioiod erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem  $^{125}\text{I}$  ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM (n=5). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 17 im Anhang).*

Wie aus Abb. 19 hervorgeht, bewirkt  $\text{NaClO}_4$  über den gesamten Versuchszeitraum durch eine kompetitive Hemmung eine signifikante Abnahme der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrollkultur. Nach 12 und 24 Stunden Inkubationsdauer ist eine Tendenz zur gesteigerten Radioiodaufnahme durch Stimulation mit 0,26 mU TSH im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu erkennen, nach 8 und 10 Stunden wird dieser Unterschied signifikant. Nach 10, 12, 18 und 24 Stunden läßt sich eine gesteigerte  $^{125}\text{I}$ -Einbaurrate unter Stimulation mit 10  $\mu\text{l}$  Methanol / 200 $\mu\text{l}$  gegenüber der Kontrolle feststellen, bei 6 und 8 Stunden ist der Radioiodeinbau sogar signifikant gesteigert.



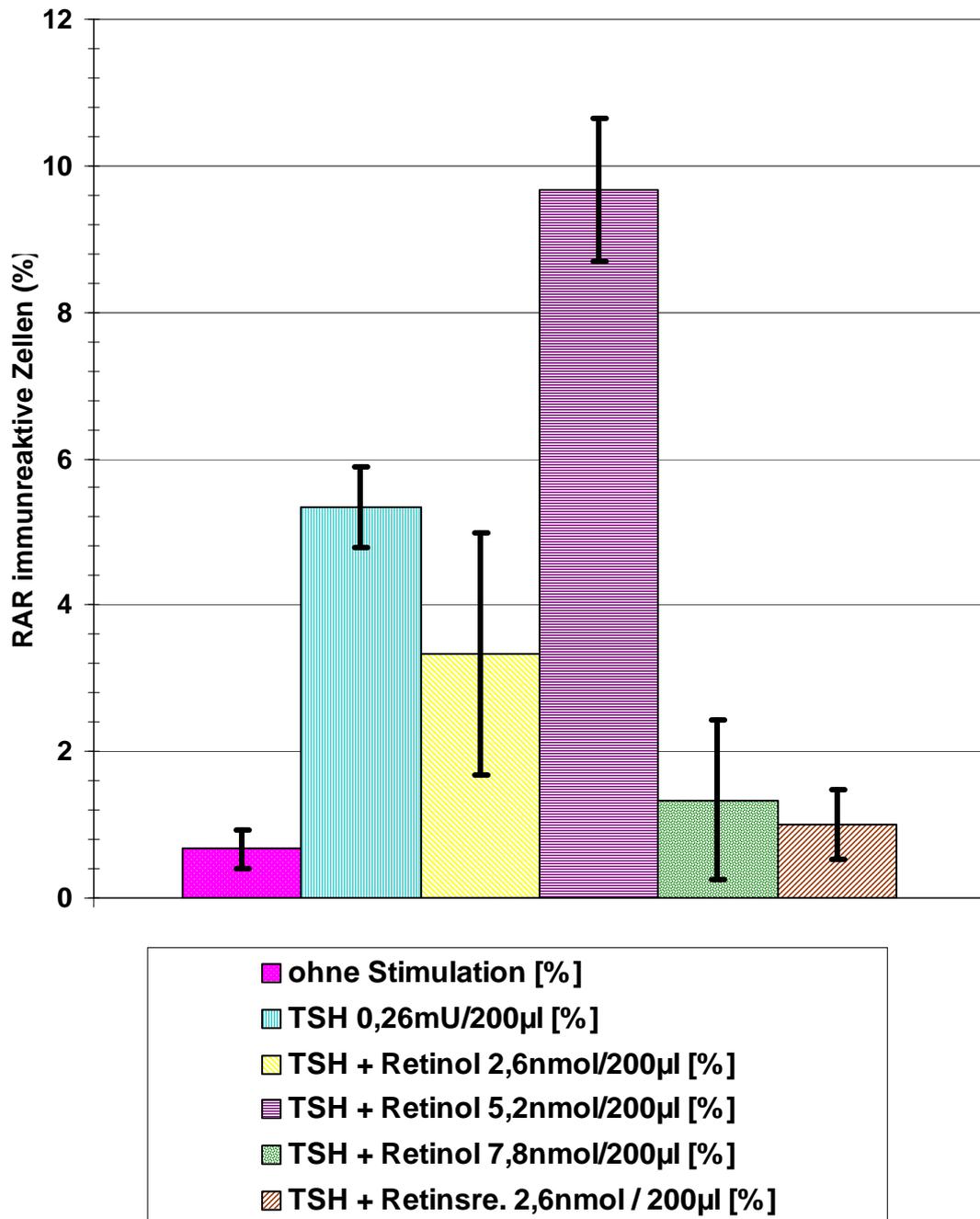
**Abb. 20** Einfluss von all-trans-Retinol, Methanol, TSH, TSH + Retinol sowie Natriumperchlorat auf den  $^{125}\text{I}$ -Einbau in Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-haltigem Medium subnormaler Konzentration (Vitamin A:  $0,1 \mu\text{M}$ ). Zugabe der Stimulanzen zur Stunde 0.  $^{125}\text{I}$ -Zugabe entweder zur Stunde 0 oder

*nach 6, 12 und 18 Stunden. Gemessen wurde die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die bereits bei der Aussaat mit  $^{125}\text{I}$  stimuliert wurden, nach 6 Stunden Inkubationsdauer. Bei den Thyreozyten, die nach 6 Stunden mit Radioiod stimuliert wurden, erfolgten die Messungen der  $^{125}\text{I}$ -Iodaufnahme nach 8, 10, 12 Stunden. Die weiteren Stimulationen mit Radioiod erfolgten so, dass die Thyreozyten maximal 6 Stunden dem  $^{125}\text{I}$  ausgesetzt waren. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 260 000 Zellen / 200  $\mu\text{l}$  Medium.  $^{125}\text{I}$ -Iodzugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . Dargestellt sind Mittelwert, SEM ( $n=5$ ). (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 18 im Anhang).*

In Abb. 20 kommt es über den gesamten Versuchszeitraum unter  $\text{NaClO}_4$  durch eine kompetitive Hemmung zu einer signifikanten Abnahme der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrollkultur. Eine Stimulation mit 2,6 nmol Retinol / 200  $\mu\text{l}$  bzw. 0,26 mU TSH steigert nach 10 Stunden Inkubationsdauer die Radioiodidaufnahme in die Thyreozyten gegenüber der Kontrollkultur signifikant.

#### **3. 2. Einfluss von TSH, von TSH + all-trans-Retinol und von TSH + 13-cis-Retinsäure auf den $\text{RAR}\alpha$ - / $\text{RXR}\alpha$ -Rezeptor von Schweinethyreozyten die in Vitamin A-haltigem (Vitamin A: 0,6 $\mu\text{M}$ ) oder Vitamin A-freiem Medium kultiviert wurden.**

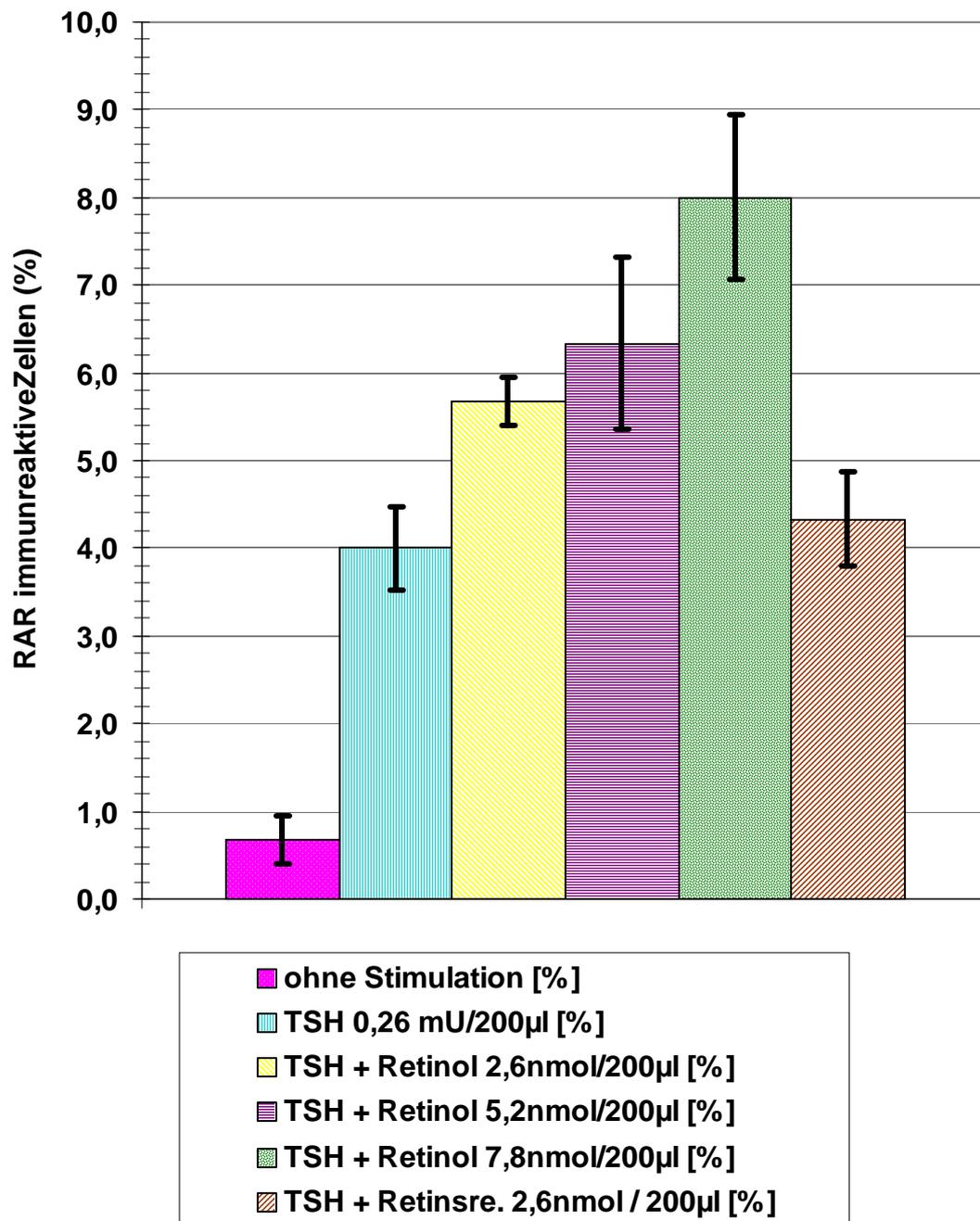
Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 0,26 mU TSH, der Kombination aus 0,26 mU TSH + all-trans-Retinol (2,6; 5,2; 7,8 nmol / 200  $\mu\text{l}$  Medium) oder mit 0,26 mU TSH + 2,6 nmol 13-cis-Retinsäure / 200  $\mu\text{l}$  stimuliert. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die weder durch TSH, noch durch Retinoide stimuliert wurden. Die Stimulation erfolgte über 72 Stunden. Die Ergebnisse sind in den Abb. 21 und 22 dargestellt.



**Abb. 21** Einfluss von TSH, der Kombination von TSH und unterschiedlichen all-trans-Retinol Konzentrationen sowie der Kombination aus TSH und 13-cis-Retinsäure auf die immunhistochemische Darstellung des RAR-Rezeptors von Schweinethyreozyten, kultiviert Medium mit 0,6 µM Vitamin A. Zugabe der Stimulanzen bei der Aussaat. Stimulationsdauer: 72 Stunden. Dargestellt sind

*Mittelwert und SEM des Anteils der RAR-positiven Thyreozyten aus drei Zellzählungen. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 3000000 Zellen / 4500 µl Medium.*

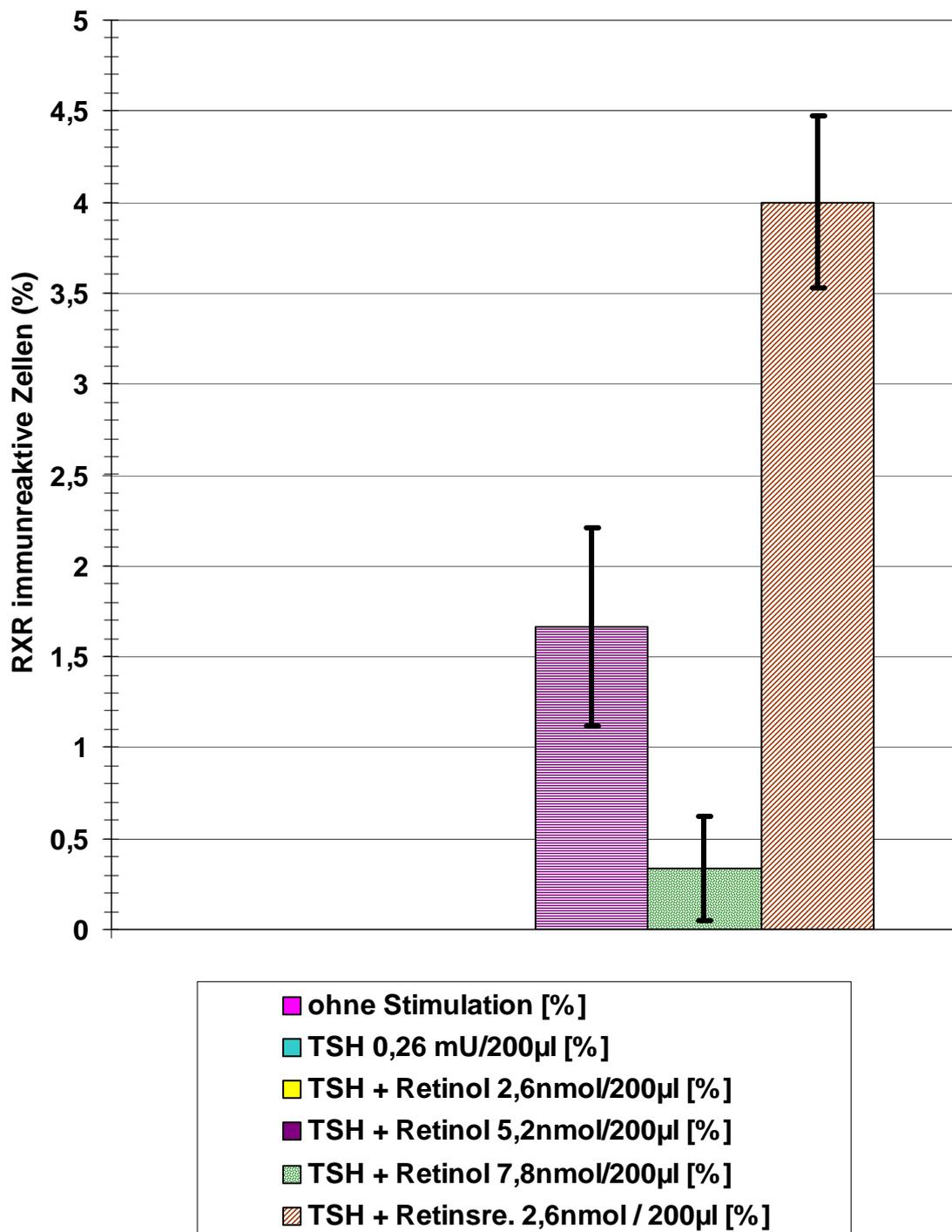
Wie Abb. 21 zeigt, sind in Vitamin A-haltigem Medium fast 10% der Zellen RAR-positiv markiert, wenn sie simultan mit 0,26 mU TSH + 5,2 nmol Retinol / 200 µl stimuliert wurden. Nur 5,3% der Thyreozyten sind RAR-immunreaktiv, wenn sie mit 0,26 mU TSH stimuliert wurden und 3,3% der Zellen sind enzymmarkiert, wenn sie mit TSH + 2,6 nmol Retinol / 200 µl stimuliert wurden.



