

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik  
Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin IV**

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

**Einfluss von Troglitazon, Tocopherol und 2,4-  
Thiazolidindion auf den Stoffwechsel transformierter  
humaner Thyreozyten und nicht-transformierter  
Schweinethyreozyten**

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

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

**vorgelegt von  
SIMONE MANEA FISCHER  
aus  
Gerlingen**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wahl

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. E. Fröhlich

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	6
<b>2. Material</b>	12
2.1 Verzeichnis der Abkürzungen	12
2.2 Geräte für die Zellkulturen	13
2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität	13
2.4 Medien und Reagenzien	14
<b>3. Methoden</b>	16
3.1 Präparation der Schweineschilddrüsenzellen	16
3.2 Flussdiagramm der Schweinethyreozytenpräparation	17
3.3 Zellzählung	18
3.4 Herstellung der Schweinethyreozytenkulturen	18
3.5 Herstellung von Kulturen mit Schilddrüsenmalignomzellen	20
3.6 Inkubation und Kultivierung	21
3.7 Mycoplasmennachweis	23
3.8 Zellernte	24
3.8.1 Messung der $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme	24
3.8.2 Messung der $^{125}\text{I}$ -Speicherung	24
3.9 PPAR $\gamma$ - und Retinsäurerezeptorbestimmung	24
3.10 Apoptosebestimmung	26
3.11 Statistische Auswertung	27
<b>4. Ergebnisse</b>	28
4.1 Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten	28
4.1.1 $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol- und Retinolkonzentrationen	28
4.1.2 $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen	34

4.2	Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten	39
4.2.1	<sup>3</sup> H-Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol- und Retinolkonzentrationen	39
4.2.2	<sup>3</sup> H-Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen	45
4.3	Iodidaufnahme in kultivierte gesunde Schweinethyreozyten	49
4.3.1	<sup>125</sup> I-Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol- und Retinolkonzentrationen	49
4.3.2	<sup>125</sup> I-Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen	54
4.4	Thymidinaufnahme in kultivierte gesunde Schweinethyreozyten	59
4.4.1	<sup>3</sup> H-Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol- und Retinolkonzentrationen	59
4.4.2	<sup>3</sup> H-Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen	64
4.5	PPAR $\gamma$ -Quantifizierung in humanen karzinogenen Thyreozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Troglitazonkonzentrationen	69
4.6	Beeinflussung der Apoptoserate von karzinogenen Thyreozyten durch Staurosporin, Troglitazon und Retinol	73
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
5.1	Methoden	76
5.2	<sup>125</sup> I-Iodid- und <sup>3</sup> H-Thymidininkorporation in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol-, 2,4-Thiazolidindion- und Retinolkonzentrationen	78
5.3	<sup>125</sup> I-Iodid- und <sup>3</sup> H-Thymidininkorporation in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol-, 2,4-Thiazolidindion- und Retinolkonzentrationen	82
5.4	PPAR $\gamma$ -Quantifizierung in humanen karzinogenen Thyreozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Troglitazonkonzentrationen	84
5.5	Beeinflussung der Apoptoserate von karzinogenen Thyreozyten durch Staurosporin, Troglitazon und Retinol	86

<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	88
<b>7.</b>	<b>Literaturangaben</b>	90
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	99
8.1	Statistik-Tabellen	99
8.2	Mittelwerte und SEM normiert auf die Kontrolle	127

## 1. Einleitung

Die Schilddrüsentumoren werden nach WHO (1988) unterteilt in epitheliale und nichtepitheliale Tumoren, maligne Lymphome, Metastasen, sekundäre Tumoren, nicht klassifizierbare Tumoren und tumorartige Veränderungen. Bei den epithelialen Tumoren der Schilddrüse können benigne und maligne Formen unterschieden werden. Bei den Malignomen werden die differenzierten Karzinome wie das follikuläre, das papilläre und das medulläre (C-Zell-) Karzinom von dem undifferenzierten (anaplastischen) Karzinom abgetrennt. Der prozentuale Anteil der Schilddrüsenmalignome an allen Krebserkrankungen beträgt circa 1% (Karavitaki et al., 2002). Bei 33 % aller Schilddrüsenkarzinome handelt es sich um solche vom follikulären Typus. Die differenzierten Formen des Schilddrüsenmalignoms haben eine sehr gute Prognose (10-Jahresüberlebensrate: 80%-95%) (Mackenzie et al. 2004). Das Schilddrüsenkarzinom ist auch als seltene Ursache einer Schilddrüsenüberfunktion beschrieben worden (Brauckhoff et al. 2001; Scherübl et al. 1989). Die Radioiodtherapie ist ein wichtiger Bestandteil in der Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen. Sie wird in Kombination mit Chirurgie (radikale Thyreoidektomie), perkutaner Strahlentherapie und medikamentöser Therapie individuell für jeden Fall angewandt. Durch die Thyreoidektomie steigt infolge des Absinkens der Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum die endogene TSH-Produktion stark an. Es kommt dadurch zu einer Verbesserung der Radioiodspeicherung in der Restschilddrüse oder in iod-speichernden Metastasen, sofern diese noch Radioiod speichern können. Dies wäre dann eine günstige Voraussetzung für die nachfolgende Radioiodtherapie. Die Fähigkeit zur optimalen Radioiodaufnahme in die Schilddrüsenzellen ist bei karzinogenen Thyreozyten jedoch oft nicht mehr gegeben (Klutmann et al. 2001). Die Ausschaltung von Restschilddrüsengewebe nach der Operation, die Zerstörung nicht operabler Resttumoren oder Lokalmetastasen und die Behandlung von Fernmetastasen durch  $^{131}\text{I}$ -Iod ist dadurch erschwert oder unmöglich (Reinwein et al. 1996).

Der Transport von Iodid in die Schilddrüse wird von einem speziellen Transporter, dem Natrium-Iodid-Symporter (NIS), vermittelt. Diese NIS-vermittelte Anhäufung von Iodid in Thyreozyten ist auch eine entscheidende Voraussetzung für den Erfolg einer Radioiodtherapie sowohl bei gut- als auch bei bösartigen Schilddrüsenerkrankungen (Troutett-Masson et al. 2004, Smit et al. 2001, Spitzweg et al. 2000).

Erst seit wenigen Jahren kann in Deutschland die neue Substanzklasse der Thiazolidindione (Synonym: Glitazone) gegen den Typ-2-Diabetes eingesetzt werden. Mit dieser relativ neuen Medikamenten-Gruppe wird der Pathomechanismus der Erkrankung, die Insulinresistenz, direkt angegangen (Janka 2001). Deshalb wird diese Substanzgruppe auch als Insulinsensitizer bezeichnet.

Die Insulinempfindlichkeit kann durch Bindung des Insulinsensitizers an den Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ( $PPAR\gamma$ ) und seine dadurch ausgelöste Aktivierung verbessert werden (Debril MB. et al. 2001).  $PPAR\gamma$  wird der Familie der nukleären Hormonrezeptoren zugeordnet. Nach Aktivieren des Rezeptors bildet dieser mit einem weiteren nukleären Rezeptor, dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR), einen Komplex. Es entsteht ein Heterodimer, das spezifische DNA-Sequenzen in den Promotor-Regionen verschiedener auf Insulin reagierender Gene erkennt. Dadurch resultiert letztlich eine vermehrte Bildung von Proteinen. Diese Proteine sind für die Übertragung des Insulinsignals innerhalb der Zelle und für das Einschleusen von Glucose in die Zelle (vor allem Muskel- und Fettzellen) verantwortlich (Janka 2001).  $PPAR\gamma$  ist neben der insulinvermittelten Glucoseaufnahme in periphere Gewebe auch an der Differenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten beteiligt (Vazquez et al. 2002).

Über ihre ursprüngliche Funktion als Insulinsensitizer hinaus, spielen die Glitazone neuerdings auch in der Tumorthherapie eine bedeutende Rolle (Fujiwara et al. 2000). Unter ihrem Einfluss konnte eine Wachstumsinhibition und eine Redifferenzierung in verschiedenen Tumorzellen erzielt werden. Nach

Kawa et al. (2002) ist Troglitazon eine Substanz, die effektiv in der Therapie gegen humane Pankreasneoplasien eingesetzt werden könnte. Auch im Falle eines humanen Hypophysenadenoms konnte ein Stillstand des Zellzyklus und ein Apoptosevorgang beobachtet werden (Heaney et al. 2003). Hinsichtlich der Schilddrüse verhinderte Troglitazon signifikant das Wachstum von Thyreozyten aus einigen humanen Schilddrüsentumorarten. Dieser tumorsuppressive Effekt von Troglitazon kann einen Fortschritt in der Therapie von Schilddrüsentumoren bedeuten (Park et al. 2003, Chung et al 2002, Ohta et al. 2001).

Wichtige Prozesse wie die der Entwicklung, Differenzierung, Morpho- und Organogenese, des Wachstums, des Stoffwechsels und der Homöostase werden durch Vitamin A und seine Derivate, die Retinoide, reguliert. Ein Einfluß von Retinoiden auf die Genregulation und Proliferation von Schilddrüsenzellen wurde mehrfach nachgewiesen (Simon et al. 2002, Schmutzler et al. 2000).

Ergebnisse klinischer Studien zeigten, dass die Wirkung von Retinoiden sich positiv bei der Behandlung von Schilddrüsenmalignomen auswirkt. Retinoide führten dabei zur verstärkten Iodaufnahme und zu einer partiellen Redifferenzierung der Tumorzellen (Schmutzler et al. 2000). Der für die Iodidaufnahme erforderliche Natrium-Iodid-Symporter muss also in seiner Funktion wieder hergestellt worden sein. Außerdem induzieren Retinoide nicht zuletzt die Apoptose, den programmierten Zelltod, womit die Möglichkeit besteht, gezielt Zellen absterben zu lassen (Fröhlich et al. 1999). Durch Apoptose können auch beschädigte oder mutierte Zellen eliminiert werden, bevor sie zu einer Gefahr für den Organismus werden. (Gratzl et al., 2002 ).

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Troglitazon sowohl auf den Stoffwechsel maligner humaner (transformierter) Schilddrüsenzelllinien zu untersuchen als auch seine dort hervorgerufenen Effekte mit jenen an kultivierten nicht transformierten Thyreozyten zu vergleichen. Als nicht transformierte Thyreozyten dienten Thyreozyten vom Schwein, da nicht transformierte humane Thyreozyten nur in begrenztem Umfang zur Verfügung stehen. Parallel hierzu wurde die Wirkung von Vitamin E und 2,4-

Thiazolidindion auf die Thyreozyten untersucht. Die Grundstruktur des Vitamin E und des 2,4-Thiazolidindions ist in der chemischen Struktur des Troglitazons enthalten. Die Untersuchung dieser Teilkomponenten kann daher Aufschluss über die wirksame Komponente des Troglitazons geben.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu prüfen, ob Troglitazon oder seine Teilkomponenten zusammen mit Vitamin A (Retinol) einen additiven Effekt auf die Thyreozyten ausübten. Die Stimulation unserer Zellen erfolgte daher zusammen mit verschiedenen Vitamin A-Konzentrationen.

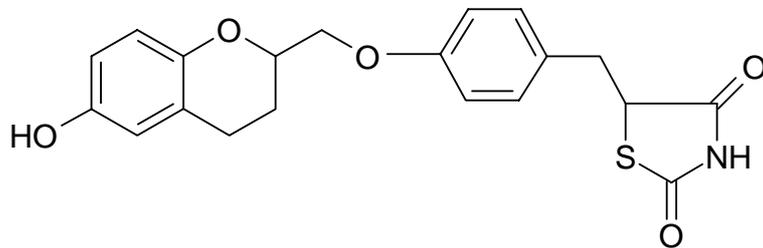
Betrachtet man die erhöhte bzw. wiedererlangte Fähigkeit zur Radioiodidinkorporation der Thyreozyten unter Retinoiden, so könnte ein Synergismus zwischen Retinoiden und Glitazonen sogar eine neue Alternative zur Bekämpfung von Schilddrüsenzellkarzinomen darstellen.

In diesem Zusammenhang wird in einem weiteren Teil der Arbeit daher die Quantifizierung von PPAR $\gamma$  in malignen Thyreozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Troglitazonkonzentrationen untersucht.

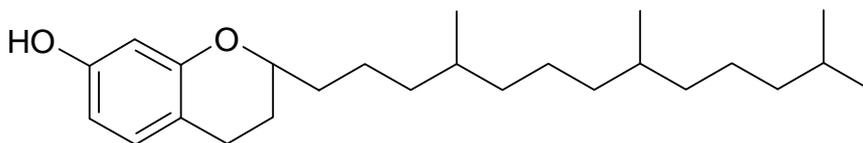
Desweiteren wurde auch die Beeinflussung der Apoptoserate von karzinogenen Thyreozyten durch Troglitazon und Retinol bestimmt. Auch die Informationen über das Apoptoseverhalten der humanen Thyreozyten unter Glitazoneinfluss können in der Behandlung von Schilddrüsenmalignomen von Bedeutung sein.

## Strukturformeln

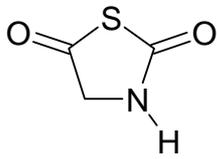
Troglitazon



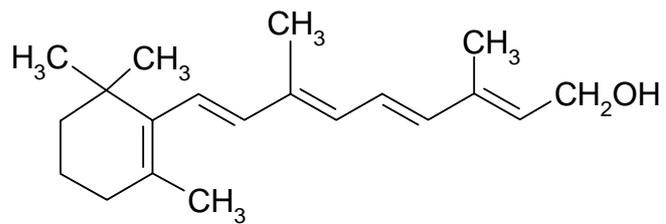
Alpha-Tocopherol (Vitamin E)



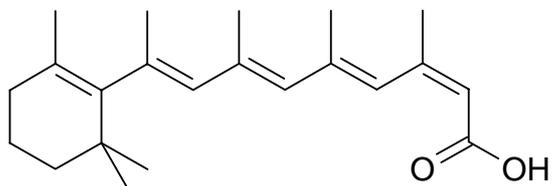
## 2,4 - Thiazolidindion



## all trans-Retinol (Vitamin A)



## 13-cis-Retinsäure



## 2. Material

### 2.1 Abkürzungen

Abb.	= Abbildung
Bq	= Becquerel, ein Zerfall pro Sekunde
DMSO	= Dimethylsulfoxid
EGF	= epidermaler Wachstumsfaktor
FACS	=Fluorescence activated cell sorter
FTC	=Follicular Thyroid Carcinoma
g	= Gramm
µg	= Mikrogramm
g	= Gravitation, Erdbeschleunigung
h	= Stunde
JMP	= Statistikprogramm von SAS
kBq	= KiloBecquerel
l	= Liter
M	= molare Masse, Molarität
µM	= mikromolar
mg	= Milligramm
min	= Minute
ml	= Milliliter
µl	= Mikroliter
MU	= Milliunit
n	= Anzahl der Thyreozyten bei Zellzählung
NIS	= Natrium-Iodid-Symporter
p	= statistische Wahrscheinlichkeit
PPAR <sub>γ</sub>	= Peroxisome proliferator-activated receptor
PTEN	= Phosphatase and tensin homolog
RXR	= Retinoid X Receptor
s	= Sekunde
SD	= Standardabweichung
SEM	= Standardfehler des Mittelwertes

Tab.	= Tabelle
TSH	= Thyreoideastimulierendes Hormon, Thyreotropin
U	= Unit
Vit A	= Vitamin A, Retinol
Vit E	= Vitamin E, $\alpha$ -Tocopherol
% ( $\frac{V}{V}$ )	= Volumenprozent

## 2.2 Geräte für die Zellkulturen

- **Sterile Werkbank:** cearg Shirp, Envirco 4711 Bork/Westfalen
- **Zentrifugen:** Hettich Rotixa/RP, Typ 4200  
Hettich Roto Silenta/K
- **Mikroskop:** für Zellzählung Carl Zeiss Nr. 5100671
- **Inkubator:** CO2 water jacketed Incubator Modell 3111 ; Forma Scientific
- **Kulturgefäße:** 48 well cell cultur cluster, Corning Incorporated,  
Costar 3584
- **Zellerntegerät:** cell harvester, Inotech, Typ IH-280, Nr 152
- **Sterile Einwegfilter:** Minisart 17598; 0,45 $\mu$ M
- **Filterpapier:** FilterMAT 1173, Filter size 102x256 mm
- **Zellkulturflaschen:** 75cm<sup>2</sup>, Costar
- **Elisa-Reader:** SLT Spectra; SLT Labinstruments Deutschland GmbH