**Abb. 22** Einfluss von 0,26 mU TSH, der Kombination von TSH und unterschiedlichen all-trans-Retinol Konzentrationen sowie der Kombination aus TSH und 13-cis-Retinsäure auf die immunhistochemische Darstellung des RAR-Rezeptors von Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Kulturmedium. Zugabe der Stimulanzen bei der Aussaat. Stimulationsdauer: 72 Stunden. Dargestellt sind Mittelwert und SEM des Anteils der RAR-positiven

*Thyreozyten aus drei Zellzählungen. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 3000000 Zellen / 4500 µl Medium.*

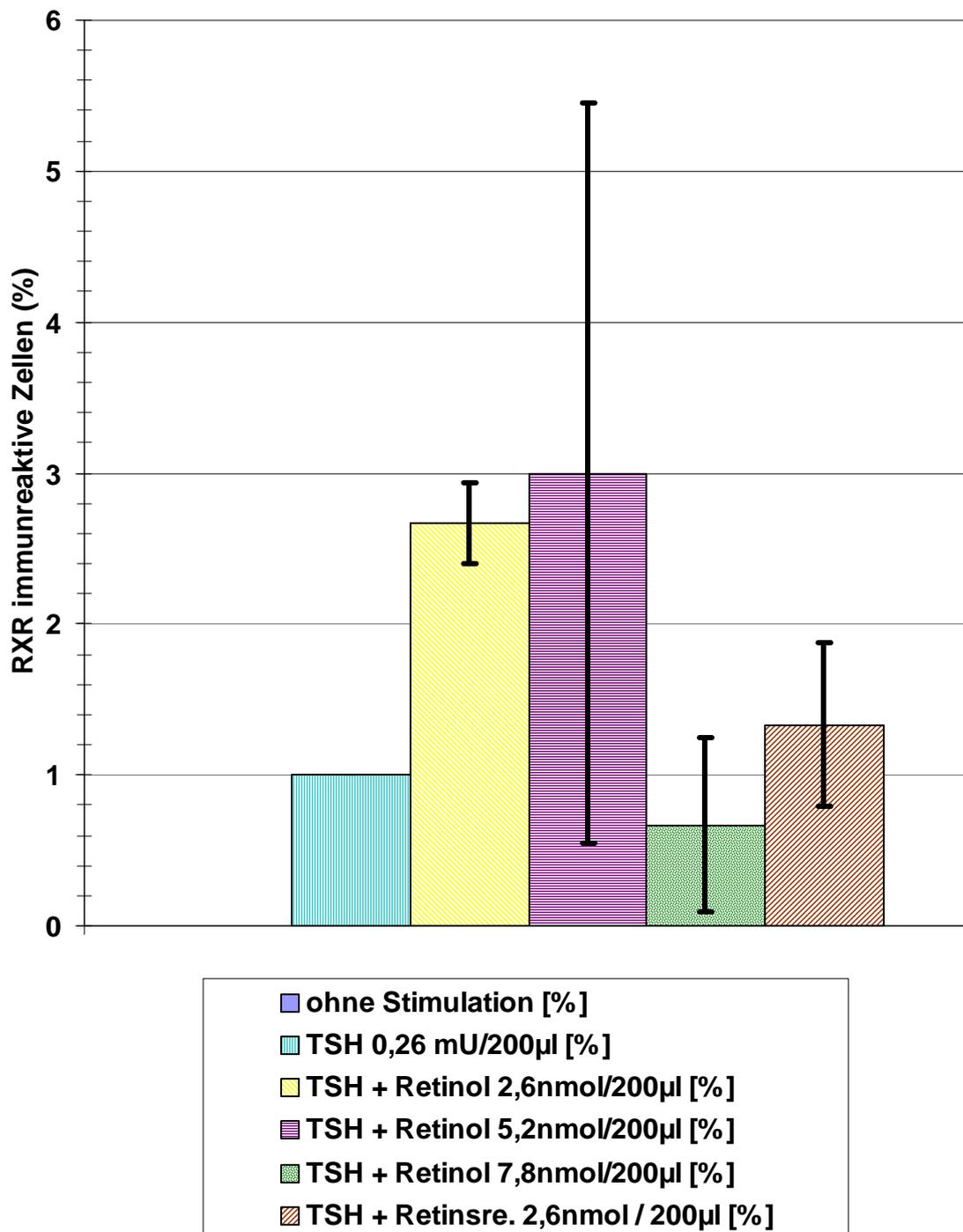
Wie Abb. 22 zeigt, sind in Vitamin A-freiem Medium bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 7,8 nmol Retinol / 200 µl 8% der Zellen, bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 5,2 nmol Retinol / 200 µl 6,3% der Zellen und bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 2,6 nmol Retinol / 200 µl 5,7% der Zellen RAR-immunreaktiv. Die Anzahl der RAR-immunreaktiven Zellen liegt unter 0,26 mU TSH + 2,6 nmol Retinsäure / 200 µl bei 4,3%. Unter 0,26 mU TSH sind 4% der Thyreozyten RAR-immunreaktiv. Ohne Stimulation sind nur 0,7% der Thyreozyten RAR-immunreaktiv.



**Abb. 23** Einfluss von TSH, der Kombination von TSH und unterschiedlichen all-trans-Retinol Konzentrationen sowie der Kombination aus TSH und 13-cis-Retinsäure auf die immunhistochemische Darstellung des RXR-Rezeptors von Schweinethyreozyten, kultiviert Medium mit 0,6 µM Vitamin A. Zugabe der Stimulanzen bei der Aussaat. Stimulationsdauer: 72 Stunden. Dargestellt sind

*Mittelwert und SEM des Anteils der RXR-positiven Thyreozyten aus drei Zellzählungen. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 3000000 Zellen / 4500 µl Medium.*

Wie Abb. 23 zeigt, können in Vitamin A-haltigem Medium bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 5,2 nmol Retinol / 200 µl nur 1,7%, bei 0,26 mU TSH + 7,8 nmol Retinol / 200 µl nur 0,3% und bei 0,26 mU TSH + 2,6 nmol Retinsäure / 200 µl 4% der Zellen als RXR-positiv beurteilt werden. Die Proben ohne Stimulation sowie jene unter 0,26 mU TSH und 0,26 mU TSH + 2,6 nmol Retinol / 200 µl lassen keine immunreaktiven Rezeptoren erkennen.



**Abb. 24** Einfluss von TSH, der Kombination von TSH und unterschiedlichen all-trans-Retinol Konzentrationen sowie der Kombination aus TSH und 13-cis-Retinsäure auf die immunhistochemische Darstellung des RXR-Rezeptors von Schweinethyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Kulturmedium. Zugabe der Stimulanzen bei der Aussaat. Stimulationsdauer: 72 Stunden. Dargestellt sind

*Mittelwert und SEM des Anteils der RXR-positiven Thyreozyten aus drei Zellzählungen. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch 3000000 Zellen / 4500 µl Medium.*

In Abb. 24 sind in Vitamin A-freiem Medium bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 5,2 nmol Retinol / 200 µl 3% der Thyreozyten, bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 2,6 nmol Retinol / 200 µl 2,7%, bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 2,6 nmol Retinsäure / 200 µl 1,3%, bei Stimulation mit 0,26 mU TSH 1% und bei Stimulation mit 0,26 mU TSH + 7,8 nmol Retinol / 200 µl 0,7% der Zellen RXR-immunreaktiv. Die Probe ohne Stimulation weist keine immunreaktiven RXR-Rezeptoren auf.

## 4. Diskussion

### 4.1 Methoden

Untersuchungen an Zellkulturen sind dann besonders aussagekräftig, wenn das in-vitro-System möglichst viele in-vivo Merkmale aufweist. Unsere Primärkulturen aus Schweineschilddrüsen stellen ein solches Kultursystem mit in-vivo Merkmalen dar. Von Nachteil ist hierbei allerdings, daß für jede Untersuchungsreihe immer neue Kulturen angelegt werden müssen.

Die Verwendung von NCTC-Medium ermöglicht bei unseren Thyreozyten-Primärkulturen bei Stimulation mit TSH oder cAMP eine Aggregation der isolierten Zellen zu dreidimensionalen follikelartigen Strukturen (Wahl et al. 1996). Dabei bilden sich Follikel mit richtiger Polarität, jedoch ohne eine Basalmembran aus. Die Vorteile des NCTC-Mediums, durch TSH eine Follikelbildung zu erreichen, wurden Anfang der 80er Jahre durch Fayet et al. (1982) beschrieben. Die Kultivierung von isolierten Schilddrüsenfollikeln, wie von Gärtner et al. (1985) erläutert, ist eine andere Möglichkeit der Thyreozytenkultur. Auch hier geht den Follikeln bei ihrer Isolierung während der Perfusion der Schilddrüse mittels Kollagenase die Basalmembran verloren (Martin 1994).

Unser Schilddrüsengewebe für die Primärkulturen wurde direkt aus dem Schlachthof bezogen. Damit besteht das Risiko einer Kontamination durch Mikroorganismen. Durch sterile Arbeitsweise und Verwendung antibiotika- / antimykotikahaltiger Medien wurde unsererseits vorgebeugt.

Der Iodgehalt der Schweineschilddrüsen kann fütterungsbedingt erheblich differieren. Da Schweine oft Raps und Maniok als Zufütterung erhalten, kann beispielsweise eine Strumaentstehung gefördert werden und sich auf die in Primärkulturen gehaltenen Thyreozyten und deren Stoffwechsel auswirken.

Ebenfalls kann die stetige Optimierung der Schweinerassen durch ständiges Einkreuzen die Ergebnisse der Zellkulturen beeinflussen. Ergebnisse innerhalb einer zeitlich ausgedehnten Untersuchungsreihe können hierdurch verfälscht werden.

Für unsere Untersuchungen zum Einfluß der Retinoide auf kultivierte Thyreozyten ist es naheliegend, primär retinoidfreies Medium zu verwenden. Hierzu stand uns eine Sonderanfertigung des NCTC-Mediums ohne Vitamin A-Zusatz zur Verfügung, die es ermöglichte, Stoffwechseleffekte in primär retinoidfreien Kulturen zu erfassen und die Vitamin A-Konzentration über einen breiten Konzentrationsbereich zu variieren. Die meisten handelsüblichen Kulturmedien enthalten eine Konzentration von bis zu  $10^{-6}$ M Vitamin A.

### **4.2 $^{125}$ I-Radioiodaufnahme in Thyreozyten unter dem Einfluß von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure, Methanol und TSH bei unterschiedlich hohen Vitamin A-Basis-Konzentrationen des Kulturmediums.**

Vitamin A und seine Derivate, die Retinoide, modulieren Wachstum und Differenzierung einer Vielzahl von Zellen (Hanck 1991). Ihre Wirkung auf die Zellen wird über geeignete Kernrezeptoren vermittelt. Es handelt sich hierbei um die Retinoat-Rezeptoren RAR und RXR an welche die Retinoide binden. Meist wird hierzu Retinol in Retinsäure umgewandelt. Diese Rezeptoren regeln die Genexpression und sind für Wachstum und Differenzierung zuständig (Jetten et al. 1979; Pemrick et al. 1994) und bilden im aktiven Zustand Homo- und Heterodimere.

Schon 1947 berichtete Simkins (Simkins 1947) über Erfolge der Strumatherapie mittels Retinoiden. Der Erfolg ist einerseits durch verstärkte intrathyreoidale Iodidanreicherung, andererseits durch Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose, zu erklären (Wahl et al. 1996; Froehlich und Wahl 1999; Brtko und Thalhamer 2003). Simkins Therapie zur Strumabehandlung ist heute aufgrund gravierender toxischer Nebenwirkungen der Retinoide obsolet.

Zur Optimierung der Radioiodtherapie follikulärer Schilddrüsenmalignome wird heute häufig all-trans-Retinsäure eingesetzt (Schmutzler et al. 2002). Diesen follikulären Malignomen fehlt meist die Fähigkeit zur Radioiodspeicherung. Unter einer Retinoidbehandlung können diese Malignome zur Wiederaufnahme von Iod durch Reexpression des Natrium-Iodid-Symporters befähigt werden. Damit werden sie einer Radioiodtherapie zugänglich (Schreck et al. 1994;

Schmutzler et al. 1996; Simon et al. 1996; Spitzweg et al. 2002). Der Defekt im Iodidtransport ist hierbei auf den basolateralen Zellpol beschränkt. Bei papillären Karzinomen liegt eine Störung des apikalen Iodidtransportes vor (Gerard et al. 2003). Kroll et al. beschreiben 2000 als genetischen Ursprung der follikulären Schilddrüsenmalignome eine chromosomale Dislokation durch die PAX8-PPAR gamma1 Fusion. In der chromosomalen Dislokation besteht eine Gemeinsamkeit zur Promyelozytenleukämie. 1986 wurde der erste Behandlungsversuch eines Patienten mit akuter Promyelozytenleukämie (APL) mit all-trans-Retinsäure unternommen. Bei APL werden ebenfalls Teile von Proteinen vom natürlichen Wirkort durch die 2 Fusionsproteine PML-RAR $\alpha$  verlegt (Fenaux, 1996; Parmar et al. 2003). Die Behandlung mit Retinsäure regt hierbei die Krebszellen zur Differenzierung an. Die Proteine der Zellen, die mit Retinsäure behandelt werden, werden vollständig relokalisiert (Weis, 1994). Eine gravierende Nebenwirkung stellt allerdings die durch all-trans-Retinsäure induzierte Neurotoxizität und Teratogenität dar. Die Behandlung der APL mit Retinsäure und einer anschließenden Chemotherapie reduziert nachweislich die Anzahl der Rezidive (Fenaux, 1996, Lanvers et al. 2003, Gupta et al. 2003, Parmar et al. 2003, Ohno et al. 2003, Lengfelder et al. 2003, Altucci et al. 2004).

Die Iodidaufnahme in die Thyreozyten erfolgt über einen TSH-gesteuerten Natrium-Iodid-Symporter, der an der basolateralen Zellmembran lokalisiert ist (Dai et al. 1996, Koehrle und Schmutzler 1998). Es handelt sich hierbei um ein Natrium- und energieabhängiges Transportsystem für die Aufnahme von Iodid. Durch Simulierung einer Hypo- oder Hyperthyreose im Tier- bzw. Zellkulturversuch ist die TSH-abhängige NIS-Regulation durch Steigerung der NIS-Expression von Schmutzler (2000) bestätigt worden. Auch Trapasso et al. (1999) weisen eine dosis- und zeitabhängige Steigerung der NIS-Genexpression durch TSH nach. In autonomen Adenomen der Schilddrüse und auch in Schilddrüsengewebe von Basedow-Patienten wurde eine erhöhte NIS-Expression beobachtet (Turowska et al. 2000). Bei den meisten Schilddrüsenkarzinomen konnte dagegen keine oder nur eine niedrige NIS-

Expression nachgewiesen werden (Koehle und Schmutzler 1998 und Arturi et al. 2000).

*Radioiodinkorporation in Thyreozyten in Vitamin A-freiem Kulturmedium:*

TSH stimulierte in unseren Versuchen mit 48 Stunden Inkubationsdauer die Bildung des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) und damit die  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme gegenüber der Kontrollkultur aber auch gegenüber allen anderen Kulturen mit stimulierenden Zusätzen am stärksten. Ein Effekt des TSH war bereits nach 4 Stunden Inkubationsdauer erkennbar. Kogai et al. (1997) beobachteten bei FRTL 5-Zellen für die Expression des NIS unter TSH Effekte auf mRNA-Ebene nach 3-6 Stunden und auf Proteinebene nach 24-36 Stunden. Unsere Versuche bestätigen diese Beobachtung in Bezug auf die maximale Radioiodaufnahme in die Thyreozyten.

Bei den Versuchen mit einer Inkubationsdauer von 24 Stunden bewirkt die Stimulation mit TSH (0,26 mU / Kultur) sowie die simultane Stimulation mit TSH (0,26 mU / Kultur) plus Retinol (2,6 nmol / Kultur) gegenüber der Kontrollkultur eine ungefähr gleich große Steigerung der  $^{125}\text{I}$ -Aufnahme in die Thyreozyten. Retinol bewirkt also keinen antagonistischen Effekt zum TSH.

In äquimolarer Konzentration (2,6 nmol / Kultur) lässt sich bei Stimulation mit all-trans-Retinol eine bessere Radioiodinkorporation als mit 13-cis-Retinsäure feststellen. Dies steht im Gegensatz zur gängigen Meinung, wonach Retinsäure die eigentliche Wirksubstanz von Retinol ist (Schmutzler et al. 2002). Eine ähnliche Wirkung auf Thyreozyten beobachteten jedoch auch Fröhlich et al. (2001). Hierbei zeigten zu Follikeln aggregierte Schweineschilddrüsen-Zellen, die mit 13 $\mu\text{M}$  Retinol stimuliert wurden, stärkere Radioiodeinbauraten als unter Behandlung mit 13 $\mu\text{M}$  Retinsäure. Gruning et al. 2003 schätzen aus klinischer Erfahrung bei der Therapie von Schilddrüsenkarzinomen die Wirkung der Retinsäure ebenfalls geringer ein als bisher angenommen. Eine Erklärung stellt auch die vermutete Entwicklung einer intrinsischen Resistenz auf Retinoide während der Karzinogenese dar (Freemantle et al. 2003).

Methanol (10  $\mu\text{l}$  / Kultur) kann die Iodidaufnahme in die Thyreozyten genauso stark, teilweise sogar stärker als TSH (0,26 mU / Kultur) stimulieren. Eine

TSH-ähnliche Wirkung wurde 1993 von Nasu et al. bereits dem Ethanol zugeschrieben. Die Autoren berichten von einer Aktivierung des cAMP-Systems und der Aktivierung der Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPase. Entscheidend für diesen Effekt der Alkohole dürfte die alkoholische OH-Gruppe sein.

*Radioiodinkorporation in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Kulturmedium mit sogenannter subnormaler Vitamin A-Basis- Konzentration (0,1 µM):*

Die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten, die in Medium mit subnormaler Vitamin A-Basis-Konzentration 18 Stunden vorinkubiert wurden, zeigt keine sicheren Unterschiede zu Thyreozyten, die in Vitamin A-freiem Medium inkubiert wurden. Hier bewirken Retinol (2,6 nmol / Kultur) gefolgt von TSH (0,26 mU / Kultur) und TSH (0,26 mU / Kultur) + Retinol (2,6 nmol / Kultur) die stärksten Radioiodinkorporationen. Die <sup>125</sup>I-Iodeinbaurate unter Methanol liegt meist im Bereich von jener unter 0,26 mU TSH / Kultur.

*Radioiodinkorporation in Thyreozyten in Kulturmedium mit 0,6 µM Vitamin A-Basis-Konzentration:*

Die 18-stündige Vorinkubation unserer Kulturen mit Vitamin A-haltigem Medium steigert bei simultaner Stimulation mit TSH (0,26 mU / Kultur)+ Retinol (2,6 nmol / Kultur) die Radioiodinkorporation in die Thyreozyten im Vergleich zu Kulturen in Vitamin A-freiem Medium um mehr als das Doppelte. In diesem Fall scheint die „Retinolvorbereitung“ unserer Zellkulturen eine stärkere Expression des NIS-Rezeptors an der Zelloberfläche (Schmutzler et al. 2001) zu bewirken. Zudem wird der o.g. synergistische Effekt von TSH + Retinol wirksam.

Auch unter diesen Kulturbedingungen bewirkt 2,6 nmol all-trans-Retinol / Kultur eine bessere Iodinkorporation als 2,6 nmol 13-cis-Retinsäure / Kultur oder 10 µl Methanol / Kultur. Allerdings hat Methanol (10 µl / Kultur) in einigen wenigen Ansätzen eine fast genauso große Steigerung der Iodidaufnahme wie TSH (0,26 mU / Kultur) oder TSH + Retinol (2,6 nmol / Kultur) ausgelöst.

*Radioiodinkorporation in Thyreozyten, kultiviert in Medium mit einer Vitamin A-Basis-Konzentration von 1,8  $\mu$ M:*

TSH (0,26 mU / Kultur) kann die Radioiodaufnahme in dieser Versuchsreihe im Vergleich zur Kontrolle nicht steigern. Methanol (10  $\mu$ l / Kultur) bewirkt im zeitlichen Verlauf die stärkste  $^{125}$ I-Inkorporation in unsere Thyreozyten, gefolgt von jenen unter 2,6 nmol Retinol / Kultur oder TSH + Retinol (2,6 nmol / Kultur).

Wie unsere Versuche belegen, bewirkt eine Stimulation der Thyreozyten mit 13-cis-Retinsäure eine geringere Radioiodinkorporation als eine Stimulation mit all-trans-Retinol. All-trans-Retinol dürfte daher eine direkte Wirkung auf Thyreozytenzellkulturen besitzen, die nicht erst nach Umwandlung in 13-cis-Retinsäure auftritt. Dies steht im Gegensatz zur oben genannten Literatur. Die in unseren Versuchen aufgezeigte Steigerung der Iodidaufnahme durch Stimulation mit reinem Methanol, zum Teil fast in gleichem Ausmaß wie TSH, scheint auf der Wirkung der alkoholischen OH-Gruppe zu beruhen. Alkohole können einen Einfluss auf die Membranfluidität ausüben. Muller et al. gelangten 1986 zu dem Erkenntnis, dass durch veränderte Membranfluidität verborgene Rezeptoren an die Zelloberfläche gelangen können. Dies dürfte wohl auch für die NIS-Moleküle zutreffen. Damit wäre die gesteigerte Iodidaufnahme in unsere Thyreozytenkulturen unter Methanol plausibel erklärbar. Eine ähnliche Wirkung auf Thyreozyten wurde bereits 1993 von Nasu et al. von einem anderen Alkohol, nämlich dem Ethanol beschrieben. Bei Verwendung von TSH und Ethanol als Stimulanz konnte bei der Iodidaufnahme in kultivierte Schweineschilddrüsen-Follikelzellen sogar ein synergistischer Effekt festgestellt werden (Nasu et al. 1993). Unser nachgewiesener stimulierender Effekt von TSH + Retinol kann dem beschriebenen synergistischen Effekt von TSH und Ethanol entsprechen, denn Retinol wird aufgrund seiner OH-Gruppe mit zu den Alkoholen gerechnet. Hinzu kommt, dass unser Retinol, aber auch seine Derivate, in reinem Methanol aufgelöst wurden, um diese sehr schwer löslichen Agenzien optimal in Lösung zu bringen. Wie unsere Versuche belegen, ist der Effekt von gelöstem Retinol stärker ausgeprägt als der von Methanol allein. Somit lässt sich eine Eigenwirkung von Retinol belegen.

Wie unsere Versuche weiter zeigen, hat Retinol auch in Form der Vitamin A-Konzentration des Mediums Einfluss auf die Versuchsergebnisse. Von den ausgewählten Vitamin A-Basis-Konzentrationen zwischen 0 und 1,8  $\mu\text{M}$  wurden unter jener von 0,6  $\mu\text{M}$  bei den Stimationsversuchen die deutlichsten Unterschiede gegenüber der Kontrolle erzielt. Eine Konzentration von 0,6  $\mu\text{M}$  Vitamin A wird auch in vielen handelsüblichen Kulturmedien eingesetzt. Diese niederen Retinolkonzentrationen beeinflussen während der Vorinkubation die Ausgangseigenschaften der Thyreozyten nachhaltig. Ob es sich allein um verborgene Effekte auf die Differenzierung der Zellen handelt, muß dahingestellt bleiben. Denkbar wären auch hier physico-chemische Einflüsse auf die Membranfluidität und damit ein besserer Zugang zu Membranrezeptoren.

### **4.3 $^{125}\text{I}$ -Radioiodaufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Kulturmedium (0,6 $\mu\text{M}$ ) unter dem Einfluß von TSH oder cAMP.**

TSH übt seine Wirkung auf die Thyreozyten im wesentlichen über zwei verschiedene Signalwege aus. Dies sind einerseits das Phosphoinositol-Signal, andererseits das cAMP-Signal (Löffler und Petrides 1998). Cyclisches AMP wirkt dabei als second messenger des TSH. Es wird in der Zelle rasch durch Phosphodiesterase abgebaut.

In unseren Versuchen haben wir uns für den cAMP-Signalweg interessiert, da dieser direkt in die Iodidaufnahme eingreift. Wir verwendeten dazu Dibutyryl-cAMP, da es in Kulturen etwas stabiler ist als cAMP und die Thyreozytenmembran leichter von außen durchdringen kann. Dibutyryl-cAMP induziert außerdem in unserem Kultursystem – ähnlich wie TSH – eine Zusammenlagerung der Thyreozyten zu Follikeln. Die Iodidaufnahme in Thyreozyten wird in unserem Versuch während einer 0,5 bis 6-stündigen Inkubation mit Dibutyryl-cAMP, das bei der Zellaussaat zugegeben wurde, verstärkt. Die höchsten Einbauraten an Iodid liegen nach 6 Stunden Inkubation vor. Sie sind bei Stimulation mit Dibutyryl-cAMP vor und Dibutyryl-cAMP nach

Mediumwechsel bzw. Dibutyryl-cAMP vor und TSH nach Mediumwechsel signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Die Stimulation mit Dibutyryl-cAMP vor und ohne Stimulation nach Mediumwechsel läßt dagegen lediglich eine tendenziell gesteigerte Iodidaufnahme gegenüber der Kontrolle nach 6 Stunden erkennen. Unsere Thyreozyten sind somit unter dem Einfluss des second messenger cAMP generell zu einer raschen Iodidinkorporation in der Lage.

Wie unsere Versuche zeigen, läßt sich eine gesteigerte Iodidaufnahme unter TSH-Stimulation im Gegensatz zur cAMP-Stimulation nur deutlich verzögert erreichen. Dies stimmt mit den Beobachtungen von Fröhlich und Wahl (1996) überein. Eine Erklärung kann der dadurch erzielte kürzere Signalweg sein. Eine weitere Erklärung liegt in der Zellaufbereitung mittels Dispase. Durch dieses Enzym kommt es zu einer Irritation der Zellmembran, welche unter anderem den Verlust des extrazellulären Anteils der TSH-Rezeptoren bewirken kann. Vitamin A als Differenzierungsfaktor im Zellstoffwechsel benötigt nach dem Abdauvorgang ausreichend Zeit, die TSH-Rezeptoren wieder voll zu regenerieren. Erst danach kann TSH seine Wirkung entfalten. Der Signalweg für das cAMP, der von der Innenseite der Zellmembran normalerweise seinen Ausgang nimmt, bleibt durch die Zellaufbereitung jedoch ganz offensichtlich unbeeinflusst.

#### **4.4 Darstellung des RAR $\alpha$ - und RXR $\alpha$ -Rezeptors:**

Die nuklearen Retinoid-Rezeptoren RAR und RXR stellen eine Gruppe wichtiger Proteine dar, die Retinoide binden können. RAR und RXR gehören zur Familie der ligandeninduzierten Transkriptionsfaktoren, zu der auch die Thyroidhormonrezeptoren gerechnet werden (Pemrick, 1994). Von den RAR / RXR sind mittlerweile 5 Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$ ) bekannt. An die RAR-Rezeptoren binden all-trans-Retinsäure oder 9-cis-Retinsäure. Der natürliche Ligand für den RXR-Rezeptor ist die 9-cis-Retinsäure. Retinol kann in Retinal und Retinsäure umgewandelt werden, Retinsäure allerdings nicht zu Retinal oder Retinol reduziert werden.