## 2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität

- Zur Messung von Beta-Strahlung :  
Liquid Scintillation Counter, Wallac 1410; Pharmacia
- Zur Messung von Gamma-Strahlung :  
LKB Wallac 1277 Gammamaster, automatic gamma counter

## 2.4 Medien und Reagenzien

- **(6-<sup>3</sup>H)-Thymidin**, 20-30Ci/mmol, TRK 61, (Amersham Pharmacia Biotech, England)
- **<sup>125</sup>I** (Iodine in NaOH Soln. pH7-11 ), (Amersham Pharmacia Biotech, England)
- **2,4-Thiazolidindion** Lot SO1637-061 (Aldrich, Steinheim)
- **Amphotericin B**, 25mg/l Spinner- Lösung, (Squibb, München)
- **Ciprobay 200** ( Ciproflaxin), 50ml/l Spinner-Lösung (Bayer, Leverkusen)
- **Dimethylsulfoxid (DMSO)** EC No.: 200-664-3(Sigma, Steinheim)
- **Dispase II** (neutrale Protease) aus Bazillus polymyxa grade II, 5 g/l, (Roche, Mannheim)
- **D-MEM/F12 1:1 Mixture mit GlutaMAX II**, Medium für maligne Zellen (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Erythrosin B**, Indikator für Zellzählung, Merck, (Darmstadt)
- **Fetales Kälberserum**, Lot 75H3387(Sigma Cell Culture, St.Louis)
- **Hydrocortison 100**, 1µg/ml Medium (Pharmacia+Upiohu)
- **Isotone Natriumchloridlösung 0,9%** Braun 10ml/50mg Amphotericin B
- **Medium NCTC135 with L-Glutamine**, Lot.No.3039793, (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Medium NCTC-135 without Vit. A**, Lot. No.3049316, (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Methanol** (Lösungsmittel für die Retinoide)
- **Mycoplasma Detection Kit** 1296744, Enzyme Immunoassay, (Boehringer, Mannheim)
- **Natriumbicarbonat 7,5%**, Lot 3040440, (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Penicillin-Streptomycin-Stammlösung** (Roche, Mannheim), 50 000U Penicillin, 0,05 g Streptomycin aufgelöst in 20 ml Aqua dest.; Konzentration pro Liter NCTC-Medium: 10 000U Penicillin und 10 mg Streptomycin
- **all-trans-Retinol**, R-7632 (Sigma, USA)
- **13-cis-Retinsäure** , R-3255 (Sigma, USA)

- **Ampuwa , steriles H<sub>2</sub>O**, (Fresenius Kabi, Bad Homburg)
- **Salzlösung nach Earle**, EBSS(10x), Lot No.3041323 Life Technologies (Gibco, Paisley, Schottland)
- **Lösung nach Spinner**, zum Transport der Schweineschilddrüsen: 900ml steriles H<sub>2</sub>O, 100 ml Salzlösung nach Earle, 8-9 ml Natriumbicarbonat
- **Staurosporin** (Roche, Mannheim)
- **Szintillationsflüssigkeit**, Ultima Gold, Packard, (Groningen)
- **Trypsin-EDTA** Lot.No. 3054085(Gibco, Paisley, Schottland)
- **TSH** vom Schwein, Lot. T8785, Sigma, (USA)
- **Ultroser G** als Serumersatz, (Biosepra, Frankreich)
- **Troglitazon**, (Calbiochem)
- **alpha-Tocopherol**, (Sigma)

### **3. Methoden**

#### **3.1. Präparation der Schweineschilddrüsenzellen**

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

Zuerst wurde das umgebende Fett- und Bindegewebe mit einer sterilen Pinzette und Schere entfernt. Dann spülte man die Schilddrüsen drei Minuten in einer 80%igen Ethylalkohollösung. Somit konnte die nun anfixierte Kapsel und das septale Bindegewebe gut mit zwei Pinzetten entfernt werden. Danach wurde das freigelegte Schilddrüsenparenchym mit einem Skalpell in Würfel, die eine Kantenlänge von 2-3mm aufwiesen, geschnitten und in ein Trypsiniergefäß mit einem Liter Dispase-Lösung gegeben. In der Dispaselösung, die auf 35°C vorgewärmt war, wurde unter ständigem Rühren (heizbarer Magnetrührer) das interstitielle Bindegewebe der Schilddrüsen abgedaut. Die Thyreozyten gingen dabei in Suspension über.

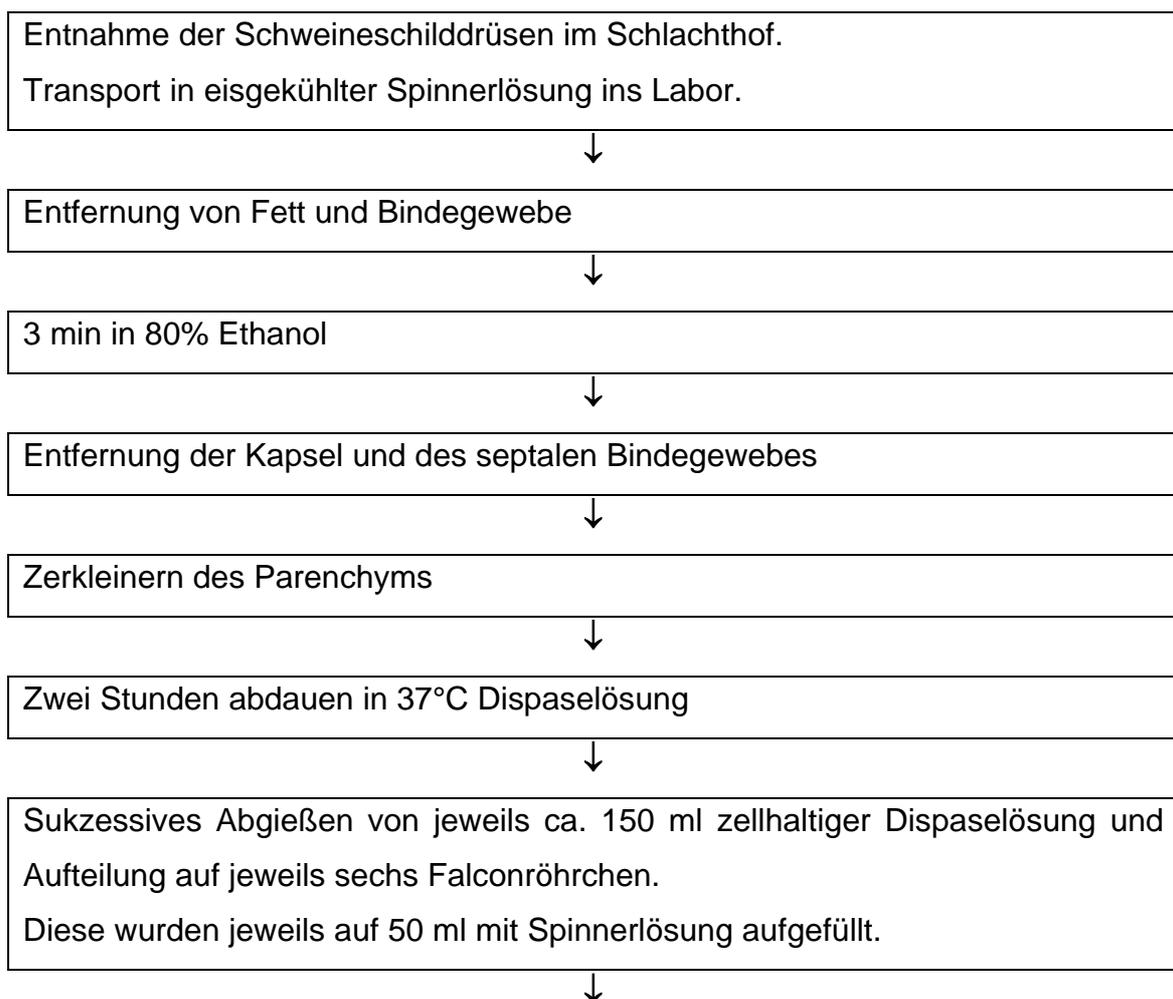
Zwei Stunden nach Beginn des Abdauprozesses wurden zunächst 150ml der Enzymlösung mit darin enthaltenen abgelösten Zellen durch ein Teesieb abgossen. Durch das Teesieb wurden größere Bindegewebsbestandteile abgefangen. Es wurde dem Trypsiniergefäß solange zellhaltige Enzymlösung entnommen, bis nur noch ein Bindegewebskonglomerat zurückblieb.

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

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

Die allerletzten 6 Zentrifugenröhrchen wurden bei 4°C 6 Minuten lang bei 160g (= Programm 2) zentrifugiert, der Überstand dekantiert, die Zellen resuspendiert und auf 2 Röhrchen minimiert. Erneut mit Spinnerlösung auf 50ml aufgefüllt wurden die Thyreozyten mit Programm 2 zentrifugiert, dekantiert, resuspendiert und in einem einzigen Röhrchen gesammelt. Ziel war es nun, eine möglichst reine Thyreozytenfraktion zu erhalten. Hierzu wurden die Thyreozyten mehrmals gewaschen und zentrifugiert, bis die Pellets keinen makroskopisch sichtbaren Erythrozytensaum mehr aufwiesen. Abschließend wurde noch einmal dekantiert und die Zellen in 50 ml Medium resuspendiert. Es konnte nun die Zellzählung durchgeführt werden.

### 3.2 Flussdiagramm der Schweinethyreozytenpräparation



Mehrfaches Zentrifugieren der Zellsuspensionen, schließlich Vereinigung der Zellpellets auf ein Falconröhrchen (7 min, 4°C, 180 g)



Wiederholtes Zentrifugieren des letzten Zentrifugenröhrchens (7 min, 4°C, 120g) um Erythrozyten zu entfernen.



Ermittlung der Zellzahl in 50 ml Zellsuspension

### 3.3 Zellzählung

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

Der Anteil der vitalen Zellen betrug im Schnitt 90%.

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

### 3.4 Herstellung von Schweinethyreozytenkulturen

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

Als Zusätze zu den Kulturmedien wurden verwendet:

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

- Ciprobay 200 (3 Vol.%)
- Vitamin A (Retinol)

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

Die zu testenden Stimulanzen (siehe weiter unten) wurden wegen der Variabilität innerhalb eines Versuches direkt den einzelnen Kulturen zupipettiert. Um einen möglichst genauen Mittelwert bei den Versuchsansätzen zu erhalten, wurde jeder Ansatz 4fach angelegt. Dies geschah in 48-well-Platten von Costar. Jedes Loch einer solchen Platte stellte eine Kultur dar. Normalerweise enthielt ein Loch 0,2ml Medium, bzw. 130 000 Zellen sowie 10  $\mu\text{l}$   $^{125}\text{I}$  oder  $^3\text{H}$ -Thymidin.

- **Troglitazon** (2,5 mg in 500  $\mu\text{l}$  DMSO gelöst; in jedes Kulturloch wurden jeweils 10  $\mu\text{l}$  Troglitazon in folgenden Konzentrationen gegeben: 50  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 7,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 1  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$ )
- **TSH** (1,3 mU/ml in 740  $\mu\text{l}$  Spinner-Lösung gelöst, 10  $\mu\text{l}$  davon wurden jeweils einer Zellkultur mit 0,2 ml Medium hinzugefügt)
- **Vitamin E** (= alpha-Tocopherol) (500mg in 472,73  $\mu\text{l}$  DMSO lösen; somit waren in 10  $\mu\text{l}$  2000  $\mu\text{Mol}$  enthalten; Lösung war gallertig und löste sich schlecht; Konzentrationen: 50  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ )

Das pulverförmige Troglitazon wurde in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Hierzu wurde zunächst eine Stammlösung hergestellt. Die Endkonzentration des DMSO im Kulturmedium lag bei 0,05 % ( $\text{v/v}$ ). Um einen möglicherweise entstehenden Effekt von DMSO auf die Thyreozyten zu erfassen, wurde bei jedem Versuch eine Kontrolle mit DMSO durchgeführt. Ausserdem wird bei jedem Versuch sowohl eine Kontrolle mit nicht stimulierten als auch mit TSH-stimulierten Thyreozyten durchgeführt.

### **3.5 Herstellung von Kulturen mit Schilddrüsenmalignomzellen**

Außer Schweinethyreozyten wurden auch humane Schilddrüsenmalignomzellen verwendet. Es handelt sich dabei um die kommerziell erhältliche Zelllinie FTC 133, die von einem follikulären Schilddrüsenmalignom stammt. Diese Zelllinie war im Labor etabliert. Die menschlichen malignen Thyreozyten (Stamm FTC-133/94060901) befanden sich in 200 ml-Zellkulturflaschen und wurden mit 20ml Kulturmedium versorgt, welches aus 18 ml DMEM und 10% fetalem Kälberserum und 1% Penicillin/ Streptomycin bestand. Die Zellen wurden bei 37°C inkubiert und alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Die Anzahl der vorausgegangenen Passagen ließ sich für die hier verwendeten Zellen nicht mehr erfassen.

Das Ablösen der adhärennten Thyreozyten vom Kulturflaschenboden erfolgte unter sterilen Bedingungen. Dazu wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und die auf dem Flaschenboden haftenden Zellen mit 10ml auf 37°C vorgewärmter PBS-Lösung gespült. Nach dem Absaugen der PBS-Lösung wurden die Zellen mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung (1:10 in PBS verdünnt) versehen und 3-4 min bei 37°C inkubiert; hierbei lösten sich die Zellen vom Gefäßboden. Die abgelösten Zellen konnten nun abpipettiert werden. Anschließend wurden die Kulturflaschen zweimal mit 5 ml Medium gut nachgespült.

Die abpipettierten Zellen und die durch Nachspülen entfernten Zellen wurden in einem Falconröhrchen gesammelt, dann abzentrifugiert, der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in neuem Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wie unter 3.3 beschrieben.

Die Abbildungen A bis C (Kap. 3.6) zeigen Ausschnitte dieser transformierten Zellen in Kultur.

### 3.6 Inkubation und Kultivation

Die angelegten Zellkulturen wurden im Inkubator bei Lichtabschluss , 5%  $\text{CO}_2$  und einer Temperatur von 37° C inkubiert.

Geerntet wurde 2 h; 16 h; 40 h; 64 h; 88 h nach der Stimulation.