In Schilddrüsenmalignomen und anderen Tumorgeweben sind die Transkriptionsfaktoren RAR $\beta$  und RXR $\gamma$  unterschiedlich stark ausgeprägt. Haugen et al. (2004) weisen bei Karzinomzelllinien, die diese beiden Isoformen aufweisen, eine signifikante Wachstumshemmung unter Retinoidbehandlung nach. Heute werden sogar neue Retinsäurederivate entwickelt die spezifisch RXR $\gamma$  aktivieren und damit gezielt eine Apoptose einleiten. Diese neuen Derivate besitzen eine größere antiproliferative Wirkung als all-trans-Retinsäure oder 9-cis-Retinsäure (Orlandi et al. 2003, Ralhan und Kaur 2003).

Die Expression der RAR- / RXR-Retinoat-Rezeptoren der Thyreozyten wurde von uns erst nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden gemessen. Es wurden hierzu in den Präparaten gut beurteilbare Stellen (möglichst kleine Kolonien) mit je ca. 100 Zellen aufgesucht. Als RAR / RXR positiv wurden die Zellen gezählt, deren Kern sich rot anfärben ließ.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, kann eine Vorbehandlung der Zellen in Vitamin A-haltigem Medium und ihre anschließende Stimulation mit TSH die Expression der RAR- und RXR-Rezeptoren steigern. Auch die Stimulation der Thyreozyten mit TSH in Kombination mit all-trans-Retinol oder 13-cis-Retinsäure erhöht beim immunologischen Nachweis die Anzahl der immunreaktiven Zellen. Die gesteigerte Expression des RAR- / RXR-Rezeptors ist allerdings in unserer gewählten Versuchsanordnung zur Kontrolle nicht signifikant verschieden. Möglicherweise hätten sich zu früheren oder gar späteren Zeiten als 72 Stunden signifikante Unterschiede ergeben.

##### *RAR $\alpha$ -Expression in Vitamin A-freiem Medium:*

In unseren Versuchen stimulierte TSH (0,26 mU / Kultur) + Retinol (7,8 nmol / Kultur) die Expression des RAR am stärksten. In der Stärke der Expression von RAR folgen TSH + Retinol (2,6 nmol und 5,2 nmol / Kultur) sowie TSH (0,26 mU / Kultur) und TSH + 13-cis-Retinsäure (2,6 nmol / Kultur).

Analog zu den Ergebnissen zum Iodideinbau in Thyreozyten, kultiviert in Vitamin A-freiem Medium, steigert TSH alleine oder in der Kombination aus

TSH + Retinol oder TSH + 13-cis-Retinsäure die immunreaktive Darstellung der RAR-Rezeptoren im Vergleich zur Kontrolle.

*RAR $\alpha$ -Expression in Vitamin A-haltigem (0,6  $\mu$ M) Kulturmedium:*

Die Vorbehandlung unserer Kulturen mit Vitamin A-haltigem Medium steigert bei Stimulation mit TSH (0,26 mU / Kultur) bzw. in Kombination mit unterschiedlichen Retinolkonzentrationen ( 2,6 nmol; 5,2nmol / Kultur) die RAR-Expression auf Thyreozyten. TSH (0,26 mU / Kultur) + Retinol (7,8 nmol / Kultur) bewirkt dagegen keine Steigerung der RAR-Expression im Vergleich zur Kontrollkultur. Eine hohe Retinol-Konzentration wirkt sich offensichtlich nachteilig aus. Eine entsprechende Steigerung der RAR-Expression bleibt auch unter 13-cis-Retinsäure (2,6 nmol / Kultur) aus.

Wiederum zeigt die Stimulation mit all-trans-Retinol deutliche Unterschiede gegenüber der Stimulation mit 13-cis-Retinsäure. Ein Vergleich dieser Ergebnisse zum analogen Verhalten des Iodideinbaus unter gleichen Kulturbedingungen bietet sich geradezu an.

*RXR $\alpha$ -Expression in Vitamin A-freiem Medium:*

Die simultane Stimulationen mit TSH (0,26 mU / Kultur) + Retinol (2,6 nmol; 5,2 nmol; 7,8 nmol / Kultur) sowie mit TSH (0,26 nmol / Kultur) + 13-cis-Retinsäure (2,6 nmol / Kultur) oder die alleinige Stimulation mit TSH (0,26 mU / Kultur) bewirken nur eine sehr geringe RXR-Expression.

*RXR $\alpha$ -Expression in Vitamin A-haltigem Medium:*

Der immunologische Nachweis der RXR-Rezeptoren der Thyreozyten ist bei kombinierter Stimulation mit TSH (0,26 mU / Kultur)+ 13-cis-Retinsäure (2,6 nmol / Kultur) am stärksten ausgeprägt. Die simultane Stimulation mit TSH (0,26 mU / Kultur) + Retinol (5,2 nmol / Kultur) bewirkt eine etwas geringere Darstellung der RXR-Rezeptoren. RXR bindet vorzugsweise Retinsäure. Dies erklärt die bessere RXR-Expression unter primärer Stimulation mit Retinsäure, während Retinol erst zu Retinsäure transferiert werden muß. Alle übrigen verwendeten Stimulanzen (alleinige Stimulation mit TSH 0,26 nmol / Kultur;

TSH 0,26 nmol / Kultur + Retinol 7,8 nmol / Kultur und TSH 0,26nmol / Kultur + 13-cis-Retinsäure) bewirken keine RXR-Expression im Vergleich zur unbehandelten Kontrollkultur.

Die Ergebnisse der Versuche zur RAR- / RXR-Expression auf Thyreozyten lassen sich mit den Ergebnissen der Versuche zum Iodideinbau in Thyreozyten, die in Medien unterschiedlicher Vitamin A-Konzentration kultiviert wurden, vergleichen. Durch die gesteigerte Expression des NIS und die dadurch gesteigerte Iodidaufnahme sowie durch die parallel dazu gesteigerte Expression der RAR- oder RXR-Rezeptoren durch Retinoide wird ein dem gleichen Ziel dienender retinoidinduzierter Signalweg zwischen Membranrezeptoren und Kernrezeptoren aufgezeigt.

## 5. Zusammenfassung

Die vorliegenden Untersuchungen zum Schilddrüsenstoffwechsel erfolgten an Primärkulturen aus Schweinethyreozyten. Dieses in-vitro-System weist in-vivo-Merkmale auf.

Für die vorliegenden Versuche stand eine Sonderanfertigung von retinoidfreien NCTC-Medium zur Verfügung. Dieses konnte somit beliebig mit Vitamin A aufgestockt werden. In diesem Medium wurden die Thyreozyten zunächst für 18 Stunden entweder Vitamin A-frei oder bei unterschiedlich hoher Basis-Konzentration an Vitamin A (0,1; 0,6 oder 1,8  $\mu\text{M}$ ) vorinkubiert.

An Thyreozyten in Medium mit unterschiedlich hoher Basis-Konzentration an Vitamin A sollte zunächst der Einfluss von all-trans-Retinol (2,6 nmol; 5,2 nmol oder 7,8 nmol / 200  $\mu\text{l}$  Medium), 13-cis Retinsäure (2,6 nmol / 200  $\mu\text{l}$  Medium), TSH (0,26 mU / 200  $\mu\text{l}$  Medium), der Kombination aus TSH (0,26 mU / 200  $\mu\text{l}$ ) plus Retinol (2,6 nmol / 200  $\mu\text{l}$ ) sowie der Einfluss von Methanol (10  $\mu\text{l}$  / 200  $\mu\text{l}$  Medium) auf die  $^{125}\text{I}$ -Radioiodaufnahme untersucht werden.

In einem zweiten Schritt wurde der  $^{125}\text{I}$ -Iodeinbau in Thyreozyten unter dem Einfluss von TSH im Vergleich zu Dibutyryl-cAMP in Vitamin A-haltigem Medium (0,6  $\mu\text{M}$  Vitamin A) gemessen.

Im dritten und letzten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der genannten Stimulanzien auf die immunhistochemische Darstellung des RAR- oder RXR-Rezeptors in Vitamin A-freiem und Vitamin A-haltigem Medium überprüft.

TSH, all-trans-Retinol, die Kombination aus TSH plus all-trans-Retinol, sowie Methanol haben als Zusatz zum Kulturmedium einen verstärkenden, zum Teil sogar signifikant verstärkenden Einfluss auf den  $^{125}\text{I}$ -Iodeinbau in kultivierte Schweinethyreozyten.

All-trans-Retinol (2,6 nmol / 200  $\mu\text{l}$ ) alleine oder in Kombination mit TSH (0,26 mU / 200  $\mu\text{l}$ ) zeigte in unseren Untersuchungen den größten Einfluss auf die Radioiodinkorporation in Thyreozyten. 13-cis Retinsäure wies deutlich schwächere Effekte als all-trans-Retinol auf. Beeinflusst wurde diese Wirkung jedoch von den Bedingungen der Vorinkubation der Thyreozyten. Eine

Vorinkubation der Thyreozyten in NCTC-Medium mit einer Vitamin A-Basis-Konzentration von 0,6  $\mu\text{M}$  steigert die Iodidaufnahme teilweise um das Doppelte.

Methanol, das zugleich als Lösungsmittel für Retinol verwendet wurde, besitzt einen den Iodideinbau tendenziell verstärkenden Effekt bei unseren Thyreozyten. Die TSH-ähnliche Wirkung von Methanol scheint dabei auf der alkoholischen OH-Gruppe zu beruhen. Da aber der den Iodideinbau verstärkende Effekt unter Stimulation mit Retinol größer ist als unter Methanol allein, kann damit von einer Eigenwirkung des Retinols auf Thyreozyten ausgegangen werden.

Bei der Isolierung der Thyreozyten aus dem Gewebsverband unter Einwirkung des Enzyms Dispase kommt es zu einem Verlust des extrazellulären Anteils des TSH-Rezeptors. An dieser Stelle kann Vitamin A als Differenzierungsfaktor im Zellstoffwechsel Rezeptor-regenerierend eingreifen. Nach dem Abbauprozess benötigt es allerdings ausreichend Zeit, um die TSH-Rezeptoren wieder für die TSH-Bindung herzustellen. Die intrazelluläre Signalkaskade bleibt jedoch bei der Zellaufbereitung unbeeinflusst. Dies zeigen die Untersuchungen mit Db-cAMP. Es findet sich ein signifikant verstärkter Effekt auf den Radioideinbau nach Stimulation mit Db-cAMP im Vergleich zur unstimulierten Thyreozytenkultur. Ein entsprechender Effekt unter TSH tritt erst zeitlich verzögert ein.

Prinzipiell verhielt sich die RAR- oder RXR-Expression in den Thyreozyten unter dem Einfluss von Retinoiden parallel zur  $^{125}\text{I}$ -Radioiodaufnahme.

Wie unsere Ergebnisse zeigen, kann eine Vorbehandlung der Zellen mit all-trans-Retinol und ihre Stimulation mit TSH die Expression der RAR- oder RXR-Rezeptoren steigern. Auch die Stimulation der Thyreozyten mit TSH in Kombination mit all-trans-Retinol oder 13-cis-Retinsäure erhöht beim immunologischen Nachweis die Anzahl der immunreaktiven Zellen. Wiederum zeigt die Stimulation mit all-trans-Retinol bessere Ergebnisse als mit 13-cis-Retinsäure. Die gesteigerte Expression des RAR- / RXR-Rezeptors ist allerdings in unserer gewählten Versuchsanordnung nicht signifikant zur Kontrolle.

## 6. Anhang

Tab. 1 zu Abb. 1

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-freiem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=5. die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

/Zeit (Stunden) Stimulation/	0,5h	1h	1,5h	2h
Ohne Stimulation	1140,6	2191,6	1954,2	2489,6
SD	125,4	667,8	539,4	581,9
SEM	51,2	272,6	220,2	237,6
Methanol 10µl	1043,6	2722,8	2162,6	2347,4
SD	173,9	319,6	484,1	605,9
SEM	71	130,5	197,6	247,3
Signifikant				
Retinol 2,6nmol	1193	2532,5	2313,4	2565,1
SD	186,5	423,2	519,1	414,8
SEM	76,1	172,8	211,9	169,3
Signifikant				
Retinol 5,2nmol	1105,5	2407,7	2080	2192,9
SD	261,5	417,3	423	345,2
SEM	106,8	170,4	172,7	140,943831
Signifikant				
Retinol 7,8nmol	1134,8	2986,8	2133,9	2355,8
SD	206,5	463,1	778,7	624,9
SEM	84,3	189,1	317,9	255,1
Signifikant				
TSH 0,26mU	934,5	2039,3	1202,2	1358,8
SD	265,9	234,2	229,5	192,8
SEM	108,5	95,6	93,7	78,7
Signifikant				

**Tab. 2** zu Abb. 2

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-freiem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=8. Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 3.

/Zeit (Stunden)	2h	4h	6h	8h	12h	18h
Stimulation/						
ohne Stimulation	4571,5	6192,7	6431,7	3517,5	4459,8	3626,3
SD	537,4	1409,0	2004,3	1186,3	2185,2	1190,6
SEM	203,1	532,6	757,6	448,4	825,9	450
Signifikant						
TSH 0,26mU	5540,5	12625,2	8301,4	5050,6	7267,8	9220
SD	520,9	2154,8	1328,6	952,9	2360,9	2739,9
SEM	196,9	814,4	502,2	360,1	892,3	1035,6
Signifikant		*	*	*	*/♦	*/♦
TSH+Retinol2,6nmol	5637	8954,1	6742,2	2286,3	4559,6	5711,7
SD	1114,2	3416,3	914,7	381,1	1562,9	1075,1
SEM	42101	1291,2	345,7	144	590,7	406,4
Signifikant	*			*	♦	♦
TSH+Retinol5,2nmol	5012,1	5985,3	3420,2	1919,1	2560,6	1930,2
SD	802,4	608,3	361,2	261,9	345	381,9
SEM	303,3	229,9	136,5	99	130,4	144,4
Signifikant			*	*		
TSH+Retinol7,8nmol	2974,6	4004,2	3021	1407	2362,4	1774,6
SD	302,7	540,9	178,9	340,8	191,4	438,8
SEM	114,4	204,4	67,6	128,8	72,3	165,8
Signifikant	*		*	*		

/Zeit (Stunden)	24h	30h	36h	42h	48h
Stimulation/					
ohne Stimulation	1704,4	1922,1	2059,8	4294,2	2465,7
SD	592,9	445,5	509,2	3801,3	535,6
SEM	224,1	168,4	192,5	1436,7	202,5
TSH 0,26mU	4349,9	6685	3390,1	12186,1	3717,6
SD	812,1	873,1	1074,3	2596,4	381,3
SEM	307	330	406	981,3	144,1
Signifikant	*	*	*	*	*
TSH+Retinol2,6nmol	4349,9	1278,4	1135,9	2107,1	963,5
SD	812,1	240,0	323,4	378	165,8
SEM	307	90,7	122,2	142,9	62,7
Signifikant	*			◆	*
TSH+Retinol5,2nmol	1036,3	1149,9	1366,6	2528,1	1020,8
SD	122,5	126,2	196	282,1	51,2
SEM	46,3	47,7	74,1	106,6	19,4
Signifikant		*	*		*
TSH+Retinol7,8nmol	939,1	982,0	1208,8	2142,8	934,8
SD	76	220,3	151,5	243,0	42,4
SEM	28,7	83,3	57,3	91,9	16
Signifikant		*	*		*

**Tab. 3** zu Abb. 3

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=5. die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-freiem Kulturmedium in Tab. 2.

/Zeit (Stunden)	2h	4h	6h	8h	10h	12h
Stimulation/						
ohne Stimulation	6000,6	6107,3	6277,8	4681,1	6453,9	7198,1
SD	1559,13	1908	1139,8	812	572,6	589,6
SEM	697,3	853,3	509,7	363,1	256,1	263,7
Signifikant						
TSH 0,26mU	7761,9	11095,6	9206,9	5878,7	8286,3	11324
SD	1351,8	1448,1	455,2	1427,6	690,6	994,1
SEM	604,5	647,6	203,6	638,4	308,9	444,6
Signifikant		*			*	*/♦
TSH+Retinol2,6nmol	6645	16003,8	13649,6	8141	10469,4	15002,3
SD	762,7	1783,7	2591,87	1088,8	798,9	1949,3
SEM	341,09	797,7	1159,1	486,9	357,3	871,7
Signifikant		*	*		*	*/♦
TSH+Retinol5,2nmol	7722,8	12456,7	12646,4	8353,9	9974,6	13813
SD	1113,4	2378	2827,5	477,74	635,6	1238,4
SEM	497,9	1063,5	1264,5	213,7	284,3	553,8
Signifikant		*	*		*	*
TSH+Retinol7,8nmol	8621,5	12497,9	14063	7808,8	10732,9	14848,7
SD	523,6	1429,6	1228	275,4	1226,1	1434,3
SEM	234,2	639,3	549,2	123,2	548,3	641,4
Signifikant	*	*	*		*	*

/Zeit (Stunden)	18h	24h	30h	36h	42h	48h
Stimulation/						
ohne Stimulation	9028,7	5112,3	3674,58	4718,1	3436,4	2839,9
SD	655,7	1106,4	565,6	440,6	1760,3	434,6
SEM	293,2	494,8	252,9	197	787,2	194,4
Signifikant						
TSH 0,26mU	14570,4	5032,4	5918,7	8159,4	10329,3	4416,7
SD	590,9	951,9	365,3	439,8	2535,1	194
SEM	264,3	425,7	163,4	196,7	1133,7	86,8
Signifikant	◆			*	*	
TSH+Retinol2,6nmol	22555,9	5249,5	4527	6282,7	4062,7	3028,1
SD	6847,8	1435,8	811,6	364,7	924,2	471,9
SEM	3062,4	642,1	362,9	163,1	413,3	211
Signifikant	*/◆			*	*/◆	
TSH+Retinol5,2nmol	26013,9	6238,1	4733,2	5224,1	5483,8	2374,7
SD	2757,1	1185,1	95,8	659,3	810,3	207,8
SEM	1233	530	42,9	294,8	362,4	92,9
Signifikant	*					
TSH+Retinol7,8nmol	13365	5334,2	3533,4	5169,5	4765,7	1775,1
SD	475,8	943,5	532,8	772,4	562,1	243,2
SEM	212,8	422	238,3	345,4	251,4	108,8
Signifikant						

**Tab. 4** zu Abb. 4

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=5. Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Es gibt keine signifikant verschiedenen Ergebnisse (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-freiem Kulturmedium in Tab. 5.

/Zeit (Stunden)	0,5h	1h	2h	4h
Stimulation/				
ohne Stimulation	3602,4	6431,9	6341,9	12038,2
SD	966,1	465,9	823,4	2323,4
SEM	394,4	190,2	336,2	948,5
Signifikant				
TSH 0,26mU	5176,6	6915	8866,9	18621,7
SD	887,7	846,6	566,2	2443,9
SEM	362,4	345,6	231,2	997,7
Signifikant	*		*	*
Methanol 10µl	4160	5986,5	6464,7	16739,5
SD	639,1	515,6	448,6	1411,7
SEM	260,9	210,5	183,1	576,3
Signifikant				*
Retinol 2,6 nmol	2892,6	2661,2	5791,2	16045,2
SD	400,6	597,6	513,5	1779,1
SEM	163,5	244	209,6	726,3
Signifikant		*		*
Retinsäure 2,6nmol	3344,4	2716,4	7043	13560,2
SD	593,5	411,2	884,5	2943,6
SEM	242,3	167,9	361,1	1201,7
Signifikant		*		

**Tab. 5** zu Abb. 5

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-freiem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=8. Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Es gibt keine signifikant verschiedenen Ergebnisse (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 4.

/Zeit (Stunden)	0,5h	1h	2h	4h
Stimulation/				
ohne Stimulation	3215,1	5067,3	7584,3	13004,5
SD	575,3	618,9	995,2	1391,2
SEM	234,9	252,7	406,3	568
Signifikant				
TSH 0,26mU	3662,2	7924,2	11694,1	14792,2
SD	674,8	798,1	1125,2	2560,1
SEM	275,5	325,8	459,4	1045,2
Signifikant		*	*	
Methanol 10µl	3090,5	6078,5	6770,1	12563,4
SD	468,1	722,4	401,9	2503,5
SEM	191,1	294,9	164,1	1022,1
Signifikant				
Retinol 13µM	3800,9	2974,6	6033,1	12043,9
SD	928,1	783,9	1119,1	3206,4
SEM	378,9	320	456,9	1309
Signifikant		*		
Retinsäure 13µM	3159,1	1781,8	5193,8	10259,3
SD	532,9	320,1	1178,5	1733,1
SEM	217,5	130,7	481,1	707,5
Signifikant		*	*	

**Tab. 6** zu Abb. 6

$^{125}\text{I}$ -Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium in dpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=8. Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

/Zeit (Stunden)	0,5h	1h	3h	6h	9h
Stimulation/					
ohne Stimulation	1119,7	1387,4	2741,5	2990,4	3081,4
SD	88,1	166,4	369,1	676,57	1020,2
SEM	33	67,3	150,7	276,2	416,5
Signifikant					
TSH/o. Stimulation	793	751,5	1508	1868,18	2408,4
SD	153,7	134,3	216,7	383,14	759,3
SEM	62,7	54,8	88,5	156,4	310
Signifikant		*	*	*	
TSH/TSH	752,8	609,4	1207,9	1788,6	2761,9
SD	102,9	114,8	389,4	149,09	436
SEM	42	46,9	159	60,9	178
Signifikant	*	*	*	*	
TSH/cAMP	678,7	625,3	1360,2	1649,43	1992,7
SD	73,2	116,3	173	293,50	686,8
SEM	29,9	47,5	70,6	119,8	280,4
Signifikant	*	*	*	*	
cAMP/o. Stimulation	1470,1	1251,6	2105,4	3801,57	1522,6
SD	340,6	190,9	343,9	853,93	614,7
SEM	139,1	78	140,4	348,6	251
Signifikant	*		*		*
cAMP/TSH	1434,9	1522,9	2874,3	4629,13	1716,4
SD	204,9	145,2	345,9	904,64	690,2
SEM	83,6	59,3	141,2	369,3	281,8
Signifikant				*	*
cAMP/cAMP	1659,5	1196,77	2366,22	4712,20	1631,37
SD	231,6	66,29	410,03	369,26	499,91
SEM	94,6	27,1	167,4	150,8	204,1
Signifikant	*			*	*

**Tab. 7** zu Abb. 7

[6-<sup>3</sup>H]-Thymidin (12kBq) -Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium in dpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=8. Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

/Zeit (Stunden)	0,5h	1h	3h	6h	9h
Stimulation/ ohne Stimulation	705,9	893,7	1156,5	1982,4	2214,8
SD	133,4	113,1	149,8	374,1	900,4
SEM	54,4	46,2	61,2	152,7	236,2
Signifikant					
TSH/o. Stimulation	723,2	549,8	839,9	1049,5	1556,8
SD	174	169,2	223,3	170,1	311,3
SEM	71	69,1	91,1	69,4	127,1
Signifikant				*	*
TSH/TSH	679,5	547,5	859,6	1116,3	1064,9
SD	113,4	236,8	108,4	174,7	389,6
SEM	46,3	96,7	44,2	71,3	129,6
Signifikant				*	*
TSH/cAMP	685	615,2	837,9	1120,3	2867,9
SD	113,4	112,8	185,2	238,8	1029,8
SEM	46,3	46,1	75,6	97,5	301,4
Signifikant				*	
cAMP/o. Stimulation	1024,5	952,9	1193,5	1268,1	2290,1
SD	489	347,4	409,4	625,3	582
SEM	199,6	141,8	167,1	255,3	237,6
Signifikant				*	
cAMP/TSH	1053,8	840,3	1195,4	1700,3	3056,3
SD	178,7	252,2	168,5	421,1	485,4
SEM	73	102,9	68,8	171,9	198,2
Signifikant					
cAMP/cAMP	1151,7	867,9	1098,7	1540,5	2956,7
SD	164,3	178,9	89,5	340,2	368,4
SEM	67,1	73	36,5	138,8	150,4
Signifikant	*				

**Tab. 8** zu Abb. 8 und Abb. 9

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=5.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Es gibt keine signifikant verschiedenen Ergebnisse (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-freiem Kulturmedium in Tab. 9.

/Zeit(Stunden)	2h	4h	6h	8h
Stimulation/				
Ohne Stimulation	2242,2	4490,3	3687,6	6563,4
SD	450,9	1128,2	1002,1	530
SEM	225,5	564,1	501	265
Signifikant				
Retinol 2,6 nmol	2620,8	5363,9	3998,7	8783
SD	464,6	1553,4	104106	1118,4
SEM	232,3	776,7	520,8	559,2
Signifikant				
Methanol 10µl	2501,9	3696,9	4078,9	8634,4
SD	184,9	598,6	756,6	784,5
SEM	92,5	299,3	378,3	392,2
Signifikant				
Retinsäure 2,6nmol	2951,6	4116,5	4832	8888
SD	849	1175,1	571,1	1389,7
SEM	424,5	587,5	285,5	694,9
Signifikant				
TSH 0,26mU	3980,1	4077,3	3871,8	8770,8
SD	489,3	975,8	1546,7	711,9
SEM	244,7	487,9	773,4	355,9
Signifikant	*			
TSH+Retinol2,6nmol	3448,6	5028,3	4684,4	9510,5
SD	340,8	1048,7	1335,5	1509,6
SEM	170,4	524,3	667,8	754,8
Signifikant	*			*

Retinol 5,2 nmol	2832,7	4258,5	4810,6	10132,7
SD	323,3	758,1	1246,2	938,1
SEM	161,7	379	623,1	469,1
Signifikant				*
Retinol 7,8 nmol	3345,1	6973	9536,5	3796,8
SD	633,1	2600,9	3076,5	1888,8
SEM	316,6	1300,5	1538,2	944,4
Signifikant				*

/ Zeit (Stunden)	10h	12h	18h	24h
Stimulation /				
ohne Stimulation	9143,3	4478,8	3424,9	3999,0
SD	1982,2	232,2	946,6	798,1
SEM	991,1	116,1	473,3	399,1
Signifikant				
Retinol 2,6 nmol	13380,6	6318,6	6060,4	5409,4
SD	3087,6	735,6	1081	1808,5
SEM	1543,8	367,9	540,5	904,2
Signifikant			*	
Methanol 10µl	12754,9	5897	6753	3906,4
SD	1869,1	569,2	1078,8	1051,4
SEM	934,6	284,6	539,4	525,7
Signifikant			*	
Retinsäure 2,6nmol	12002,3	5753,3	5573,8	3941,6
SD	1197,1	1197,1	1012,5	780,7
SEM	598,5	598,5	506,3	390,4
Signifikant				
TSH 0,26mU	10061,4	4634,7	6035,7	4114,3
SD	3101,8	1520,2	1689,9	985,8
SEM	1550,9	760,1	845	492,9
Signifikant			*	
TSH+Retinol2,6nmol	10893,4	4746,4	6781,1	4571,1
SD	1018,3	921,1	606	1488,1
SEM	509,2	460,6	303	744
Signifikant			*	

Retinol 5,2 nmol	10009	4796,7	5032,4	2515,4
SD	1968,4	1989,5	1516,4	1028,9
SEM	984,2	994,7	758,2	514,4
Signifikant				
Retinol 7,8 nmol	7193,1	2794,3	3396,2	2663,9
SD	1110,7	1057,3	800,9	1029,9
SEM	555,4	528,6	400,4	514,9
Signifikant				

**Tab. 9** zu Abb. 10 und Abb. 11

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-freiem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=5.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Es gibt keine signifikant verschieden Ergebnisse ( $p < 0,05$ ) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 8.