#### Photographische Abbildungen der malignen humanen Thyreozyten

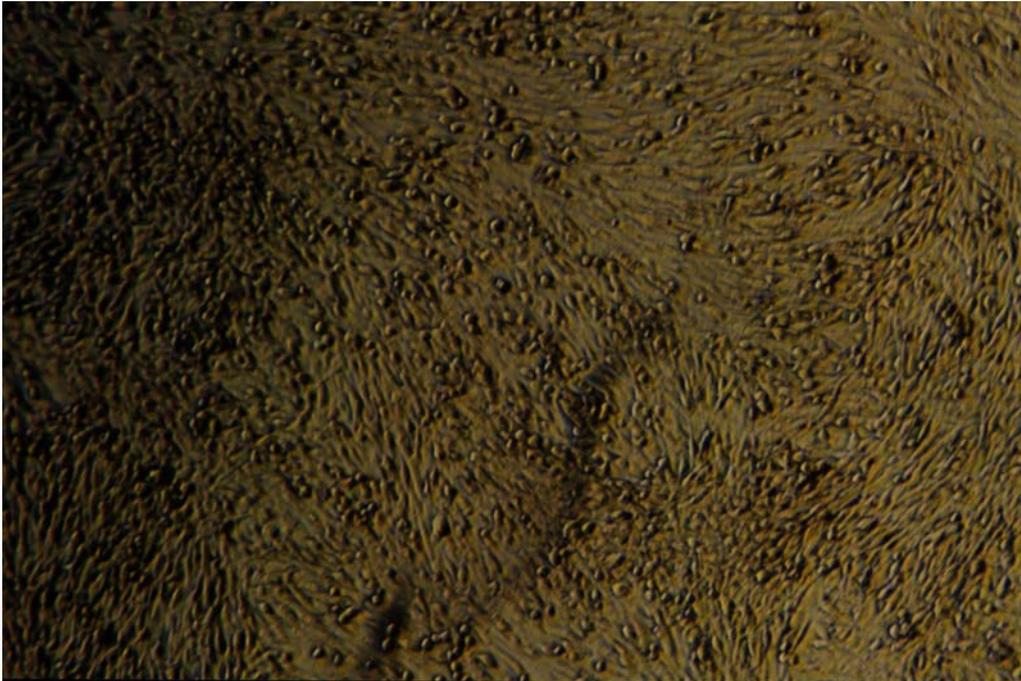


Abb. A

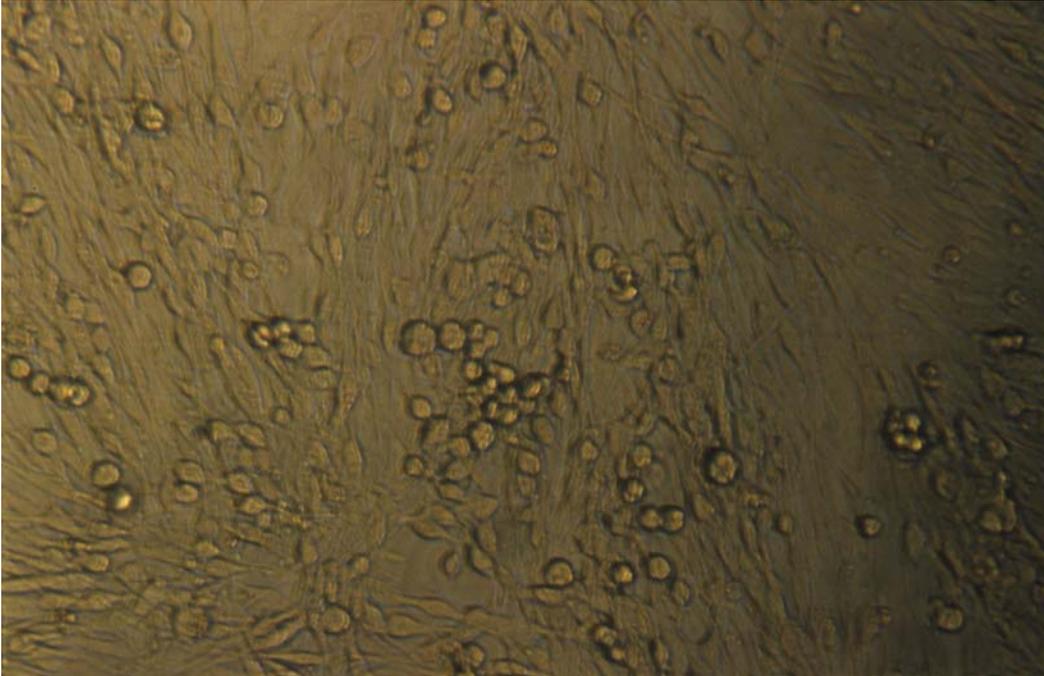


Abb. B

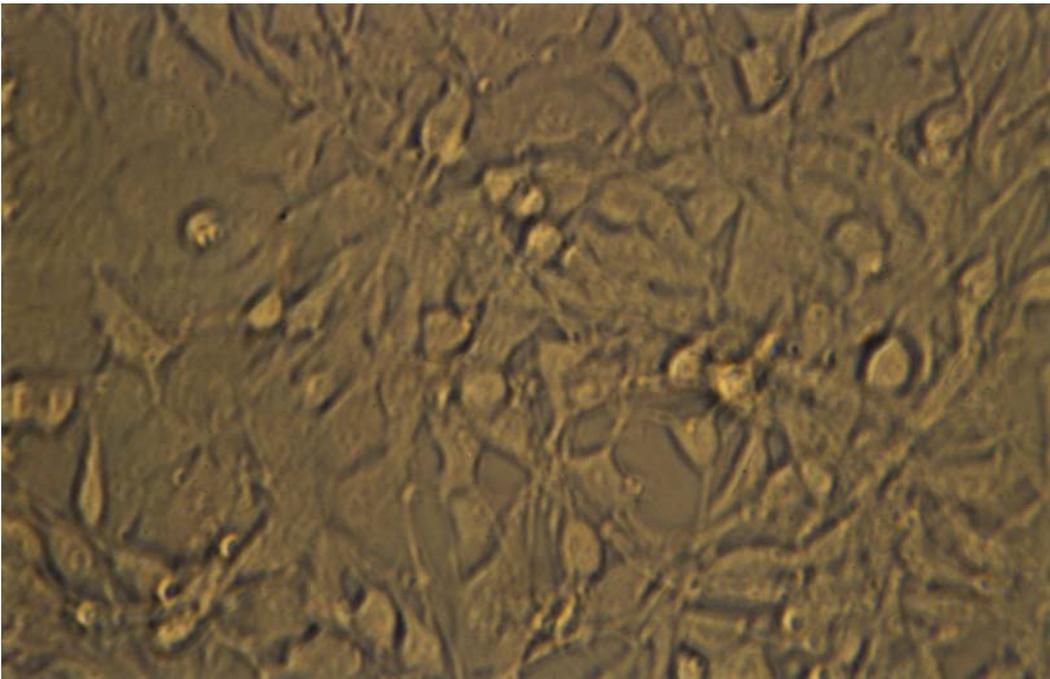


Abb. C

Die Abbildungen A, B und C zeigen die Zelllinie FTC 133. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen wurden mit steigender (100-, 400- und 1000facher) Vergrößerung während der Kultivierungsphase vorgenommen.

### 3.7 Mycoplasmennachweis

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

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

Mycoplasmen können insbesondere Thymidin aufnehmen. Da diese einen Durchmesser von 0,8  $\mu\text{m}$  haben, werden diese von dem Filterpapier (Porengröße: 1,5  $\mu\text{m}$ ) nicht zurückgehalten und konnten somit eigentlich nicht mitgemessen werden.

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

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

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

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

Die Testdauer betrug einen Tag mit einer Inkubation über Nacht.

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

### **3.8 Zellernte**

#### **3.8.1 Messung der $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme**

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

#### **3.8.2 Messung von $^{125}\text{I}$ -Speicherung**

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen ebenfalls mit Hilfe eines Cell-harvesters auf ein Filterpapier gesaugt. Das nun mit Zellen besetzte Filterpapier wurde in ein Reagenzröhrchen gegeben. Im Gamma-Counter wurde die Radioaktivität von  $^{125}\text{I}$  gemessen.

### **3.9 Bestimmung der mRNA von PPAR $\gamma$**

Humane karzinogene Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 wurden in 10 ml DMEM-Medium zusammen mit 500  $\mu\text{l}$  Troglitazon in der Konzentration 0; 0,1; 1; 2,5; 5 und 10  $\mu\text{M}$  30 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Nach dieser Zeit wurde das Medium abgesaugt, die Thyreozyten mit 5 ml PBS gewaschen, welches wiederum abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Thyreozyten zweimal mit je 4 ml Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1mM EDTA-Natrium) in Hanks' gepufferter Salzlösung ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{+}$  für 2,5 min bei 37°C im Inkubator (5%  $\text{CO}_2$ ) vom Boden abgelöst und in ein 2 ml-Eppendorfgefäß gegeben.

Parallel zu diesem Versuch wurde eine Kontrollreihe mit radioaktiv markiertem Iod und Thymidin in einer 48-well-Platte durchgeführt.

Der Versuchsaufbau war hierbei im Bezug auf Medien und Reagenzien mit den übrigen Versuchen identisch.

Nach der Zellernte wurde die mRNA mittels „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden) isoliert.

Es folgte eine photometrische Konzentrationsmessung der RNA (Gerät: Pharmacia Biotech GeneQuant II, 260 nm), damit sämtliche Proben die gleiche Ausgangsmenge an 1 µg mRNA enthielten.

Die mRNA wurde nun durch das „First strand cDNA synthesis Kit for RT-PCR (AMV)“ (Roche Diagnostics, Mannheim) in cDNA umgeschrieben.

Die anschließende Quantifizierung der cDNA erfolgte durch die Realtime-PCR (Gerät: LightCycler; Kit: „LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I“, Roche Diagnostics, Mannheim). Die Primersequenzen hierfür waren: 5'-GCC AAC AGC TTC TCC TTC TC-3' (sense) und 5'-AGA ACA GAT CCA GTG GTT GC-3' (antisense). Es wurde eine interne Standardkurve verwandt.

Ansatz für Realtime-PCR:

- 12,6 µl H<sub>2</sub>O
- 2,4 µl Magnesiumchlorid (4 mM)
- 0,5 µl Up Primer
- 0,5 µl Down Primer
- 2,0 µl Hot start PCR reaction mix (aus LightCycler Kit)

Programm für Realtime-PCR:

1. Denaturierung bei 95°C für 10 min
2. Amplifikation 

bei 95°C für 15 s	}	45 Zyklen
bei 64°C für 10 s		
bei 72°C für 17 s		
3. Schmelzen 

bei 95°C für 5 s
bei 68°C für 10 s
bei 98°C für 0 s
4. Abkühlen bei 40°C für 30 s

### **3.10 Zellaufbereitung und Zellernte für die Apoptoseuntersuchung mittels Facsanalyse nach der Methode von Nicoletti et al. (1991)**

Die Untersuchung erfolgte an der Zelllinie FTC 133. Aus einer Zellsuspension mit 500 000 Zellen pro ml wurden jeweils 100 µl in ein Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät. Während der Aussaat wurden als Stimulanzen das Zellgift Staurosporin (2,5 µM), Troglitazon (10 µM) und 13-cis Retinol (10 µM) hinzugegeben. Nach einer Inkubation über 24 Stunden wurden die Zellen in den Kulturschalen zentrifugiert (5 Minuten; 170 g).

Anschließend wurden die Überstände dekantiert und die in PBS-Puffer resuspendierten Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Nach nochmaligem Zentrifugieren, Dekantieren und Resuspendieren wurden die Zellen in einem hypotonen Puffer lysiert und ihre Zellkerne sofort mit der Durchflusszytometrie analysiert. Der Lysepuffer bestand aus Propidiumiodid (PI) (50 µg/ ml), gelöst in destilliertem Wasser zusammen mit 0,1%igem Natrium-Zitrat und TritonX-100 (0,1%). Die Analyse erfolgte im FACS-Gerät, Modell „FACS Calibur“, Becton-Dickinson, Software: Cellquest. Propidiumiodid, ein Fluoreszenzfarbstoff, lagert sich in die DNA des Zellkerns.

Bei der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) befindet sich im FACS-Gerät die Trägerflüssigkeit in ständigem Fluss. In diese Trägerflüssigkeit wird die Probe in Form einer Suspension eingebracht. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit werden Zellen oder isolierte Zellkerne vereinzelt und in einer fixen Position an Laserlicht vorbeigeführt. Die PI-positiven Zellkerne werden als solche durch Argon-Laserlicht (488 nm) angeregt. Propidiumiodid emittiert wiederum Fluoreszenzlicht (625 nm), welches durch verschiedene Photozellen detektiert werden kann. Zellkerne mit DNA-Fragmentierung (hypodiploider DNA) wurden als apoptotisch betrachtet und konnten gut von Kernen mit normalem (diploidem) DNA-Gehalt abgetrennt werden. Bei primär nekrotischen Zellen kommt es zu keiner DNA-Fragmentierung. Nicht mit der Nicoletti-Methode zu erfassen ist die sekundäre Nekrose, der eine Apoptose vorausgeht.

### 3.11 Statistische Auswertung

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

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

Die Statistik ist im Anhang (Kap. 8.1) aufgeführt. Zusätzlich finden sich dort Abbildungen (Kap. 8.2), in denen die über alle Inkubationszeiten gemessenen Einbauraten von  $^{125}\text{I}$ -Iodid und  $^3\text{H}$ -Thymidin gemittelt wurden. Diese Abbildungen wurden bei der Diskussion berücksichtigt. Zusätzlich zum augenblicklichen Effekt ergibt sich somit auch ein Gesamteindruck vom Wirkungsprofil der eingesetzten Substanz.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1 <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten**

#### **4.1.1 <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol- und Retinolkonzentrationen**

Kultivierte menschliche Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 wurden mit 2,5; 5; 10 µM Troglitazon oder mit 0,1 und 10 µM Tocopherol oder mit 1,3 mU/ml TSH stimuliert. Dem Medium war wahlweise Vitamin A (Retinol) in den Konzentrationen 0; 0,6; 1,8 µM zugesetzt worden. Die Zugabe der stimulierenden Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen, die weder mit Troglitazon noch mit TSH, Tocopherol oder DMSO behandelt wurden, dienten als Kontrollgruppe. Als eine zweite Kontrollgruppe diente DMSO, das Lösungsmittel für Troglitazon. Es wurde in einer Konzentration eingesetzt, wie sie für das Auflösen von Troglitazon (100 µM-Stimulation) verwendet wurde.

Die Iodaaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit TSH, DMSO, Tocopherol und steigenden Troglitazonkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 1, 2 und 3 dargestellt. Die den Abb. 1-6 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben. Iodidaufnahmeraten, die das 1,4fache der Kontrolle überschritten, unterscheiden sich signifikant von dieser.

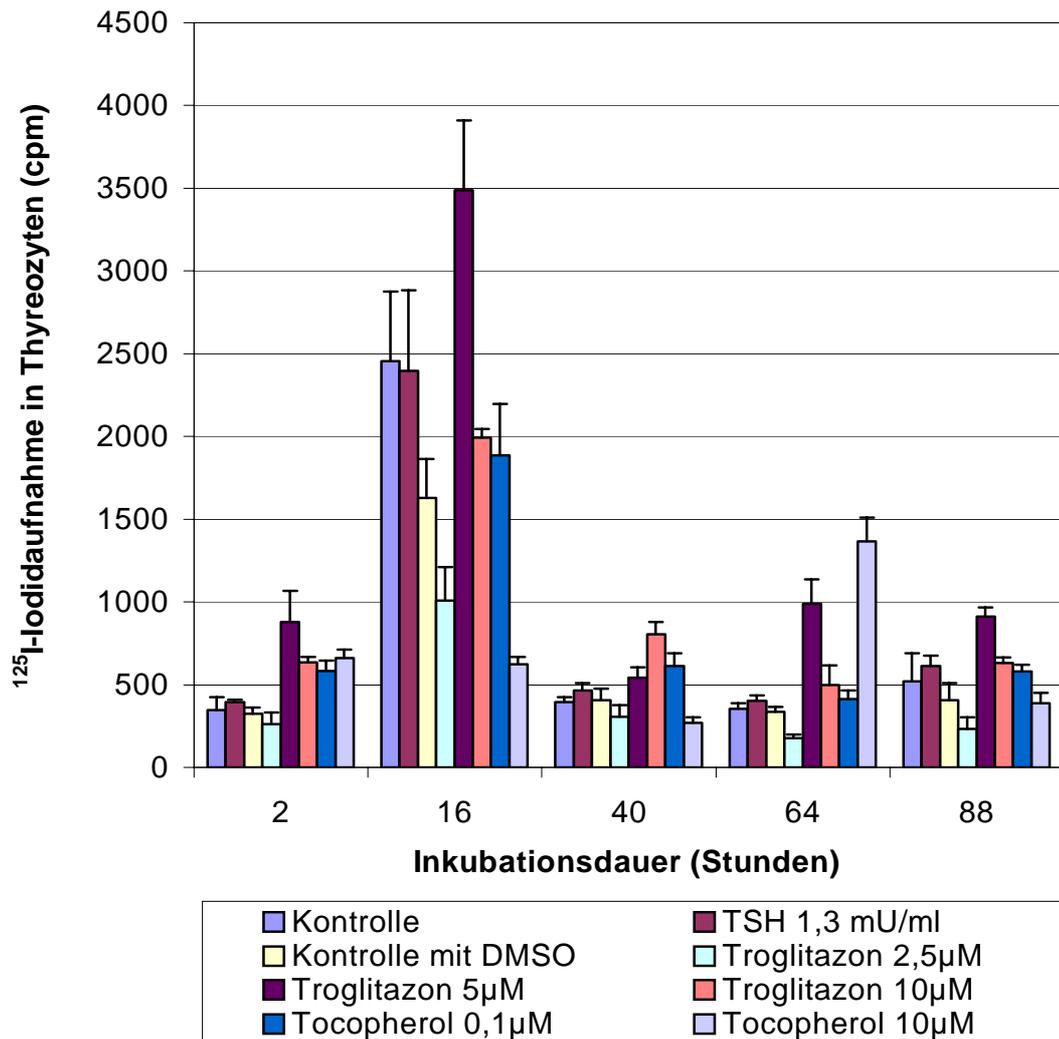
War das Medium frei von Vitamin A, so war nach 2 Stunden Inkubation unter 5 µM Troglitazon ein 2,5facher Anstieg der Radioiodaufnahme gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Troglitazon 10 µM und die beiden Tocopherolkonzentrationen 0,1 und 10 µM hatten dem gegenüber einen etwas geringeren Effekt (1,6-1,8fache Steigerung). Nach 16 Stunden wurden die höchsten Radioiodaufnahmeraten in die Thyreozyten während des Beobachtungszeitraumes erreicht. Nur die Steigerung der Radioiodaufnahme unter 5 µM Troglitazon unterschied sich schwach signifikant von der Kontrolle.