/ Zeit(Stunden)	2h	4h	6h	8h
Stimulation/				
ohne Stimulation	51,9	34,4	3068	1874
SD	35,8	10,7	800,3	518,2
SEM	17,9	5,3	400,2	259,1
Signifikant				
Retinol 2,6 nmol	31	25	4654	2426
SD	11,0	5,3	991,7	659,3
SEM	5,5	2,6	495,8	329,7
Signifikant				
Methanol 10µl	26,1	24,4	3808	2591
SD	4,7	6,1	271	571,1
SEM	2,4	3,1	135,7	285,5
Signifikant				
Retinsäure 2,6nmol	24,1	36,3	3932	2118
SD	5,2	5,4	530,5	421,4
SEM	2,6	2,7	265,2	210,7
Signifikant				

TSH 0,26 mU	25,9	34,5	4338	1934
SD	5,4	7,2	989,6	479,3
SEM	2,7	3,6	494,8	239,7
Signifikant				
TSH+Retinol2,6nmol	31,7	24,2	4598	2823
SD	13,6	3,5	1047,9	1250,2
SEM	6,8	1,8	524	625,1
Signifikant				
Retinol 5,2 nmol	58,9	53,9	4428	2277
SD	9,6	42,5	1250,7	894,7
SEM	4,8	21,3	625,3	447,4
Signifikant			*	
Retinol 7,8 nmol	2413	5167	13999	4343
SD	255,9	645,9	3082,6	338,8
SEM	127,9	322,9	1541,3	169,4
Signifikant	*	*	*	*

/ Zeit (Stunden)	10h	12h	18h	24h
Stimulation/				
ohne Stimulation	3504	2329	3165	1596
SD	1094,9	594,4	700,8	227,5
SEM	547,4	297,2	350,4	113,7
Signifikant				
Retinol 2,6 nmol	5108	3378	3350	1924
SD	1254,8	1024,6	1376,2	84,1
SEM	627,4	512,3	688,1	42,1
Signifikant				
Methanol 10µl	5420	3775	4600	1942
SD	620,2	825,4	1310	776,3
SEM	310,1	412,7	655	388,1
Signifikant				
Retinsäure2,6nmol	5077	2895	3587	1668
SD	823,2	899,5	1020,4	550,9
SEM	411,6	449,8	510,2	275,5
Signifikant				
TSH 0,26mU	5231	2073	4209	1970
SD	1248,5	777,1	1423,7	932,7
SEM	624,2	388,6	711,8	466,4
Signifikant				

TSH+Retinol2,6nmol	5095	2573	3692	1388
SD	802,9	707,7	1747,4	412,7
SEM	401,5	353,9	873,7	206,4
Signifikant				
Retinol 5,2 nmol	6604	3324	2690	1265
SD	1768,5	1477,8	1091,9	446,5
SEM	884,3	738,9	546	223,2
Signifikant	*	*		
Retinol 7,8 nmol	5781	2579	2485	1954
SD	477,3	517,5	1042,3	371,7
SEM	238,7	258,7	521,1	185,5
Signifikant				

**Tab. 10** zu Abb. 12

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium subnormaler Konzentration (0,1µM) in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=5.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Es gibt keine signifikant verschieden Ergebnisse (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium.

/Zeit (Stunden)	2h	4h	6h	8h
Stimulation/				
ohne Stimulation	1989,8	3108,5	3501,6	3097,2
SD	275,9	421,3	721,8	848,9
SEM	137,9	210,7	360,9	424,5
Signifikant				
Retinol 2,6 nmol	3389,6	4700,7	5787	4564,6
SD	1470,9	359,5	476,6	308,4
SEM	735,5	179,7	238,3	154,2
Signifikant			*	*

TSH 0,26mU	1823	3126,7	4432,7	3555,2
SD	40,5	345,7	1950,3	210,9
SEM	20,2	172,9	975,1	105,5
Signifikant				
TSH+Retinol2,6nmol	1816,1	6079,2	4499,1	4013,8
SD	89,3	3942,8	93,4	274,3
SEM	44,6	1971,4	46,7	137,2
Signifikant				
Retinol 5,2 nmol	1802,9	3991,5	3853,2	3952,1
SD	164,8	379,6	929,7	675,2
SEM	82,4	189,8	464,9	337,6
Signifikant				
Retinol 7,8 nmol	2396	3978,3	5043	4558,7
SD	347,9	700,5	654,7	488,4
SEM	173,9	350,3	327,4	244,2
Signifikant				*

/Zeit (Stunden)	10h	12h	18h	24h
Stimulation/				
ohne Stimulation	3865,2	2617,7	883	921,3
SD	956,5	1477,4	177,2	337,9
SEM	478,2	738,7	88,6	169
Signifikant				
Retinol 2,6 nmol	8154,5	3284,7	1389,7	1161,3
SD	2158,7	383,4	103	348,7
SEM	1079,3	191,7	51,5	174,4
Signifikant	*		*	
TSH 0,26mU	6192,1	3467,9	1492,8	1102,7
SD	912,3	866	288,2	158
SEM	456,2	433	144,1	79
Signifikant			*	
TSH+Retinol2,6nmol	4974,5	4990,3	1629	1054,3
SD	373,7	377,4	167,2	193,9
SEM	186,8	188,7	83,6	96,9
Signifikant		*	*	

Retinol 5,2 nmol	5751,5	2541,1	1380,1	776,8
SD	1082,1	341,2	84,5	83,5
SEM	541	170,6	42,2	41,8
Signifikant			*	
Retinol 7,8 nmol	5984,4	3441,1	1296,2	1056,9
SD	618,1	326,5	162	151
SEM	309,1	163,3	81	75,5
Signifikant			*	

**Tab. 11** zu Abb. 13

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium (0,6µM) in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-freiem Kulturmedium in Tab. 14.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	5182,1	2374,7	2571,8	1950	2321,3	2439,7
SD	588,8	232,5	236,4	165,2	511,5	751,1
SEM	240,4	94,9	96,5	67,4	208,8	306,7
Signifikant				♦		
TSH 0,26mU	4753,1	2840,5	2330,4	1755,5	2552	1915,7
SD	597,6	137,1	434,4	261,4	306,8	453,9
SEM	244	56	177,4	106,7	125,3	185,3
Signifikant					♦	
Retinol 2,6 nmol	6040,4	3057,8	3772,6	2391	3260,9	2244,8
SD	1102,6	322	597,8	296,1	664,4	605,4
SEM	450,1	131,4	244	120,9	271,2	247,1
Signifikant			*	*/♦	*	
TSH+Retinol2,6nmol	3412,9	2592	3259,8	1659,2	2110,1	1697
SD	613,1	404,7	676,6	239,3	411,6	289,2
SEM	250,3	165,2	276,2	97,7	168	118,1
Signifikant	*			♦		

Methanol 10µl	6997,3	4312,7	4904,5	3196,7	4463	4105
SD	742,1	927	582,3	361,8	870,7	820,7
SEM	303	378,4	237,7	147,7	355,4	335
Signifikant	*	*	*	*	*	*
NaClO <sub>4</sub> 1mM	2885,6	1833,4	2619,4	1074,2	921,7	645,9
SD	1846,3	690,2	854	182,2	234,8	298
SEM	753,8	281,8	348,7	74,4	95,8	121,7
Signifikant	*			*/♦	*	*/♦

**Tab. 12** zu Abb. 14

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-freiem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 11.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	4736,9	2101,8	2684,9	2705,7	2074,8	2139,6
SD	815,5	239,5	262,8	205	321,1	188,6
SEM	355,6	97,8	107,3	83,7	131,1	77
Signifikant				♦		
TSH 0,26mU	4020,1	2465,5	2772,6	2260,9	1903,2	1846,1
SD	1090,1	520,4	505,2	532,2	159,5	217,9
SEM	445	212,4	206,2	217,3	65,1	88,9
Signifikant					♦	
Retinol 2,6 nmol	5657,7	2798,7	4152,6	4049,1	2516,4	2577,6
SD	966,5	628,8	335,2	510	431,3	314,3
SEM	394,6	256,7	136,9	208,2	176,1	128,3
Signifikant			*	*/♦		
TSH+Retinol2,6nmol	4403,4	2133,5	2839,8	2591,6	2041,8	2063,5
SD	385,3	430,2	470,8	251,9	249,5	330,9
SEM	157,3	175,6	192,2	102,8	101,9	135,1
Signifikant				♦		

Methanol 10µl	5208,1	3121,1	4867,8	3999,3	3212,8	3199,3
SD	1019,8	539,2	691	540,7	384,3	445,8
SEM	416,3	220,1	282,1	220,7	156,9	182
Signifikant		*	*		*	*
NaClO <sub>4</sub> 1mM	3426,6	2714,8	2325,3	2203,9	1537,8	1336
SD	1031,4	671,3	740	603,9	397,9	173,3
SEM	421,1	274,1	302,1	246,5	162,4	70,8
Signifikant				◆		*/◆

**Tab. 13** zu Abb. 15

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium in cpm. Die Vitamin A-Konzentration ist mit 1,8µM dreifach höher als in Abb. 13.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6. Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ◆ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 11.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	8262,8	8375,6	4021,8	4921,9	3502,4	4376
SD	567,5	635,2	478	633,8	504,3	872,3
SEM	231,7	259,3	195,1	258,7	205,9	356,1
Signifikant	◆	◆	◆	◆	◆	◆
TSH 0,26mU	6153,7	8580,5	3154,8	3741,6	3340,8	3360,4
SD	372,6	1187,2	252,4	586,9	637,8	479,9
SEM	152,1	484,7	103	239,6	260,4	195,9
Signifikant	*/◆	◆	◆	◆	◆	◆
Retinol 2,6 nmol	8750,5	14139,1	5788,7	7963,2	4855,7	4737,9
SD	564,1	1079,3	572,8	772,3	1007,9	898,8
SEM	230,3	440,6	233,8	315,3	411,5	366,9
Signifikant	◆	*/◆	*/◆	*/◆	*/◆	◆

TSH+Retinol2,6nmol	5127,4	13008,3	5321	6802,6	5527,3	5807,4
SD	567,3	1076,8	850	1854,4	1057,4	1071,5
SEM	231,6	439,6	347	757,1	431,7	437,4
Signifikant	*/◆	*/◆	*/◆	*/◆	*/◆	*/◆
Methanol 10µl	8437,1	14909,4	7860,5	9418	7698,8	6526
SD	674,2	1708,9	1160,6	1500,5	1029,6	961,8
SEM	275,3	697,7	473,8	612,6	420,3	392,7
Signifikant	◆	*/◆	*	*/◆	*/◆	*/◆
NaClO <sub>4</sub> 1mM	1925,1	4239,5	1812,5	1213,7	1251,7	1105,8
SD	859,8	1373,5	560,5	303,7	248,4	151,2
SEM	351	560,7	228,8	124	101,4	61,7
Signifikant	*	*/◆	*	*	*	*/◆

**Tab. 14** zu Abb. 16

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium subnormaler Konzentration (0,1µM) in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ◆ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	5021	2102	2437	2315	2026	1700
SD	446,6	239,5	226,9	545,1	211,8	231,5
SEM	182,3	97,8	92,6	222,6	86,5	94,5
Signifikant						
TSH 0,26mU	3995	2466	1780	2164	1775	1425
SD	231,7	520,4	298,3	107,6	253,8	258,5
SEM	94,6	212,4	121,8	43,9	103,6	105,6
Signifikant			*			
Retinol 2,6 nmol	5816	2799	2898	4073	2510	2042
SD	578,5	628,8	207,5	643,8	429	314,3
SEM	236,2	256,7	110,4	262,8	175,1	128,3
Signifikant				*/◆	*	*

TSH+Retinol2,6nmol	4064	2134	2714	2493	1857	1181
SD	442,3	430,2	236,6	253,5	232,1	106,5
SEM	180,6	175,6	96,6	103,5	94,8	43,5
Signifikant						
Methanol 10µl	5697	3121	3413	4664	3490	2492
SD	854,2	539,2	329,2	431,8	76,5	247,6
SEM	348,7	220,1	134,4	176,3	31,2	101,1
Signifikant		*	*	*	*	*/♦
NaClO <sub>4</sub> 1mM	1610	2715	1110	1030	1044	527
SD	260,4	671,3	229,7	248,5	212,4	58,8
SEM	106,3	274,1	93,8	101,4	86,7	24
Signifikant	*	♦	*	*	*	*

**Tab. 15** zu Abb. 17

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium (0,6µM) in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-freiem Kulturmedium in Tab. 16.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	10694,1	5589	6373,1	14645,8	3855,4	4903,2
SD	1154,2	744	1527,6	1238,2	460,6	820,7
SEM	471,2	303,7	623,6	505,5	188	335
Signifikant	♦	♦		♦		♦
TSH 0,26mU	11894,1	5853	6854,3	14368,9	3649,4	4653,6
SD	1413,4	357,5	900,5	1123,3	768,9	664,2
SEM	577	145,9	367,6	458,6	313,9	271,2
Signifikant	♦	♦		♦		
Retinol 2,6 nmol	10819	5251,6	8635,9	14339,2	4307	5286,2
SD	943,6	596,7	765,2	1315,5	330	768,6
SEM	385,2	243,6	312,4	537,1	134,7	313,8
Signifikant	♦	♦	*			

TSH+Retinol2,6nmol	12879,2	5368,9	8428,1	15163,1	3958,2	5222,6
SD	1734,8	588	1465	791,6	409,9	489
SEM	708,2	240	598,1	323,2	167,4	199,6
Signifikant	◆	◆	*		◆	◆
Methanol 10µl	8669,8	5124,2	7462,5	13096,4	3767,3	5448,8
SD	1081,6	545,7	1026,2	1410,1	535,9	989,6
SEM	441,6	222,8	419	575,7	218,8	404
Signifikant						
NaClO <sub>4</sub> 1mM	1564,8	1239	3373	3621	662,8	1460,5
SD	264,7	109,3	505,4	803,6	75,6	150,3
SEM	108,1	44,6	206,3	328	30,9	61,4
Signifikant	*/◆	*/◆	*	*	*/◆	*

**Tab. 16** zu Abb. 18

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-freiem Medium in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ◆ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 15.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	6166,6	9423,9	6316,1	7622,9	3159,5	2775,7
SD	1123,9	1471	970,6	1461,4	662,9	348,9
SEM	458,8	600,5	396,2	596,6	270,6	142,5
Signifikant	◆	◆		◆		◆
TSH 0,26mU	7781,2	9564,2	7662,8	9342,8	4267	3515,3
SD	747,5	1339,8	1450,8	1339	807	1098,5
SEM	305,2	547	592,3	546,7	329,5	448,5
Signifikant	◆	◆	*	◆	*	
Retinol 2,6 nmol	6974,7	9765	9439,4	12162,6	4580,8	3160,2
SD	487,8	921,4	1068,1	1530,2	393,9	447,8
SEM	199,2	376,2	436,1	624,7	160,8	182,8
Signifikant	◆	◆	*	*	*	

TSH+Retinol2,6nmol	7821,5	8615,5	8949,5	10806,5	5359	2954,7
SD	745	728,7	826,8	846,1	496,9	483,2
SEM	304,1	297,5	337,5	345,4	262	197,3
Signifikant	*/♦	♦	*	*	*/♦	♦
Methanol 10µl	5282,8	6853,4	9246	9850,3	4646,4	3657,9
SD	789,6	911,3	1407,4	2149,9	948,9	500,3
SEM	322,4	372	574,6	877,7	387,4	204,3
Signifikant			*		*	
NaClO <sub>4</sub> 1mM	1083,7	3116,3	4057,5	3446,6	1662,7	1980
SD	115,7	576,6	1097,7	795,7	173,3	2016
SEM	47	235,4	448,1	324,9	70,8	823
Signifikant	*/♦	*/♦	*	*	*/♦	

**Tab. 17** zu Abb. 19

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium dreifacher Konzentration (1,8µM) in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 15.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	11375,3	5774,1	8647,1	12342,9	3486,4	3970,6
SD	1783,3	822,7	851,6	1057,3	411,2	456,2
SEM	728	335,9	347,7	431,6	167,9	186,3
Signifikant						
TSH 0,26mU	10576,5	6519	10512,3	14132,8	3341,2	3921,5
SD	1187,7	283,2	855,4	813	752,9	658,8
SEM	484,9	115,6	349,2	331,9	307,4	269
Signifikant		*	*/♦			
Retinol 2,6nmol	8934	5397,8	8348,9	11593,9	3577,4	3772,2
SD	966,4	327,6	434,3	1204,9	416,3	549,4
SEM	394,5	133,7	177,3	491,9	170	224,3
Signifikant	*					

TSH+Retinol2,6nmol	10544	5454,6	9025,6	11116	3931,8	3741,6
SD	1343,3	221,5	1114,1	1582,7	674,8	437,5
SEM	548,4	90,4	454,8	646,1	275,5	178,6
Signifikant						
Methanol 10µl	7366,6	5034,3	9241,9	12932,2	4097,3	4624,9
SD	1112,9	475,9	432,3	2795,1	398,7	696,5
SEM	454,3	194,3	176,5	1126,4	162,8	284,4
Signifikant	*	*				
NaClO <sub>4</sub> 1mM	1460,9	1275	2075,1	4601,6	1561,5	1109,1
SD	369,7	84,9	313	929,9	265,1	188,6
SEM	150,9	34,7	127,8	379,6	108,2	77
Signifikant	*	*	*	*	*/♦	*

**Tab. 18** zu Abb. 20

<sup>125</sup>I-Aufnahme in Thyreozyten in Vitamin A-haltigem Medium subnormaler Konzentration (0,1µM) in cpm.