Nach 40 Stunden war unter 10  $\mu\text{M}$  Troglitazon eine signifikante Steigerung der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten zu erkennen. Die Einbaurrate stieg hier immerhin um das 2fache gegenüber der Kontrolle an. Nach 64 Stunden Inkubationsdauer wurden in Bezug auf die Kontrolle die höchsten Einbauraten erzielt. Hierbei bewirkte Tocopherol 10  $\mu\text{M}$ , dass die Thyreozyten 3,8mal so viel radioaktiv markiertes Iod einbauten als die Thyreozyten der Kontrolle. Unter 5  $\mu\text{M}$  Troglitazon betrug die Steigerung der Radioiodaufnahme immerhin noch das 2,7fache der Kontrolle. Nach 88 h sank der Einfluß der Stimulantien; nur noch Troglitazon (5  $\mu\text{M}$ ) war leicht signifikant gegenüber Kontrolle verschieden.

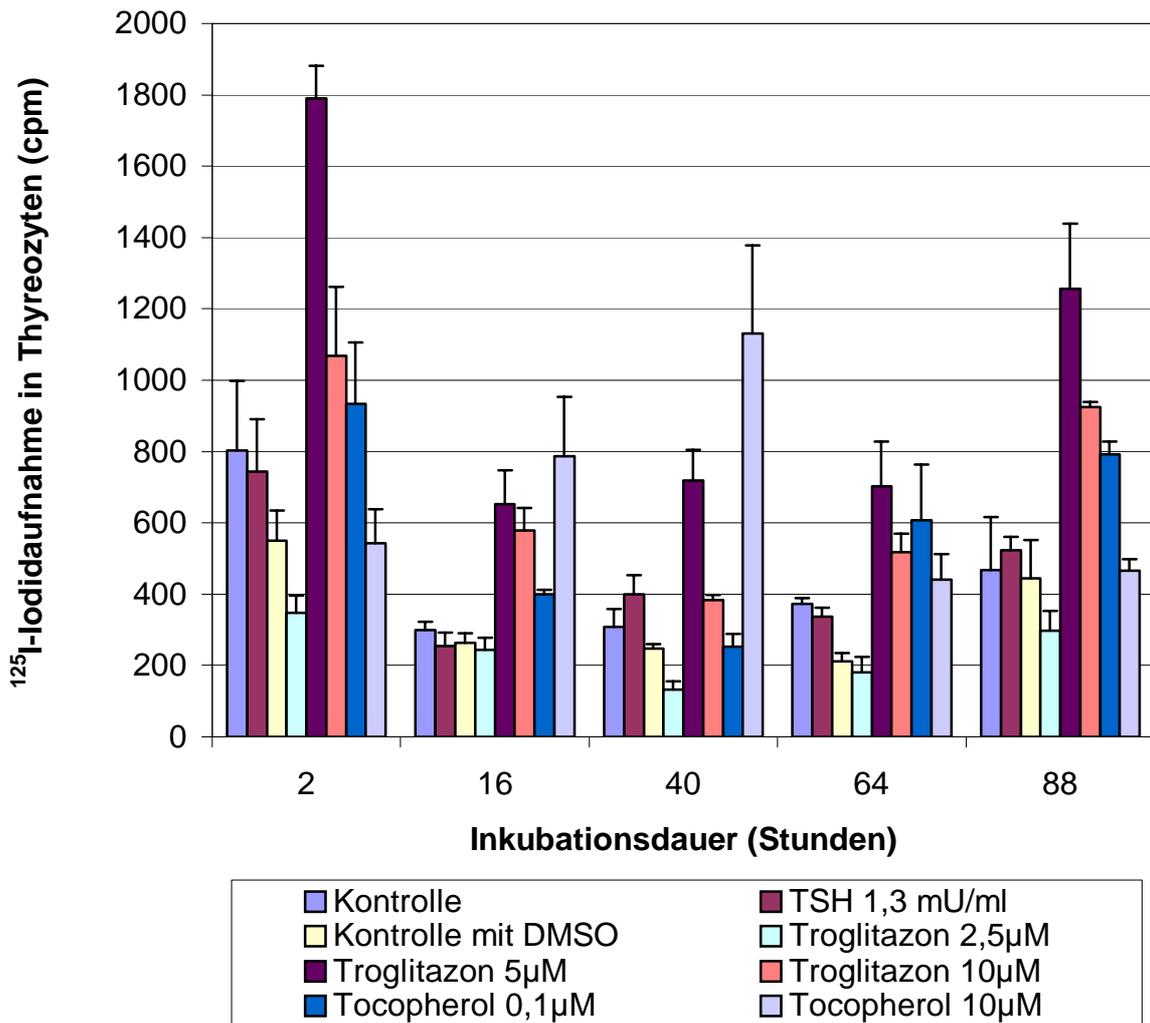
Beträgt die Vitamin A-Konzentration im Medium 0,6  $\mu\text{M}$ , so zeigte sich, dass unter 5  $\mu\text{M}$  Troglitazon bei allen Messzeitpunkten eine signifikante Steigerung der Radioiodinkorporation gegenüber der Kontrolle erreicht wurde. Zahlenmäßig ausgedrückt war sie für die ersten vier Zeitpunkte das 1,8 bis 2,3fache, nach 88 Stunden stieg sie bis zum 2,6-fachen an. Übertroffen wurde 5  $\mu\text{M}$  Troglitazon nur durch 10  $\mu\text{M}$  Tocopherol, welches allerdings nur nach 16 und 40 Stunden Inkubationsdauer einen signifikanten Anstieg der Radioiodinkorporation erzielte. Die Iodidaufnahmeraten waren um das 2,6 bzw 3,6fache gegenüber der Kontrolle erhöht.

Auch unter einer Vitamin A-Konzentration von 1,8 $\mu\text{M}$  wurde wiederum unter Stimulation mit 5  $\mu\text{M}$  Troglitazon bei allen Messzeiten eine signifikante Iodidaufnahme in die menschlichen Thyreozyten erreicht. Die höchste Steigerung fand sich auch hier nach 88 Stunden mit einem 2,8fachen Anstieg gegenüber der Kontrolle. Noch ausgeprägter war allerdings die Steigerung der Iodidaufnahme unter Tocopherol 10  $\mu\text{M}$ , welches nach 64 Stunden Inkubation eine signifikante Iodidaufnahme erzielte, der das 5,4fache gegenüber dem Kontrollwert betrug. Troglitazon 10  $\mu\text{M}$  und Tocopherol 0,1  $\mu\text{M}$  bewirkten ab 40 Stunden Messzeit leicht signifikant erhöhte Iodidaufnahmeraten.

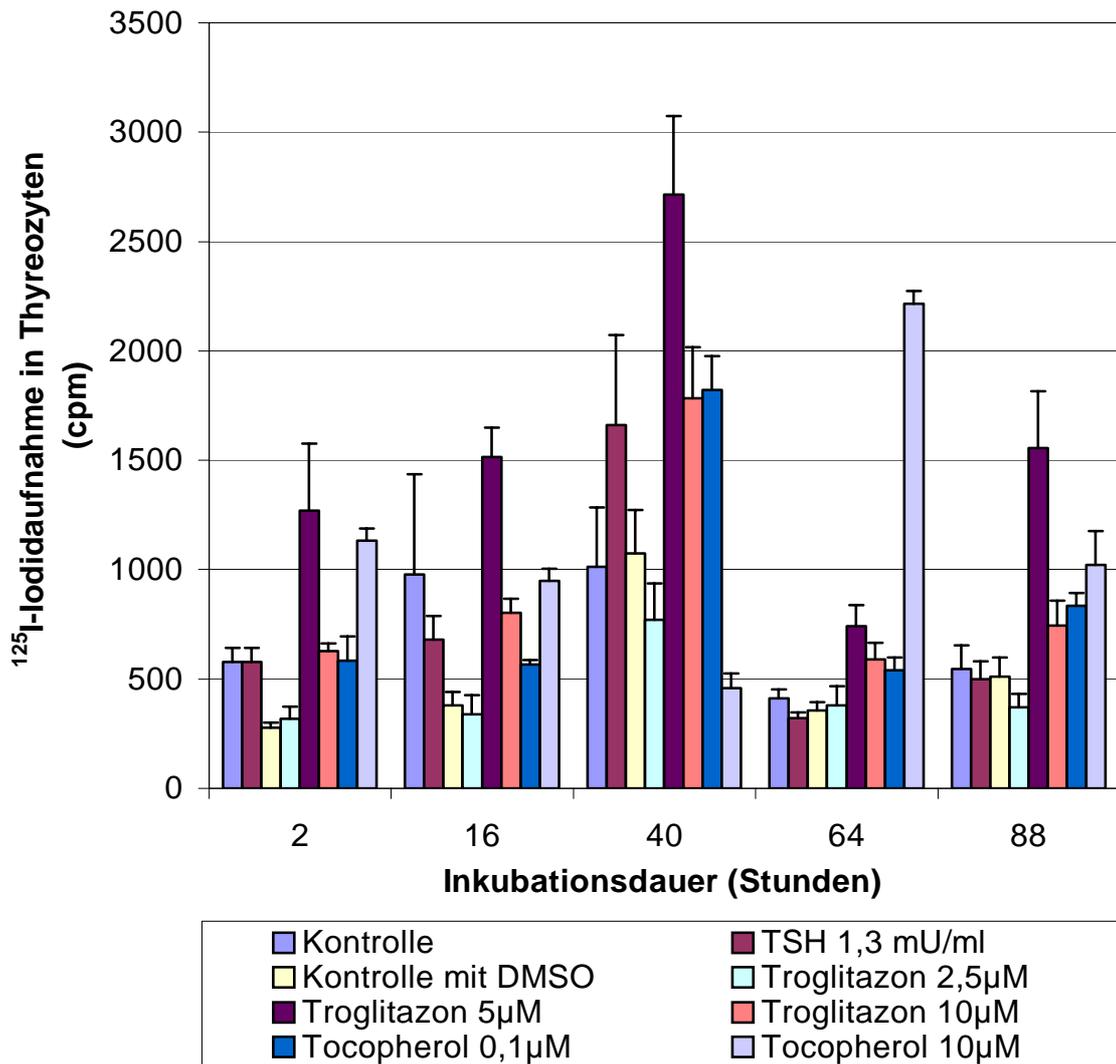
Insgesamt betrachtet zeigte sich hinsichtlich der über die gesamte Inkubationszeit hinweg gemittelten Radioiodaufnahmewerte, dass 5  $\mu\text{M}$  Troglitazon die beste Radioiodaufnahme hervorrief und Tocopherol nur einen mäßigen Effekt bewirkte (s. Mittelwerte Abb. 1a-3a).



**Abb.1** Einfluss von Troglitazon (2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (0,1; 10  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt kein Vitamin A. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.1 im Anhang.)



**Abb.2** Einfluss von Troglitazon (2,5; 5; 10 µM), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (0,1; 10 µM) auf die <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (0,6 µM). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe: 4 kBq <sup>125</sup>I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.2 im Anhang.)



**Abb.3** Einfluss von Troglitazon (2,5; 5; 10 µM), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (0,1; 10 µM) auf die <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (1,8 µM). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe: 4 kBq <sup>125</sup>I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.3 im Anhang.)

#### **4.1.2 <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen**

Kultivierte Schweinethyreozyten der Zelllinie FTC 133 wurden mit 0,1; 1; 2,5; 10 µM Thiazolidindion stimuliert. Gleichzeitig wurde Vitamin A (Retinol) in den Konzentrationen 0; 0,6; 1,8 µM verabreicht. Die Zugabe der Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen, die nicht mit Thiazolidindion versehen wurden, dienten als Kontrollgruppe.

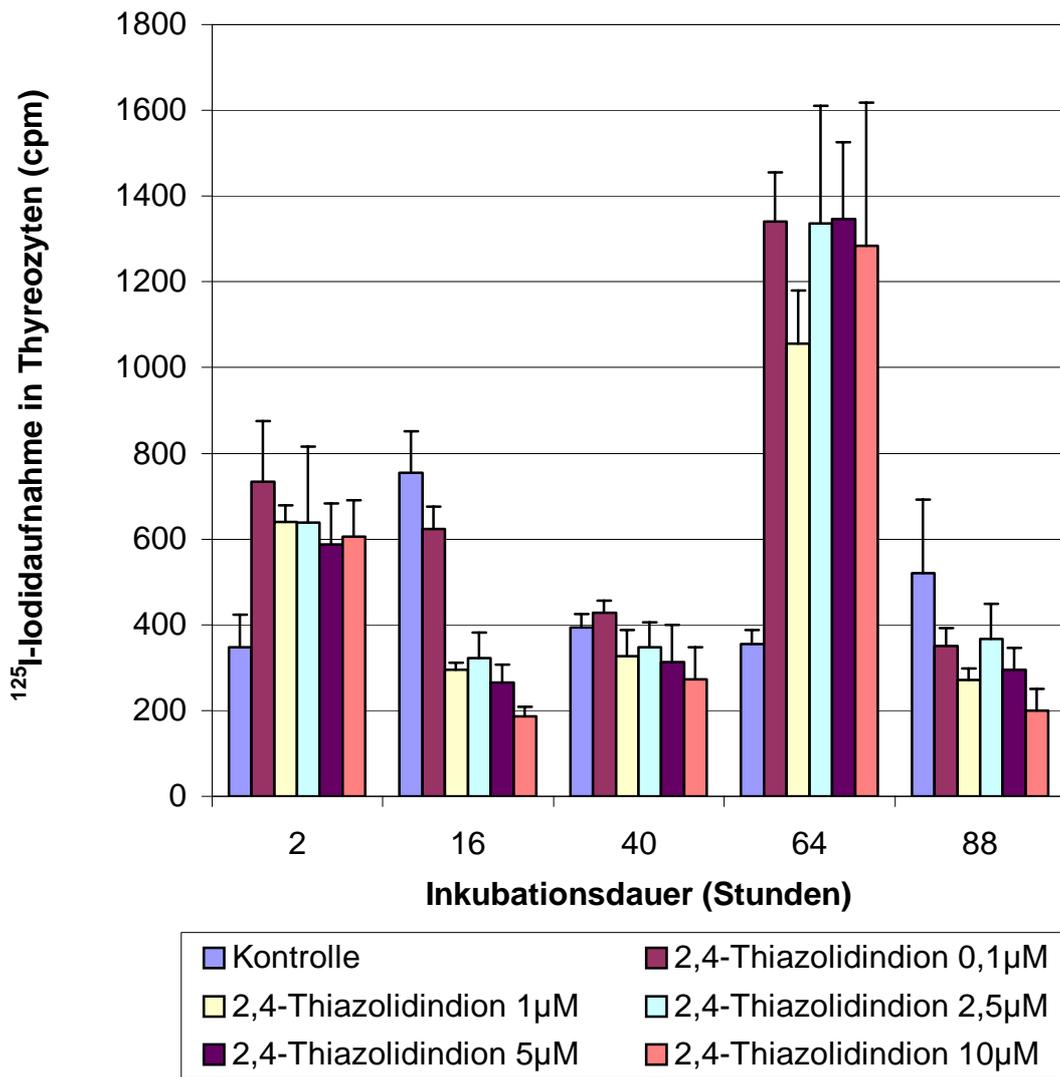
Die Iodaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jener Gruppe verglichen, die mit steigenden Thiazolidindionkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 4, 5 und 6 dargestellt. Die den Abb. 1-6 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

War das Medium Vitamin A frei, so beobachtete man eine Erhöhung der Einbauraten nur nach 2 und nach 64 Stunden Inkubation. Hierbei zeigten alle eingesetzten 2,4-Thiazolidindion-Konzentrationen einen signifikanten Effekt auf die Radioiodaufnahme. Nach 2 Stunden betrug der Anstieg das 1,8-2,1fache, nach 64 Stunden bei allen Konzentrationen das 3 bis 3,7fache gegenüber der Kontrolle.