Angegeben sind Mittelwerte, SD, SEM bei n=6.

Die mit \* gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Die mit ♦ gekennzeichneten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Thyreozytenkultur in Vitamin A-haltigem Kulturmedium in Tab. 15.

/Zeit (Stunden)	6h	8h	10h	12h	18h	24h
Stimulation/						
ohne Stimulation	8721,3	5433	6921,6	11403,2	3248,7	4983,4
SD	1193,9	725,9	1009,7	1460,3	432,8	503,3
SEM	487,4	296,3	412,2	596,2	176,7	205,5
Signifikant						
TSH 0,26mU	9660,1	5317,3	9436,6	13203,1	2463,9	4601,2
SD	1010,5	740,3	1305,4	1305,7	526,7	877,8
SEM	412,5	302,2	532,9	533,1	215	358,4
Signifikant			*			
Retinol 2,6 nmol	9097,4	5645,9	9853,4	12742	2178,6	4601,6
SD	558,9	498,4	955,6	1108,5	298,1	464,4
SEM	228,2	203,5	390,1	452,5	121,7	189,6
Signifikant			*		♦	

TSH+Retinol2,6nmol	9518,8	4999	8392,6	12461,3	2304,6	4425,5
SD	871,1	481,5	712,3	1009,8	812	1051,8
SEM	355,6	196,6	290,8	412,3	331,5	429,4
Signifikant					◆	
Methanol 10µl	7318,8	4710,5	8228,3	13087,8	3033	5222,7
SD	2346,9	635,1	865,2	1085,7	1707,9	901,4
SEM	958,1	259,3	353,2	443,2	697,2	368
Signifikant						
NaClO <sub>4</sub> 1mM	1333,5	1083,9	2518,3	4522,6	854,6	1696,2
SD	227,3	128,7	718	1052,4	190,5	651,6
SEM	92,8	52,5	293,1	429,6	77,8	266
Signifikant	*	*	*	*	*	*

**Tab. 19** zu Abb. 21

Darstellung des RAR-Rezeptors in Vitamin A-haltigem Medium (0,6µM). Angegeben sind die Mittelwerte, SD, SEM des Anteils der RAR-positiven Thyreozyten aus 3 Zellzählungen.

Ohne Stimulation	0,7
SD	0,5
SEM	2,7
TSH	5,3
SD	0,9
SEM	0,54
TSH+Retinol2,6nmol	3,3
SD	3
SEM	1,66
TSH+Retinol5,2nmol	9,7
SD	1,7
SEM	0,98
TSH+Retinol7,8nmol	1,3
SD	1,9
SEM	1,09
TSH+Retinsäure2,6nmol	1
SD	0,8
SEM	0,47

**Tab. 20** zu Abb. 22

Darstellung des RAR-Rezeptors in Vitamin A-freiem Medium. Angegeben sind die Mittelwerte, SD, SEM des Anteils der RAR-positiven Thyreozyten aus 3 Zellzählungen.

Ohne Stimulation	0,7
SD	0,5
SEM	0,27
TSH	4
SD	0,8
SEM	0,47
TSH+Retinol2,6nmol	6
SD	0,5
SEM	0,27
TSH+Retinol5,2nmol	6,3
SD	1,7
SEM	0,98
TSH+Retinol7,8nmol	8
SD	1,63
SEM	0,94
TSH+Retinsäure2,6nmol	4,3
SD	0,94
SEM	0,54

**Tab. 21** zu Abb. 23

Darstellung des RXR-Rezeptors in Vitamin A-haltigem Medium (0,6 $\mu$ M). Angegeben sind die Mittelwerte, SD, SEM des Anteils der RXR-positiven Thyreozyten aus 3 Zellzählungen.

Ohne Stimulation	0
SD	0
SEM	0
TSH	0
SD	0
SEM	0

TSH+Retinol2,6nmol	0
SD	0
SEM	0
TSH+Retinol5,2nmol	1,7
SD	0,9
SEM	0,54
TSH+Retinol7,8nmol	0,3
SD	0,5
SEM	0,29
TSH+Retinsäure2,6nmol	4
SD	0,8
SEM	0,47

**Tab. 22** zu Abb. 24

Darstellung des RXR-Rezeptors in Vitamin A-freiem Medium. Angegeben sind die Mittelwerte, SD, SEM des Anteils der RXR-positiven Thyreozyten aus 3 Zellzählungen.

Ohne Stimulation	0
SD	0
SEM	0
TSH	1
SD	0
SEM	0
TSH+Retinol2,6nmol	2,7
SD	0,5
SEM	0,27
TSH+Retinol5,2nmol	3
SD	4,2
SEM	2,45
TSH+Retinol7,8nmol	0,7
SD	1,0
SEM	0,58
TSH+Retinsäure2,6nmol	1,3
SD	0,9
SEM	0,54

## 7. Literatur

- ALTUCCI, L., WILHELM, E., GRONEMEYER, H. (2004)  
Leukemia: beneficial actions of retinoids and rexinoids  
*Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 36 (2): 178-82
- ANKE, M., GROPPPEL, B., GURTLER, H., BAUCH, K. (1993)  
Jodmangel in Thüringen  
*Ärzteblatt Thüringen*, 4: 250-253
- ARAI, M., TSUSHIMA, T., ISOZAKI, O., SHIZUME, K., EMOTO, N., DEMURA, H., MIYAKAWA, M., ONODA, N. (1991)  
Effects of retinoids on iodine metabolism, thyroid peroxidase gene expression, and deoxyribonucleic acid synthesis in porcine thyroid cells in culture  
*Endocrinology*, 129(6): 2827-33
- ARTURI, F., RUSSO, D., GIUFFRIDA, D., SCHLUMBERGER, M., FILETTI, S. (2000)  
Sodium-iodide symporter (NIS) gene expression in lymph-node metastases of papillary thyroid carcinomas  
*Eur. J. Endocrinol.*, 143(5): 623-7
- ATKINSON, S. SMITH, PA., TAYLOR, JJ., KENDAL-TAYLOR, P. (1983)  
Specific epidermal growth factor receptors on porcine thyroid cell membranes  
*FEBS Lett.*, 153: 88-92
- BATES, RC., BURET, A., VAN HELDEN DF., HORTON, MA., BURNS, GF. (1994)  
Apoptosis induced by inhibition of intercellular contact  
*J. Cell. Biol.*, 125(2): 403-15
- BAUCH, K., ANKE, M., GURTLER, H., HESSE, V., KNAPPE, G., KORBER, R., VON KOZIEROWSKI, F., MENG, W., THOMAS, G., ULRICH, FE. (1989)  
Interdisciplinary aspects of iodine prophylaxis in German Democratic Republic  
*Endocrinol. Exp.*, 23(2): 77-84
- BECHTNER, G., POTSCHER, C., GARTNER, R. (1992)  
Role of autocrine and paracrine factors in thyroid follicle growth  
*Thyroidology*, 4(1): 1-5
- BRITTON, G. (1995)  
Structure and properties of carotenoids in relation to function  
*FASEB J.*, 9(15): 1551-8
- BRTKO, J., THALHAMER, J. (2003)  
Renaissance of the biologically active vitamin A derivatives: established and novel directed therapies for cancer and chemoprevention  
*Curr. Pharm. Des.*, 9(25): 2067-77
- CAMACHO, LH. (2003)  
Clinical applications of retinoids in cancer medicine.  
*J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 17(1): 98-114
- COYA, R., CARRO, E., MALLO, F., DIEGUEZ, C. (1997)  
Retinoic acid inhibits in vivo thyroid-stimulating hormone secretion  
*Life-Sci.*, 60(16): PL 247-50

- DAI, G., LEVY, O., CARRASCO, N. (1996)  
Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter  
*Nature*, 379: 458-60
- 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(5): 496-79
- DE LA VIEJA, A., DOHAN, O., LEVY, O., CARRASCO, N. (2000)  
Molecular analysis of the sodium / iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology  
*Physiol. Rev.*, 80(3): 1083-105
- DEL SENNO, L., ROSSI, R., GANDINI, D., PIVA, R., FRANCESCHETTI, P., DEGLI UBERTI, EC. (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(13): 1039-48
- DUGRILLON, A., GARTNER, R. (1992)  
The role of iodine and thyroid cell growth  
*Thyroidology*, 4(1): 31-6
- EGGO, MC, BACHRACH, LK., FAYET, G., ERRICK, J., 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(2-3): 141-50
- FAYET, G., HOVSEPIAN, S. (1979)  
Demonstration of growth in porcine thyroid cell culture  
*Biochem.*, 61, 923-930
- FENAUX, P., CHOMIENNE, C. (1996)  
Biology and treatment of acute promyelocytic leukaemia  
*Curr. Opin. Oncol.*, 8(1): 3-12
- FREEMANTLE, SJ., SPINELLA, MJ., DMITROVSKY, E. (2003)  
Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance  
*Oncogene.*, 22(47): 7305-15
- FRÖHLICH, E., WAHL, R. (1999)  
Effects of retinol on follicular porcine thyrocytes in culture  
*J. Mol. Med.*, 77(1): 189-92
- FRÖHLICH, E., BROSSART, P., WAHL, R. (2001)  
Effects of retinoids on porcine thyrocytes under different culture conditions  
*Histochem. J.*, 33(5): 295-304
- GARCIN, H., HIGUERET, P. (1983)  
Thyroid hormones in vitamin A-deficient rats: effect of retinoic acid supplementation  
*Ann Nutr Metab.*, 27(6): 495-500

- GÄRTNER, R. (1992)  
Einteilung der Schilddrüsenerkrankungen  
Internist. Berl., 33(11): 737-9
- GÄRTNER, R. (1992)  
Thyroid growth in vitro  
Exp. Clin. Endocrinol., 100(1-2): 32-5
- 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(2): 145-55
- GÄRTNER, R., GREIL, W., STUBNER, D., PERMANETTER, W., HORN, K., PICKARDT, CR. (1985)  
Preparation of porcine thyroid follicles with preserved polarity: functional and morphological properties in comparison to inside-out follicles  
Mol. Cell. Endocrinol., 40(1): 9-16
- GÄRTNER, R., BECHTNER, G., STUBNER, D., GREIL, W. (1990)  
Growth regulation of porcine thyroid follicles in-vitro by growth factors  
Horm. Metab. Res. Suppl., 23: 61-7
- GERARD, AC., DAUMERIE, C., MESTDAGH, C., GOHY, S., DE BURBURE, C., COSTAGLIOLA, S., MIOT, F., NOLLEVAUX, MC., DENEFF, JF., RAHIER, J., FRANC, B., DE VIJDER, JJ., COLIN, IM., MANY, MC. (2003)  
Correlation between the loss of thyroglobulin iodination and the expression of thyroid-specific proteins involved in iodine metabolism in thyroid carcinomas  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 88(10): 4977-83
- GORETZKI, PE., KOOB, R., KOLLER, C., ROHER, HD. (1987)  
Thyrotropin (TSH) stimulates cell growth and DNA synthesis in monolayer cultures of human thyrocytes independent of the adenylate-cyclase system  
Acta Endocrinol. Suppl., 281: 273-80
- GREIL, W., GÄRTNER, R., DEMHARTER, R., HORN, K. (1985)  
Thyrotropin is not a growth factor for porcine thyroid cells in vitro  
Acta Endocrinol., Suppl. 267, Abstract 85
- GREIL, W., NIEDERHUBER, G., STUBNER, D., GÄRTNER, R. (1987)  
Inhibition of cAMP formation by EGF in thyroid follicles is mediated by intracellular  $Ca^{2+}$   
Acta Endocrinol. (Copenh.) Suppl. 281: 267-9
- GRUNING, T., TIEPOLT, C., ZOPHEL, K., BREDOW, J., KROPP, J., FRANCKE, WG. (2003)  
Retinoic acid for redifferentiation of thyroid cancer-does it hold its promise?  
Eur. J. Endocrinol. , 148(4): 395-402
- GUPTA, V., TABAK, D., Keating, A. (2003)  
Acute promyelocytic leukemia: a case-based review  
Hematology, 8(2): 105-13