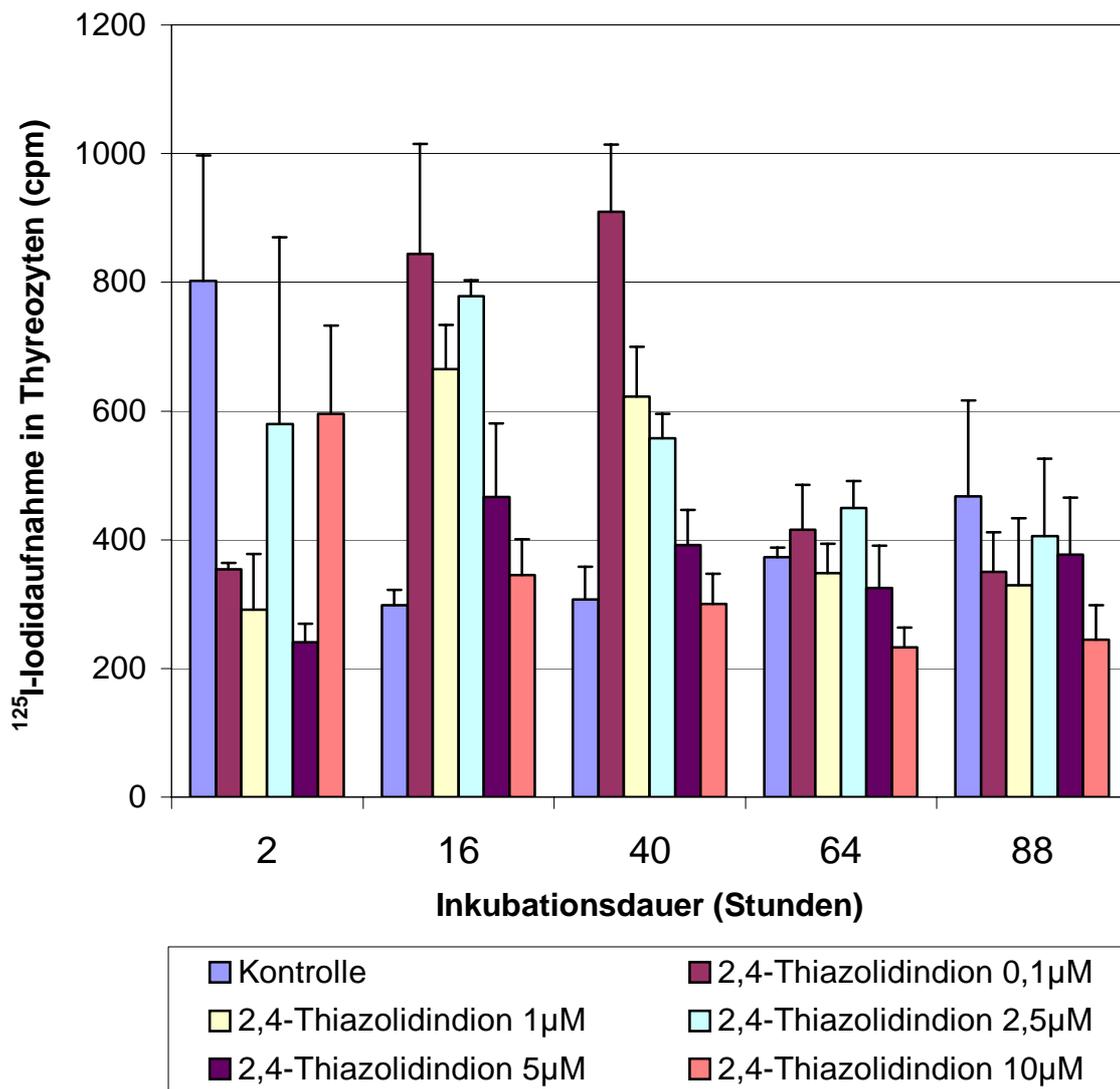
Unter Vitamin A in der Konzentration 0,6 µM bewirkte 2,4-Thiazolidindion (0,1- 5 µM) nach 16 h eine signifikant gesteigerte Radioiodaufnahme. Nach 40 h wurde eine solche unter 0,1- 2,5 µM Thiazolidindion erreicht.

Gab man dem Medium Vitamin in einer Konzentration von 1,8 µM hinzu, wirkte sich dies steigernd auf die Iodidaufnahme in die Thyreozyten aus. Sichtbar wurde dies vor allem nach 2, 64 und 88 Stunden. Die höchsten Einbauraten unter 2,4-Thiazolidindion wurden nach 64 Stunden unter der Konzentration von 1 µM erreicht. Die Radioiodaufnahme war hier 3,5mal höher als der Wert der Kontrolle.

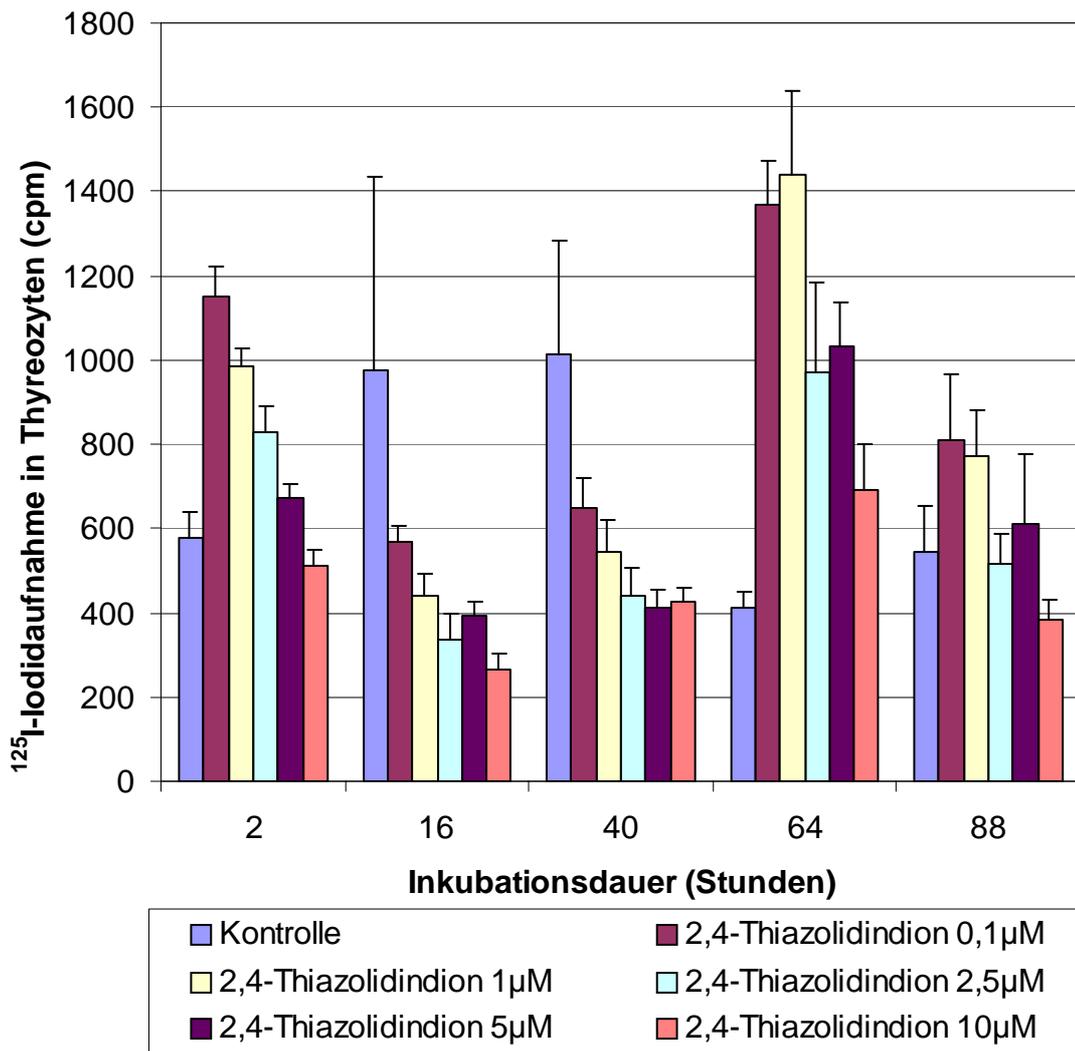
Insgesamt betrachtet zeigte sich hinsichtlich der über die gesamte Inkubationszeit hinweg gemittelten Radioiodaufnahmewerte, dass 2,4-Thiazolidindion keine gesteigerte Radioiodaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten hervorrief (s. Mittelwerte Abb. 4a-6a).



**Abb.4** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt kein Vitamin A. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe : 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.4 im Anhang.)



**Abb.5** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µM) auf die <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (0,6 µM). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe : 4 kBq <sup>125</sup>I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.5 im Anhang.)



**Abb.6** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (1,8  $\mu\text{M}$ ). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe : 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.6 im Anhang.)

## **4.2 Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten**

### **4.2.1 <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol- und Vitamin A-Konzentrationen**

Karzinogene humane Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 wurden in diesem Versuch mit 0,1; 1; 2,5; 10 µM Troglitazon oder mit 0,1; 1; 2,5; 10 µM Tocopherol oder mit 1,3 mU/ ml TSH stimuliert und darunter die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme gemessen. Die stimulierenden Agentien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Gleichzeitig wurde dem Medium Retinol (Vitamin A) in den Konzentrationen 0; 0,6 und 1,8 µM wahlweise hinzugegeben. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellkulturen ohne spezielle Zusätze. Als weitere Kontrolle diente DMSO, das als Lösungsmittel für Troglitazon verwendet wurde. Die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2; 16; 40; 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit Troglitazon oder Tocopherol stimuliert wurden. Die Ergebnisse werden in Tabelle 7, 8 und 9 dargestellt. Die den Abb. 7-12 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrolle besteht, wenn die Einbauraten weniger als das 0,7fache oder mindestens das 1,4fache der Kontrolle erreichten.

Da Troglitazon und Tocopherol in gleichen molaren Konzentrationen eingesetzt wurden, konnten diese Agenzien nicht nur mit der Kontrolle, sondern auch untereinander verglichen werden.

Ohne Zusatz von Vitamin A zum Medium (Abb. 7) kam es nach einer Stimulationszeit von 2 Stunden unter Troglitazon (1 µM) zu einer signifikant gesteigerten Thymidinaufnahme (das 2fache gegenüber der Kontrolle) in die Thyreozyten. Tocopherol (10 µM) erzielte nach dieser Zeit eine Steigerung der Thymidinaufnahme in die Schilddrüsenzellen um das 2,5fache der Kontrolle. Zu einer erneuten gesteigerten Thymidinaufnahme kam es erst wieder nach einer

Stimulationszeit von 88 Stunden. Troglitazon (0,1 und 1  $\mu\text{M}$ ) bewirkte dann den 1,8fachen Einbau von Thymidin; Tocopherol (0,1; 1 und 10  $\mu\text{M}$ ) hingegen nur jeweils einen 1,5fachen Einbau bezogen auf die Kontrolle.

Das Thyreoidea stimulierende Hormon (TSH) und DMSO, das Lösungsmittel für Troglitazon, führten ebenfalls nur nach 2 und nach 88 Stunden Stimulationszeit zu einer signifikanten Thymidinaufnahme. Beide Agenzien blieben mit dem 1,8fachen Einbau an Thymidin jedoch unterhalb der Werte, die durch Troglitazon erreicht wurden. Besonders niedrige Thymidinaufnahmewerte fanden sich sowohl unter 2,5  $\mu\text{M}$  Troglitazon, als auch unter 2,5  $\mu\text{M}$  Tocopherol (das 0,4fache gegenüber der Kontrolle).

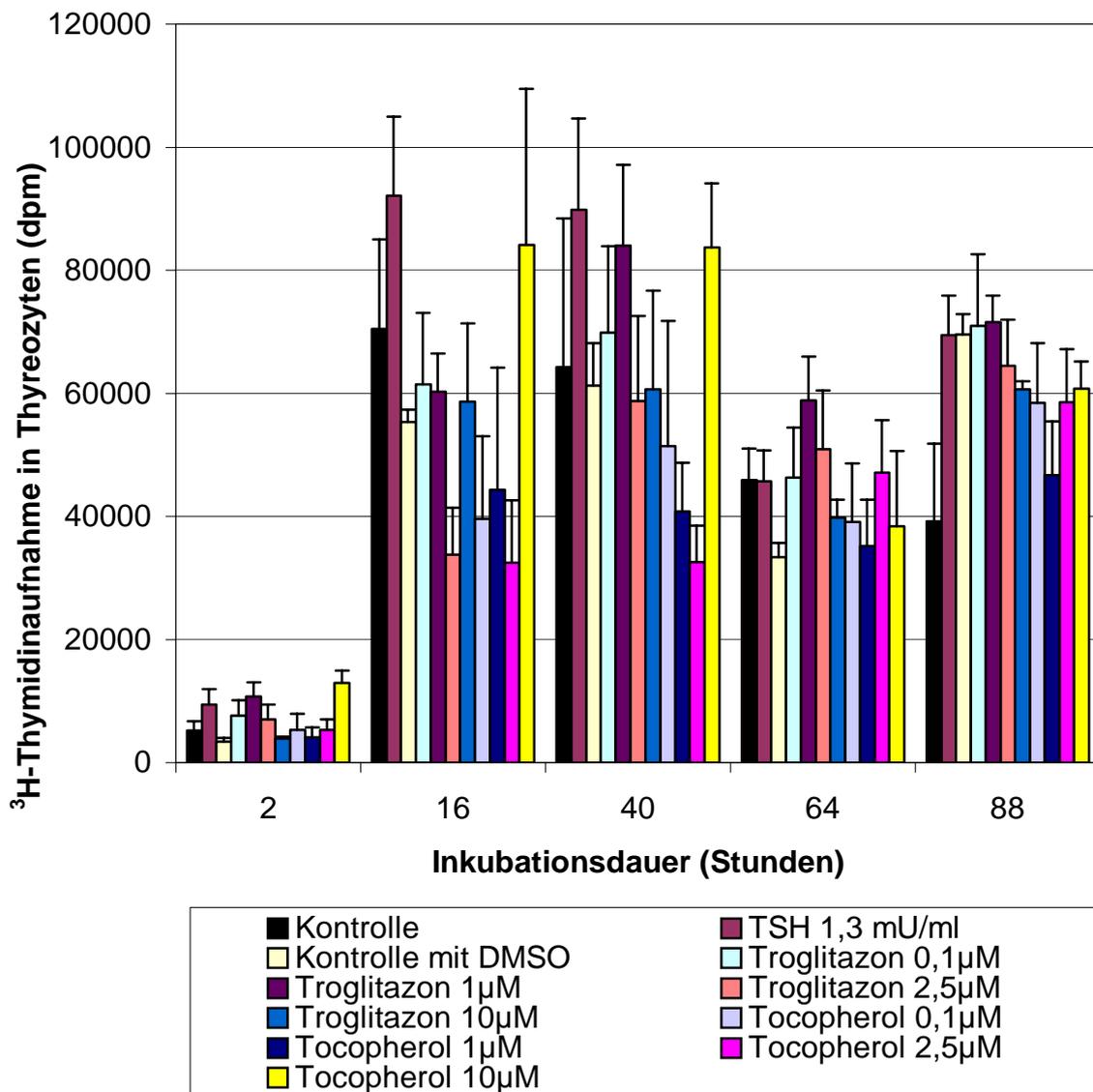
Wurde die Vitamin A-Konzentration im Medium auf 0,6  $\mu\text{M}$  erhöht, so verhielt sich die Thymidinaufnahme folgendermaßen: 1,3 mU/ ml TSH steigerte den Einbau von Thymidin nach 2 und nach 16 Stunden um das 1,8fache, DMSO führte zu keiner Zeit zu einer signifikanten Veränderung gegenüber der Kontrolle. Troglitazon erhöhte in verschiedenen Konzentrationsbereichen die Thymidinaufnahme in die Schilddrüsenzellen sowohl nach 2 als auch nach 16, 64 und 88 Stunden Stimulationszeit, wobei die höchsten Einbauraten nach 2 und 16 Stunden unter 1  $\mu\text{M}$  Troglitazon auftraten (Anstieg bis zum 1,9fachen).

Betrachtete man nun Tocopherol, so zeigte sich, dass es in den Konzentrationen 0,1 und 1  $\mu\text{M}$  die Thymidinaufnahme im Vergleich zur Kontrolle nicht steigerte. Erst unter den Konzentrationen 2,5 und 10  $\mu\text{M}$  kam es zu einer signifikant gesteigerten Thymidinaufnahme sowohl nach 2, nach 16 als auch nach 88 Stunden. Dieser war jedoch mit Maximalwerten bis zum 1,6fachen der Kontrolle geringer als die Thymidinaufnahme unter Troglitazon.

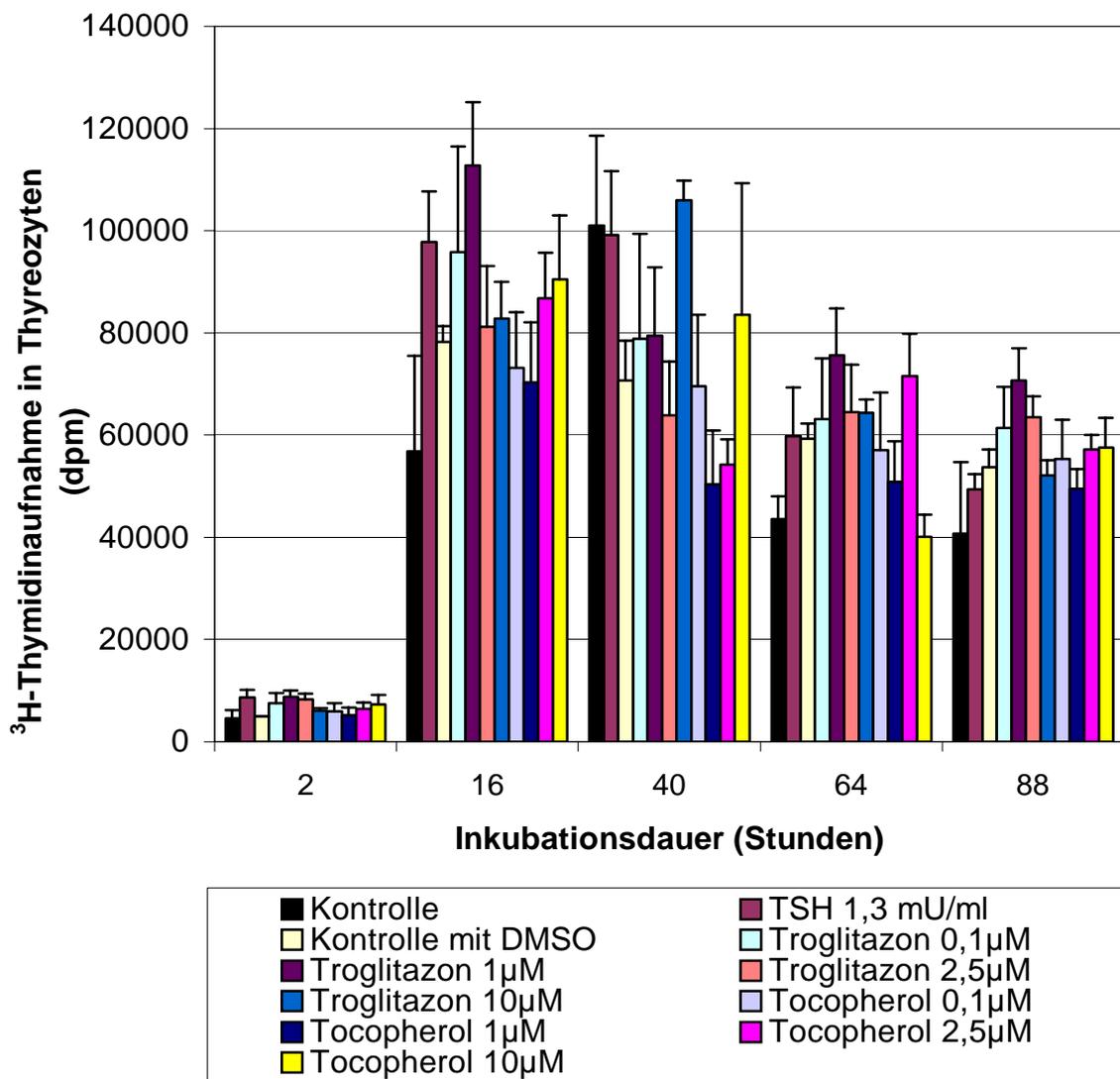
Wie Abbildung 9 zeigt, konnte unter 1,8  $\mu\text{M}$  Vitamin A zu den Messzeiten 2, 16 und 40 Stunden kein bemerkenswerter additiver Anstieg der Thymidinaufnahme nachgewiesen werden. Erst nach 88 Stunden Stimulation erhöhten alle Stimulantien die Thymidinaufnahme in die malignen humanen Thyreozyten. Sowohl 1 und 2,5  $\mu\text{M}$  Troglitazon als auch 2,5  $\mu\text{M}$  Tocopherol führten zu einem etwa gleich starken Anstieg des Thymidins um das jeweils 1,9fache. Signifikant

verminderte Einbauraten (0,4faches zur Kontrolle) ergab sich unter Stimulation mit 1  $\mu$ M Tocopherol.

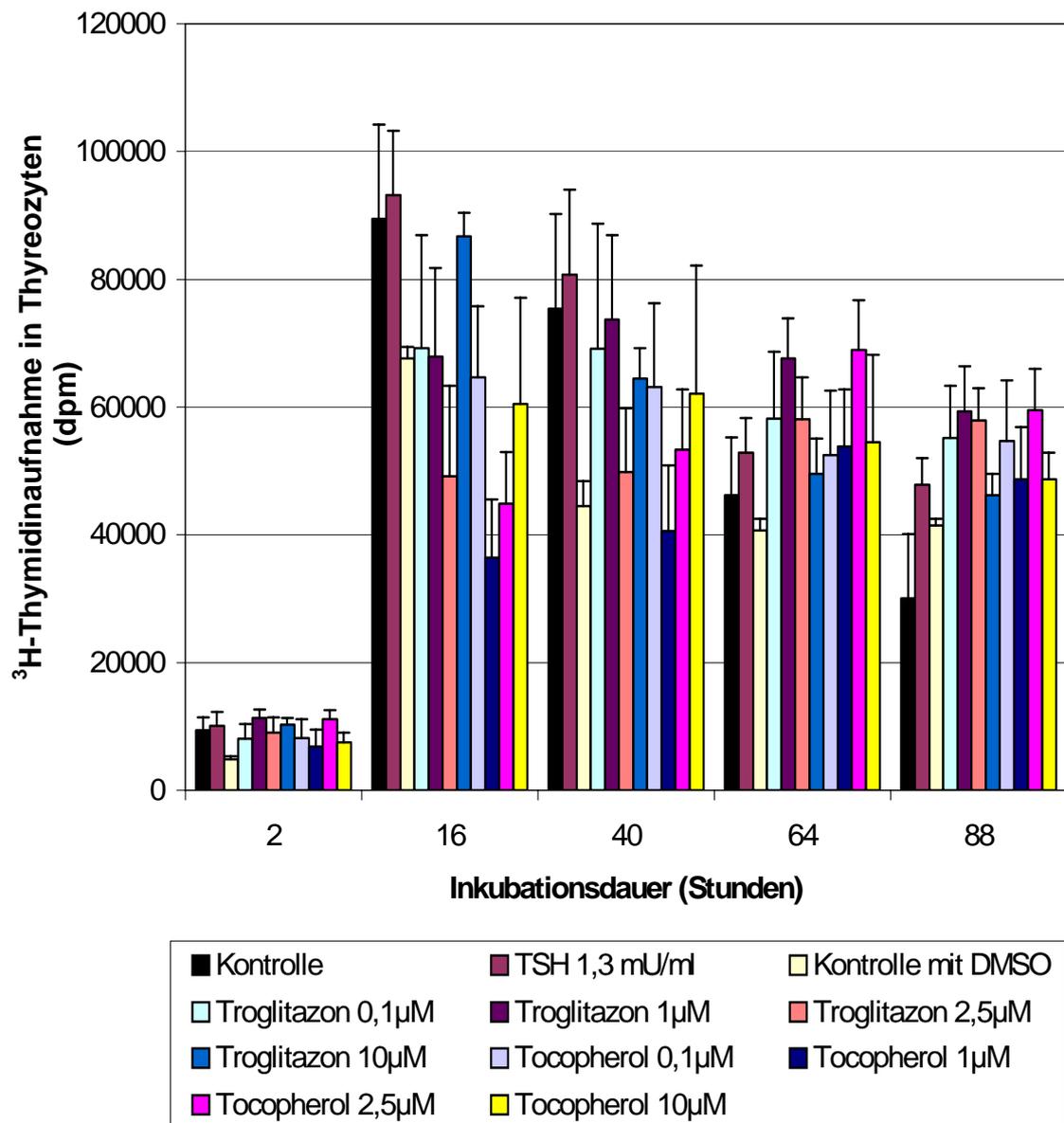
Zusammenfassend konnte festgehalten werden, dass über die gesamte Inkubationsdauer hinweg Troglitazon einen stärkeren Effekt auf die Thymidinaufnahme erzielte als Tocopherol (s. Mittelwerte Abb. 7a-9a).



**Abb.7** Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 2,5; 10 μM), TSH (1,3mU/ ml), Kontrolle mit DMSO, sowie Tocopherol (0,1; 1; 2,5; 10 μM) auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Das Medium war Vitamin A-frei. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe : 12 kBq  $^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.7 im Anhang.)



**Abb.8** Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 2,5; 10 µM), TSH (1,3mU/ml), Kontrolle mit DMSO, sowie Tocopherol (0,1; 1; 2,5; 10 µM) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Das Medium enthielt Vitamin A (0,6 µM). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe : 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.8 im Anhang.)



**Abb.9** Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 2,5; 10 µM), TSH (1,3mU/ml), Kontrolle mit DMSO, sowie Tocopherol (0,1; 1; 2,5; 10 µM) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Das Medium enthielt Vitamin A (1,8 µM). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe : 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.9 im Anhang.)

#### **4.2.2 <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen**

In einer weiteren Versuchsreihe wurden humane Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 mit jeweils 0,1; 1; 2,5; 5; oder 10 µM 2,4-Thiazolidindion stimuliert. Die Vitamin A (Retinol)-Konzentration im Medium variierte zwischen 0; 0,6 und 1,8 µM. Die Zugabe der stimulierenden Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen, denen kein Thiazolidindion zugefügt wurde, dienten als Kontrollgruppe.

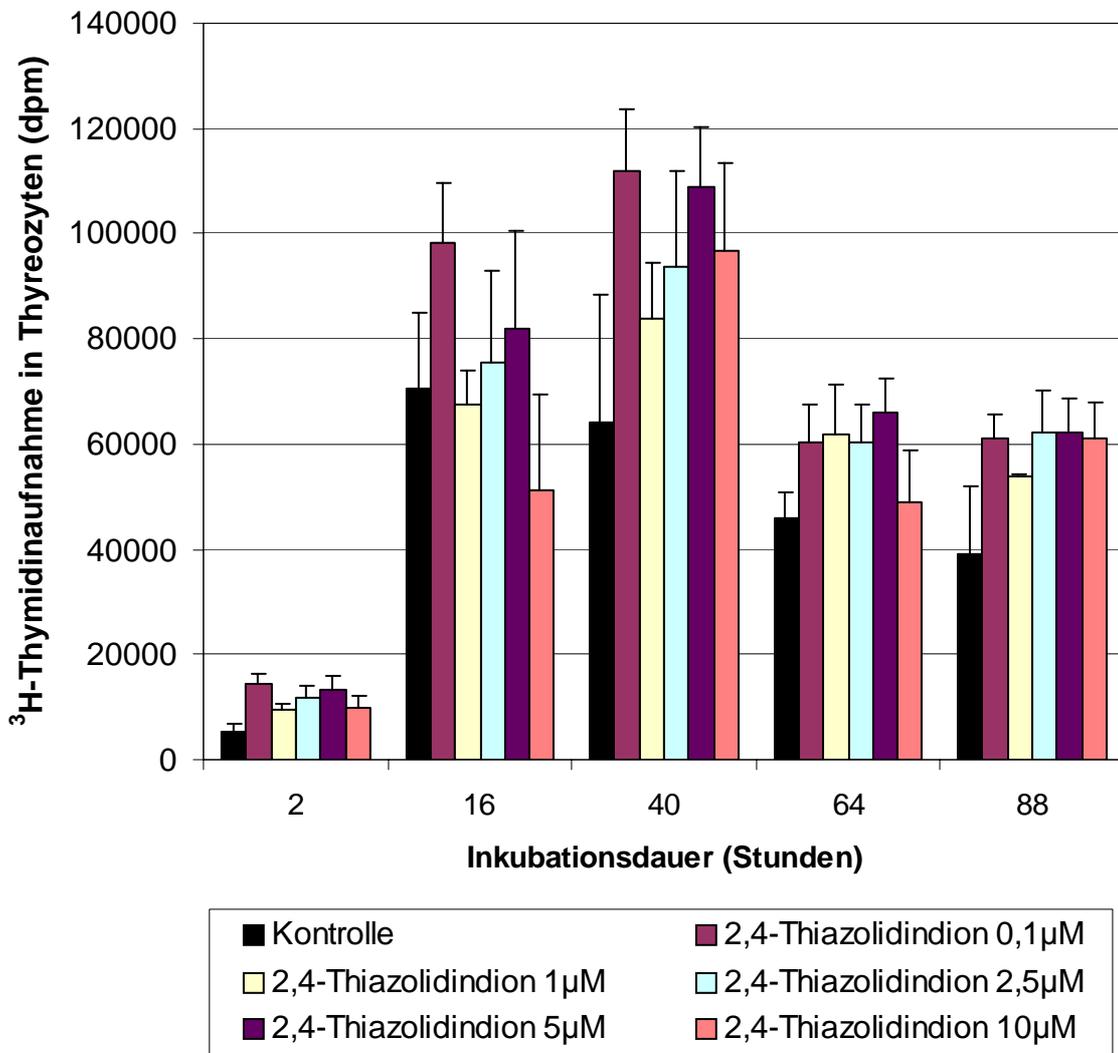
Die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Tritiuminkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jener Gruppe verglichen, die mit steigenden Thiazolidindionkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 10, 11 und 12 dargestellt. Die den Abb. 7-12 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

Im Vitamin A-freien Medium (Abb. 10) führte 2,4-Thiazolidindion nach 2, 40 und 88 Stunden in allen Konzentrationen zu einem signifikanten Einbau von Thymidin in die humanen Thyreozyten. Nach 2 Stunden erhöhte sich die Inkorporation unter 0,1 µM Thiazolidindion um das 2,7fache.