- HAMPEL, R., RONSCH, K. (1993)  
Trotz Verwendung von Jodsatz zur individuellen Speisenzubereitung bleibt ein Jodmangel I. Grades in Deutschland bestehen  
Z. Gesamte Inn. Med., 48(8): 401-3
- HAUGEN, BR., LARSON, LL., PUGAZHENTHI, U., HAYS, WR., KLOPPER, JP., KRAMER, CA., SHARMA, V. (2004)  
Retinoic acid and retinoid X receptors are differentially expressed in thyroid cancer and thyroid carcinoma cell lines and predict response to treatment with retinoids  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 89(1): 272-80
- HIRSCH, G. (1967)  
Hyperthyreosetherapie mit Vitamin A  
Therap. Gegenw., 106: 252-6
- IWATA, M., MUKAI, M., NAKAI, Y., ISEKI, S. (1992)  
Retinoic acids inhibit activation-induced apoptosis in T cell hybridomas and thymocytes  
Immunol., 149:3302-8
- JETTEN, AM., JETTEN, ME., SHAPIRO, SS., POON, JP. (1979)  
Characterization of the action of retinoids on mouse fibroblast cell lines  
Exp. Cell. Res., 119(2): 289-99
- JOCKENHÖVEL, F., OLBRICHT, T. (1993)  
Fragen und Antworten zur Epidemiologie und Ätiologie der Struma  
Z. Gesamte Inn. Med., 48(12): 565-74
- KOGAI, T., ENDO, T., SAITO, T., MIYAZAKI, A., KAWAGUCHI, A., ONAYA, T. (1997)  
Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium / iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells  
Endocrinology, 138(6): 2227-32
- KOGAI, T., CURCIO, F., HYMAN, S., CORNFORD, EM., BRENT, GA., HERSHMAN, JM. (2000)  
Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium / iodide symporter messenger RNA and protein expression  
J. Endocrinol., 167(1): 125-35
- KROLL, TG., SARRAF, P., PECCIARINI, L. (2000)  
PAX8-PPAR gamma1 fusion oncogene in human thyroid carcinoma  
Science, 289: 1357
- LANVERS, C., REINHARDT, D., DUBBERS, A., WAGNER-BOHN, A., CREUTZIG, U., RITTER, J., BOOS, J. (2003)  
Pharmacology of all-trans-retinoic acid in children with acute promyelocytic leukemia  
Med. Pediatr. Oncol., 40(5): 293-301
- LAVAU, C., JANSEN, J., DEJEAN, A. (1995)  
The t(15 ;17) translocation in acute promyelocytic leukemia  
Pathol. Biol. Paris, 43(3): 188-96

- 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(8): 659-63
- LENGFELDER, E., GNAD, U., BUCHNER, T., HEHLMANN, R. (2003)  
Treatment of relapsed acute promyelocytic leukemia  
Onkologie, 26(4): 373-9
- MANGELSDORF, DJ., KLIOWER, SA., KAKIZUKA, S., UMESONO, RM. (1992)  
Retinoid receptors  
Recent progress in hormone research, 4899-121
- MARGHESCU, S., LUBACH, D., RUDOLPH, PO. (1982)  
Die Therapie der Psoriasis mit Retinoid  
Z. Hautkr., 57(19): 1410-20
- MARTIN, J. (1994)  
Methodische und vergleichende Untersuchungen zum Wachstum von Schilddrüsen-Einzelzellen und Schilddrüsen-Follikeln  
Inaugural Dissertation, Universität Tübingen
- MENG, W. (1993)  
Jodmangel existiert noch in Ostdeutschland  
Z. Ärztl. Fortbild. Jena, 87(12): 969-74
- MORLEY, JE., DAMASSA, DA., GORDON, J., PEKARY, AE., HERSHMAN, JM. (1978)  
Thyroid function and vitamin A deficiency  
Life Sci., 22(21): 1901-5
- MORLEY, JE., MELMED, S., REED, A., KASSON, BG., LEVIN, SR., PEKARY, AE., HERSHMAN, JM. (1980)  
Effect of vitamin A on the hypothalamo-pituitary-thyroid axis  
Am. J. Physiol. 238(2): E174-9
- MULLER, CP., KRUEGER, GR. (1986)  
Modulation of membrane proteins by vertical phase separation and membrane lipid fluidity. Basis for a new approach to tumor immunotherapy  
Anticancer Res. 6: 1181-1193
- NAGY, L., THOMAZY, VA., SHIPLEY, GL., FESUS, L., LAUPH, W., HEYMAN, RA., CHANDRARATNA, RA., DAVIES, PJ. (1995)  
Activation of Retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines  
Mol. Cell. Biol., 15(7): 3540-51
- NAMBA, H., YAMASHITA, S., MORITA, S., VILLADOLID, MC., KIMURA, H., YOKOYAMA, N., IZUMI, M., ISHIKAWA, N., ITO, K., NAGATAKI, S. (1993)  
Retinoic acid inhibits human thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression in cultured human thyrocytes  
J. Endocrinol. Invest., 16(2): 87-93
- NAPOLI, JL. (1999)  
Interactions of retinoid binding proteins and enzymes in retinoid metabolism  
Biochem. Biophys. Acta, 1440(2-3): 139-62

- NASU, M., SUGAWARA, M. (1993)  
Ethanol has thyrotropin-like activity in cultured porcine thyroid follicles  
*Endocrinology*, 132: 155-160
- NITSCH, L. (1980)  
Thyrotropin preparations are mitogenic for thyroid epithelial cells in follicles in suspension culture  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(5): 2743-7
- OHNO, R., ASOU, N., OHNISHI, K. (2003)  
Treatment of acute promyelocytic leukemia: strategy toward further increase of cure rate  
*Leukemia*, 17(8): 1454-63
- ORLANDI, M., MANTOVANI, B., AMMAR, K., AVITABILE, E., DAL MONTE, P., BARTOLINI, G. (2003)  
Retinoids and cancer: antitumoral effects of ATRA, 9-cis RA and the new retinoid IIF on the HL-60 leukemic cell line  
*Med. Princ. Pract.*, 12(3): 164-9
- PARMAR, S., TALLMAN, MS. (2003)  
Acute promyelocytic leukaemia: a review  
*Expert Opin. Pharmacother.*, 4(8): 1379-92
- PEMRICK, SM., LUCAS, DA., GRIPPO, JF. (1994)  
The retinoid receptors  
*Leukemia*, 8(11): 1797-806
- PFANNENSTIEL, P. (1991)  
Empfehlung zur Diagnose von Schilddrüsenfunktionsstörungen und von Schilddrüsenkrankheiten  
*Röntgenpraxis*, 44(8): 231-8
- PFANNENSTIEL, P., HOTZE, SALLER, B. (1997)  
Schilddrüsenkrankheiten: Diagnose und Therapie  
Berliner Medizinische Verlagsanstalt
- PFANNENSTIEL, P., SALLER, B. (1991)  
Schilddrüsenkrankheiten; Diagnose und Therapie, 2. Auflage  
Berliner Medizinische Verlagsanstalt
- RALHAN, R., KAUR, J. (2003)  
Retinoids as chemopreventive agents  
*J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 17(1): 66-91
- ROGER, PP., DUMONT, JE. (1983)  
Thyrotropin and the differential expression of proliferation and differentiation in dog thyroid cells in primary culture  
*J. Endocrinol.*, 96(2): 241-9
- ROGER, PP., SERVAIS, P., DUMONT, JE. (1983)  
Stimulation by thyrotropin and cyclic AMP of the proliferation of quiescent canine thyroid cells cultured in a defined medium containing insulin  
*FEBS. Lett.*, 157(2): 323-9
- ROGER, PP., DUMONT, JE. (1987)  
Thyrotropin is a potent growth factor for normal human thyroid cells in primary culture  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149(2): 707-11

- ROMEIS (1989)  
Mikroskopische Technik,  
Urban-Schwarzenberg, 17. Auflage, Seite 86
- ROWE, A. (1997)  
Retinoid X receptors  
Int. J. Biochem. Cell. Biol., 29(2): 275-8
- SAITO, T., ENDO, T., KAWAGUCHI, A., IKEDA, M., NAKAZATO, M., KOGAI, T., ONAYA, T. (1997)  
Increased expression of the Na/I symporter in cultured human thyroid cells exposed to the thyrotropin and in Graves` thyroid tissue  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 82(10): 3331-6
- SAITO, T., ENDO, T., KAWAGUCHI, A., IKEDA, M., KATOH, R., KAWAOI, A., MURAMATSU, A., ONAYA, T. (1998)  
Increased expression of the sodium / iodide symporter in papillary thyroid carcinomas  
Am. Soc. Clin. Invest., 101(7): 1296-300
- SCHMUTZLER, C., KÖHRLE, J. (1998)  
Implications of the molecular characterization of the sodium-iodide symporter (NIS)  
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, 106 Suppl. 3: S1-10
- SCHMUTZLER, C., KÖHRLE, J. (2000)  
Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer  
Thyroid, 10(5): 393-406
- SCHMUTZLER, C., WINZER, R., MEISSNER-WEIGL, J., KÖHRLE, J. (1998)  
Retinoic acid increases sodium / iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 246(2): 562
- SCHMUTZLER, C., SCHMITT, TL., GLASER, F., LOOS, U., KÖHRLE, J. (2002)  
The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid  
Mol. Cell. Endocrinol., 189(1-2): 145-55
- 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
- SHIMURA, H., HARAGUCHI, K., MIYAZAKI, A., ENDO, T., ONAYA, T. (1997)  
Iodide uptake and experimental <sup>131</sup>I Therapy in transplanted thyroid cancer cells expressing the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene
- SIMKINS, S. (1947)  
Use of massive dosis of vitamin A in the treatment of hyperthyroidism  
J. Clin. Endocrinol. Metab., 7: 574-85
- SIMON, D., KÖHRLE, J., SCHMUTZLER, C., MAINZ, K., REINERS, C., ROHRER, HD. (1996)  
Redifferentiation therapy of differentiated thyroid carcinoma with Retinoic acid: basics and first clinical results  
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes, 104 Suppl. 4 : 13-5

- SMANIK, PA., LIU, Q., FURMINGER, TL., RYU, K., XING, S., MAZZAFERRI, EL., JHIANG, SM. (1996)  
Cloning of the human sodium iodide symporter  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 226(2): 339-45
- SMITH MA., PARKINSON DR., CHESON BD., FRIEDMAN MA. (1992)  
Retinoids in cancer therapy  
*J. Clin. Oncol.*, 10(5): 839-64
- SPITZWEG, C., MORRIS, JC. (2002)  
The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications.  
*Clin. Endocrinol. (Oxf)*., 57(5): 559-74
- STUTTGEN, G. (1980)  
Retinoide. Vitamin-A-Säure und ihre Derivate in der Dermatologie  
*MMW. Munch. Med. Wochenschr.*, 122(38):1285-6
- SUCOV, HM., EVANS, RM. (1995)  
Retinoic acid and retinoic acid receptors in development  
*Mol. Neurobiol.*, 10(2-3): 169-84
- TRAPASSO, F., IULIANO, R., CHIEFARI, E., ARTURI, F., STELLA, A., FILETTI, S., FUSCO, A., RUSSO, D. (1999)  
Iodide symporter gene expression in normal and transformed rat thyroid cells  
*Eur. J. Endocrinol.* 140(5): 447-51
- TUROWSKA, MD., ROGOWSKI, F., JURGILEWICZ, DH. (2000)  
Iodine, sodium-iodine symporter and thyroid diseases  
*Przegl. Lek.*, 57(6): 353-5
- VALENTE, WA., VITTI, P., KOHN, LD., BRANDI, ML., ROTELLA, CM., TOCCAFONDI, R., TRAMONTANO, D., ALOJ, SM., AMBESI-IMPIOMBATO, FS. (1983)  
The relationship of growth and adenylate cyclase activity in cultured thyroid cells: separate bioeffects of thyrotropin  
*Endocrinology*, 112(1): 71-9
- WADELEUX, PA., WINAND, RJ. (1981)  
Some unexpected effects of thyrotropin on the metabolism of thyroid cells isolated from non-toxic goitre  
*Acta Endocrinol. (Copenh.)*, 98(4):533-9
- 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. Feb*; 32(1): 81-8
- WEIS, K., RAMBAUD, S., LAVAU, C., JANSEN, J., CARVALHO, T., CARMO-FONSECA, M., LAMOND, A., DEJEAN, A. (1994)  
Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells  
*Cell.*, 76(2): 345-56
- WESTERMARK, B., KARLSSON, FA., WALINDER, O. (1979)  
Thyrotropin is not a growth factor for human thyroid cells in culture  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76(4):2022-6

ZHANG, O., MILLS, KJ., DAWSON, MI., COLLINS, SJ., JETTEN, AM. (1995)  
Evidence of the involvement of retinoic acid receptor RAR alpha-  
dependent signalling pathway in the induction of tissue transglutaminase  
and apoptosis by retinoids  
J. Biol. Chem., 270: 6022-9

## **Danksagung**

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. R. Wahl für die Überlassung des Themas, die Einführung in sein Forschungsprojekt sowie der Vermittlung seiner wissenschaftlichen Denkweise.

Herr Professor Wahl stand mir durch viele gedankliche Anregungen und kritische Anmerkungen stets hilfsbereit zur Seite.

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

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

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



## Lebenslauf

**Name:** Christine Beyer

**Geb. am:** 20.04.72

**Geburtsort:** Neustadt / Aisch

**Eltern:** Dr. Hans-Jürgen Beyer, Zahnarzt  
Christa Beyer, Hausfrau

**Geschwister:** Andreas Beyer

**Schulbildung:** von 1978-1982 Besuch der Hohenberg-Grundschule in Rottenburg,  
von 1982- Juli 1991 Besuch des Eugen-Bolz-Gymnasiums in Rottenburg

**Schulabschluss:** Abitur am 12.06.91

**Berufsausbildung:** von 1991- 1994 Berufsausbildung zur Zahnarthelferin in Praxis Dr. Beyer / berufliche Schule in Tübingen-Derendingen;  
Aushändigung des Helferinnenbriefes am 24.06.94

**Studium:** vom WS`94/`95 – WS`96/`97 Studium der Biologie an der Universität Tübingen;  
Diplom-Vorprüfung am 09.10.96;  
vom SS`97 bis 28.11.01 Studium der Zahnmedizin an der Universität Tübingen;  
Naturwissenschaftliche Vorprüfung am 20.06.97 / 27.08.97, anerkannt durch das Landesprüfungsamt in Stuttgart;  
Zahnärztliche Vorprüfung am 31.03.99;  
Zahnärztliche Prüfung am 23.11.01  
Approbation als Zahnärztin am 28.11.01

**Ab Dezember 2001:** Wissenschaftliche Mitarbeiterin am ZZMK-Tübingen, Poliklinik für Zahnerhaltung (Prof. Dr. C. Löst)