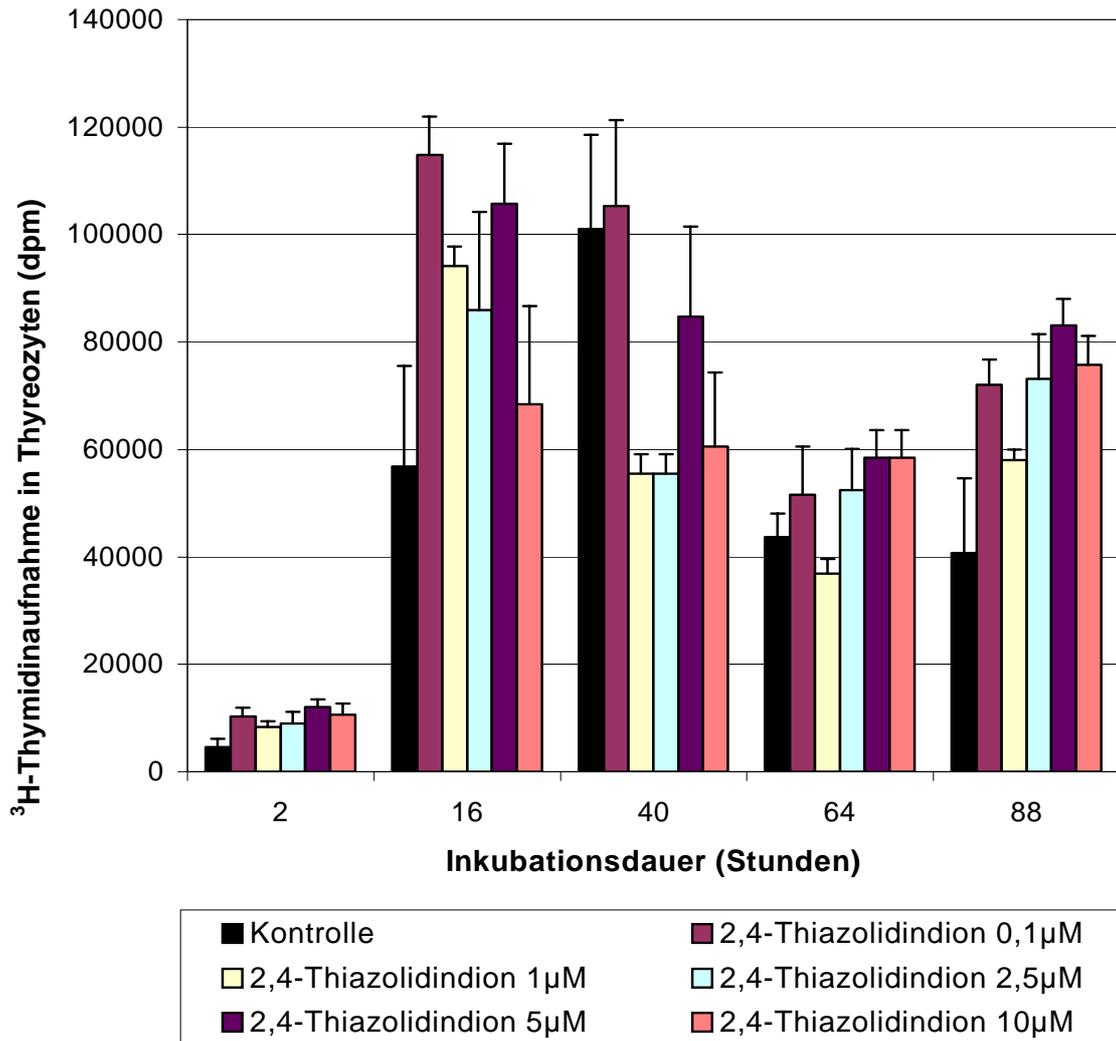
Durch die Anhebung der Vitamin A-Konzentration von 0 auf 0,6 µM (Abb. 11) änderte sich das Ausmaß der Thymidininkorporation nicht wesentlich. Jetzt kam es auch nach 16 Stunden Stimulation zu einer signifikant verstärkten Thymidinaufnahme in die Zellen.

Durch eine weitere Anhebung der Vitamin A-Konzentration im Medium auf 1,8 µM nahmen die Thymidinaufnahmeraten stark ab. Nur nach 88 Stunden wurden noch gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigerte Thymidinaufnahmeraten gemessen. Die niedrigste Thymidinaufnahmerate fand sich unter Einfluss von 10 µM 2,4-Thiazolidindion statt; es wurde nur das 0,3fache der Thymidinaufnahme bei der Kontrolle gemessen.

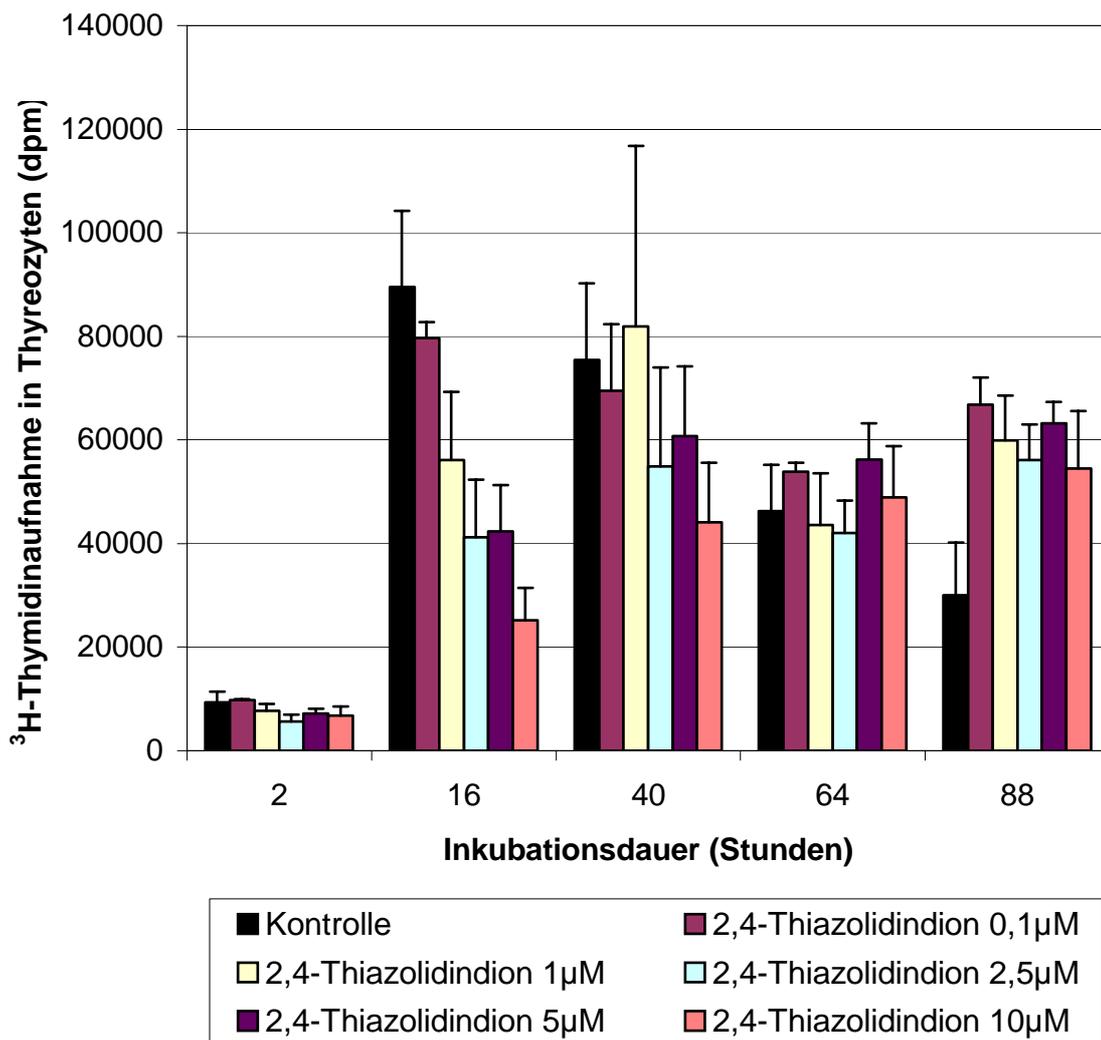
Im Wirkungsprofil über die gesamte Inkubationszeit hinweg zeigte 2,4-Thiazolidindion einen stärker ausgeprägten Effekt auf die Thymidinaufnahme als Troglitazon oder Tocopherol (s. Mittelwerte Abb. 10a-12a).



**Abb.10** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µM) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Das Medium war ohne Vitamin A. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe: 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.10 im Anhang.)



**Abb.11** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µM) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Das Medium enthielt Vitamin A (0,6 µM). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe: 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.11 im Anhang.)



**Abb.12** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µM) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane Thyreozyten (FTC 133). Das Medium enthielt Vitamin A (1,8 µM). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe: 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.12 im Anhang.)

### **4.3 Iodidaufnahme in kultivierte gesunde Schweinethyreozyten**

#### **4.3.1 <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol und Retinolkonzentrationen**

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 0,1; 1; 5 und 10 µM Troglitazon oder mit 1; 2,5 und 5 µM Tocopherol oder mit 1,3 mU/ ml TSH oder mit DMSO stimuliert. Gleichzeitig wurde dem Medium Vitamin A (Retinol) in den Konzentrationen 0; 0,6 und 1,8 µM wahlweise zugesetzt. Die Zugabe der stimulierenden Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen, die weder mit Troglitazon noch mit Tocopherol, TSH oder DMSO versehen wurden, dienten als Kontrollgruppe.

Die Iodaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit TSH, DMSO, Tocopherol oder steigenden Troglitazonkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 13,14 und 15 dargestellt. Die den Abb. 13-18 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

In Vitamin A-freiem Medium (Abb. 13) fand sich weder nach 2, 16, 40, noch nach 64 Stunden Inkubation eine signifikante Steigerung der Iodidaufnahme in die Thyreozyten. Erst nach einer Inkubationsdauer von 88 Stunden kam es zu einer signifikanten Iodidaufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Hierbei lagen außer bei der DMSO-Zugabe die Einbauraten unter allen eingesetzten Troglitazon- und Tocopherolkonzentrationen zwischen dem 1,4-1,7fachen der Kontrolle. TSH (1,3 mU/ ml) erzielte hierbei die höchste Einbaurate (das 1,7fache der Kontrolle).

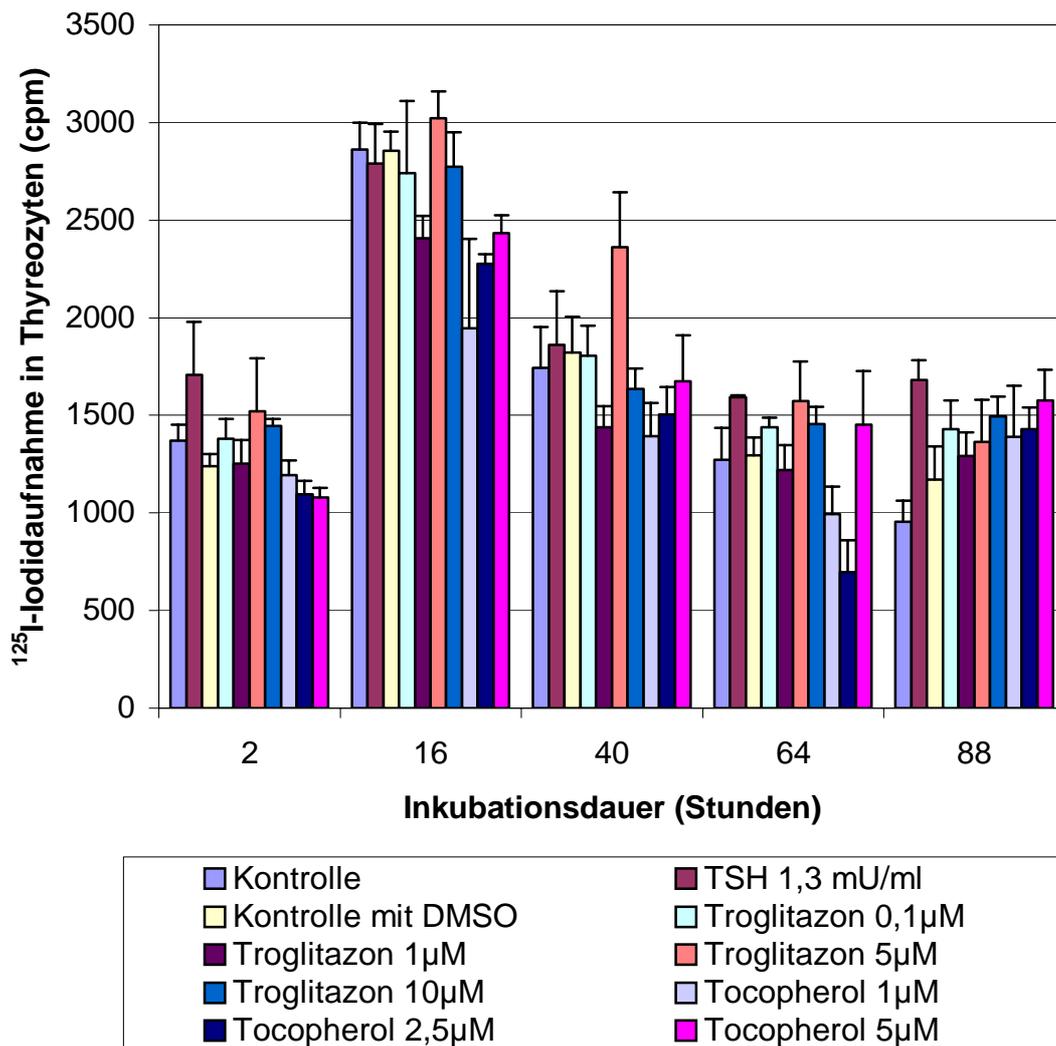
Betrug die Vitamin A-Konzentration im Medium 0,6 µM (Abb. 14), so bewirkte nach 2 Stunden Inkubation Troglitazon in den Konzentrationen 5 µM und 10 µM einen Anstieg der Radioiodinkorporation um das 1,9 bzw 1,7fache gegenüber den Kontrollwerten. Tocopherol erbrachte nach 2 Stunden unter den

Konzentrationen 2,5 und 5  $\mu\text{M}$  nur eine leichte Steigerung der Iodidaufnahme (das 1,4fache zur Kontrolle) in die Schweinethyreozyten.

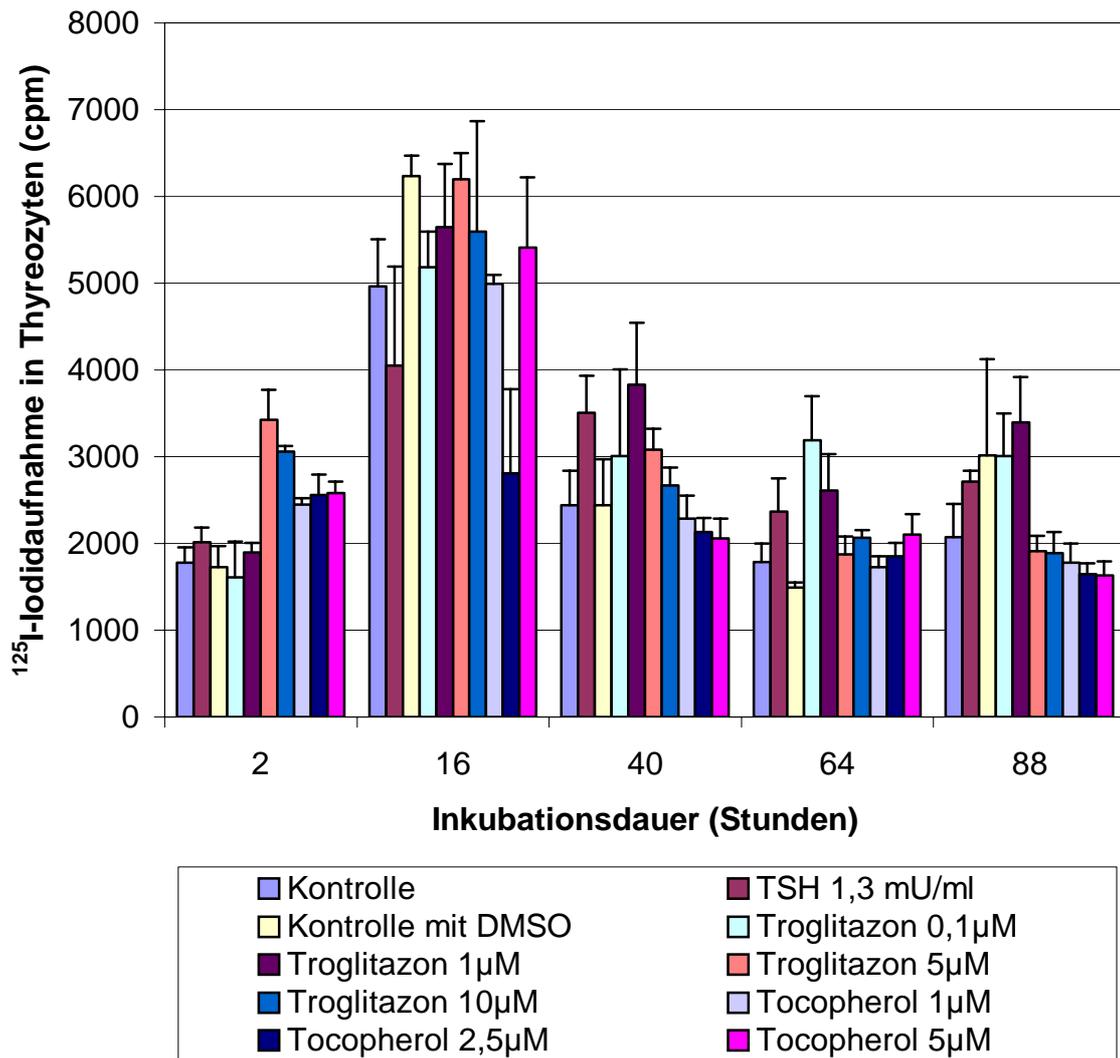
Nach 16 Stunden kam es unter keiner der eingesetzten Substanzen zu einer gesteigerten Iodidaufnahme gegenüber der Kontrolle. Nach 40 Stunden war die Iodidaufnahme nur unter TSH und 1  $\mu\text{M}$  Troglitazon gegenüber der Kontrolle signifikant gesteigert. Die Steigerungsraten betragen das 1,4- bzw 1,5fache. Nach 64 Stunden war die Iodidaufnahme unter 1  $\mu\text{M}$  Troglitazon weiterhin signifikant gesteigert, wurde jedoch durch Troglitazon 0,1  $\mu\text{M}$ , welches eine Steigerung der Iodidaufnahme um das 1,7fache bewirkte, übertroffen. Nach 88 Stunden Inkubation betrug die Iodidaufnahme unter DMSO und 0,1 bzw. 1  $\mu\text{M}$  Troglitazon das 1,4-1,6fache der in den Kontrollkulturen erreichten Iodidaufnahme.

Betrachtet man die Radioiodinkorporation in die Thyreozyten unter einer Vitamin A-Konzentration im Medium von 1,8  $\mu\text{M}$  (Abb. 15), so gab es zu den Messzeiten nach 2, 16 und 40 Stunden keine signifikant gesteigerten Einbauraten. Nach einer Inkubationsdauer von 64 Stunden erhöhten die Zusätze TSH (1,3 mU/ ml) und DMSO die Einbauraten des Iodids signifikant um das 1,5fache. Nach 88 Stunden fanden sich unter 1, 5 und 10  $\mu\text{M}$  Troglitazon signifikant erhöhte Radioiodaufnahmeraten, die unter der Konzentration 10 $\mu\text{M}$  das 2,3fache gegenüber der Kontrolle erreichten. Auch Tocopherol bewirkte in allen eingesetzten Konzentrationen eine signifikante Steigerung der Radioiodaufnahme um den Faktor 1,7 bis 2,3. Unter allen Tocopherolkonzentrationen wurden Steigerungsraten zwischen 1,5 und 2,2 erreicht, und unter TSH eine solche von 1,6. Auch diese Steigerungen der Iodidaufnahme waren signifikant von der Kontrolle verschieden.

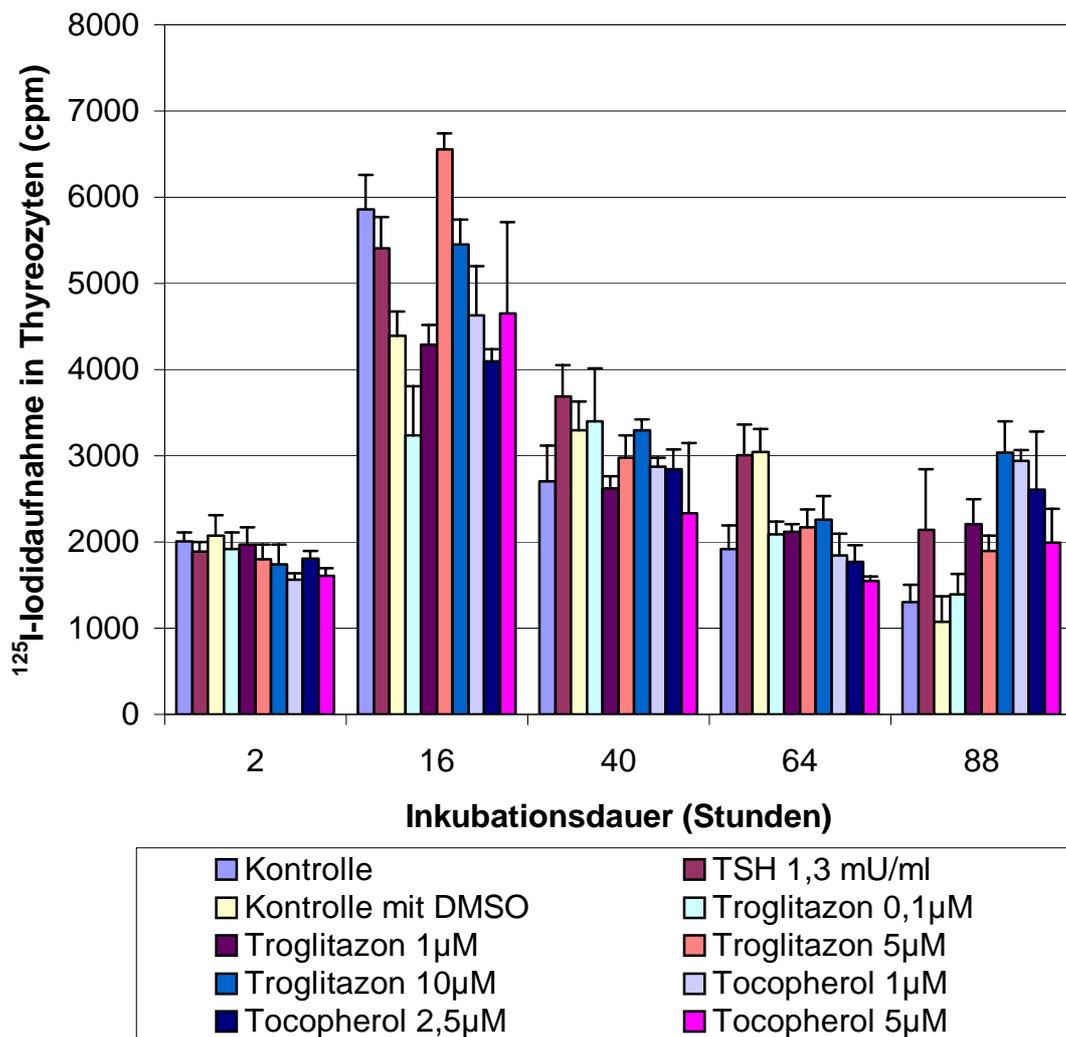
Über die gesamte Inkubationsdauer hinweg betrachtet bewirkte Troglitazon sowohl bei retinolfreiem als auch bei retinolhaltigem Medium einen leichten Effekt auf die Radioiodaufnahme. Tocopherol hingegen zeigte keinerlei Signifikanzen (s. Mittelwerte Abb. 13a-15a).



**Abb.13** Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 5; 10  $\mu\text{M}$ ), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (1; 2,5; 5  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt kein Vitamin A. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.13 im Anhang.)



**Abb.14** Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 5; 10  $\mu\text{M}$ ), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (1; 2,5; 5  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (0,6  $\mu\text{M}$ ). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.14 im Anhang.)



**Abb.15** Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 5; 10 μM), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (1; 2,5; 5 μM) auf die <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (1,8 μM). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe: 4 kBq <sup>125</sup>I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.15 im Anhang.)

#### **4.3.2 <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen**

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 0,1; 1; 2,5; 5 und 10 µM 2,4-Thiazolidindion stimuliert und darunter die Radioiodaufnahme in die Zellen gemessen. Die Vitamin A (Retinol)-Konzentrationen im Medium variierten zwischen 0; 0,6; 1,8 µM. Die Zugabe der stimulierenden Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen, die nicht mit Thiazolidindion versehen wurden, dienten als Kontrollgruppe.

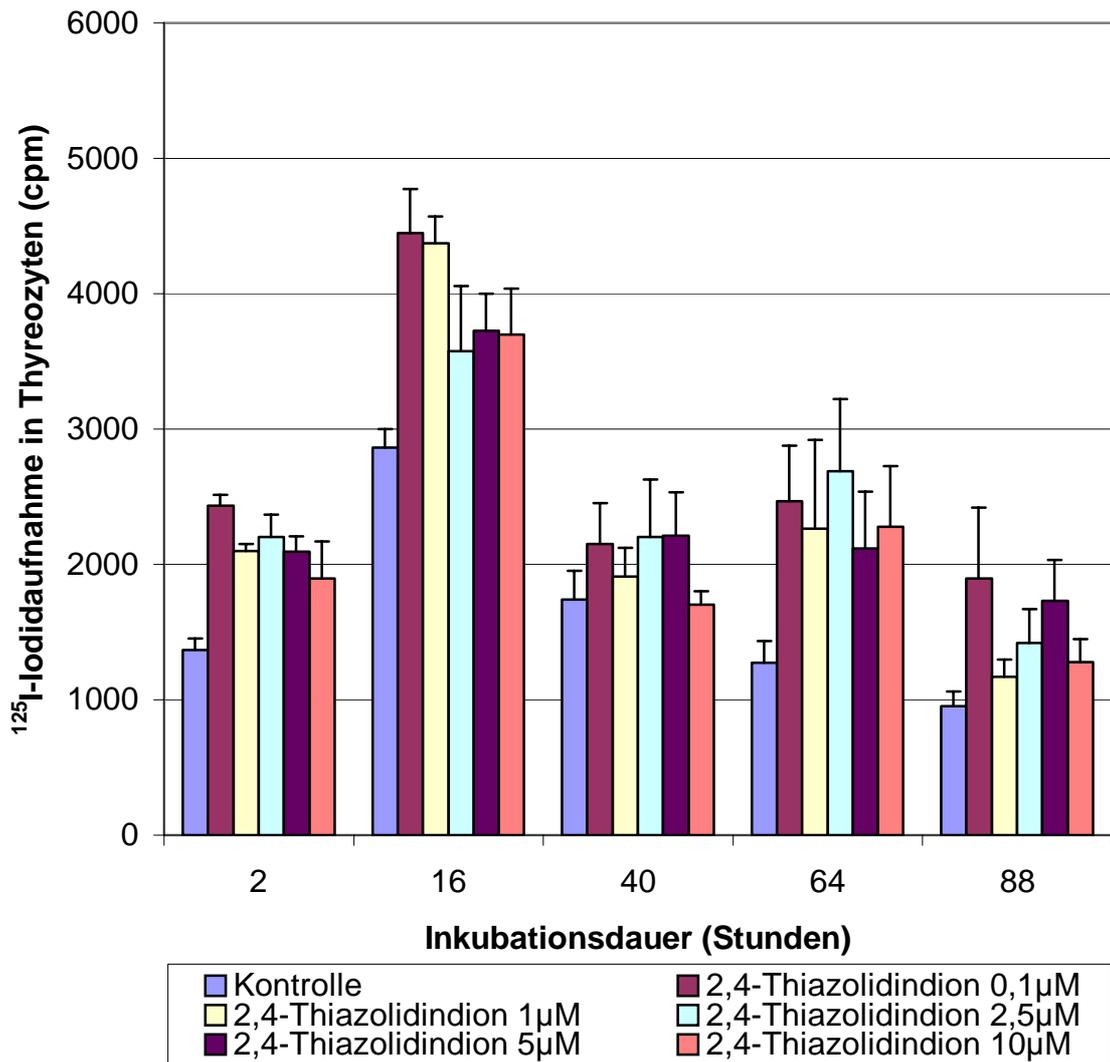
Die <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Radioiodinkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jener Gruppe verglichen, die mit steigenden Thiazolidindionkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 16, 17 und 18 dargestellt. Die den Abb. 13-18 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

In Vitamin A-freiem Medium (Abb. 16) zeigte sich nach 2 und 16 Stunden Inkubation unter 0,1 und 1 µM 2,4-Thiazolidindion eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant gesteigerte Aufnahme von Radioiod (Steigerungsfaktor bis 1,7). Nach 40 Stunden Inkubation waren die Radioiodinkorporationen nicht signifikant erhöht, während sie nach 64 Stunden bei allen eingesetzten Thiazolidindion-Konzentrationen wieder signifikant gesteigert waren. Am ausgeprägtesten war dies unter der Konzentration 2,5 µM (2,1faches des Kontrollwertes). Nach 88 Stunden war der Anstieg nur unter 0,1 und 5 µM signifikant (bis zum 1,9fachen des Kontrollwertes).

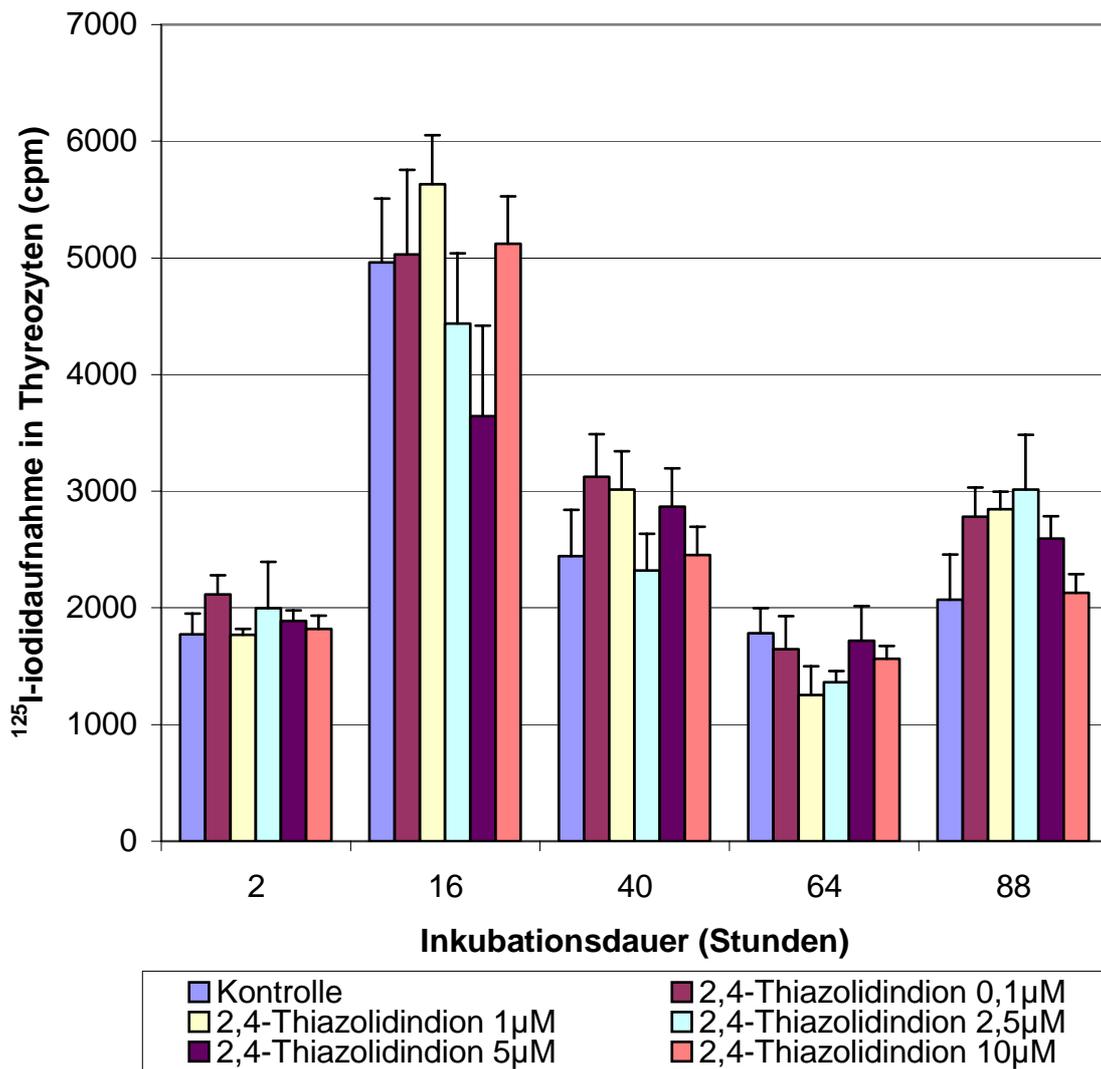
Betrug die Vitamin A-Konzentration im Medium 0,6 µM (Abb. 17), so konnte kein additiver Effekt der Agenzien auf die Radioiodaufnahme in die Thyreozyten festgestellt werden. Nach 88 Stunden Inkubationsdauer erzielte nur Thiazolidindion in der Konzentration von 2,5 µM eine leichte Steigerung (1,4fach).

Betrug die Vitamin A-Konzentration im Medium  $1,8 \mu\text{M}$  (Abb. 18), so zeigte nach 40 Stunden Inkubation Thiazolidindion  $10 \mu\text{M}$  eine 1,5fache und nach 88 Stunden Thiazolidindion  $0,1 \mu\text{M}$  eine 1,8fache Steigerung der Radioiodinkorporation.

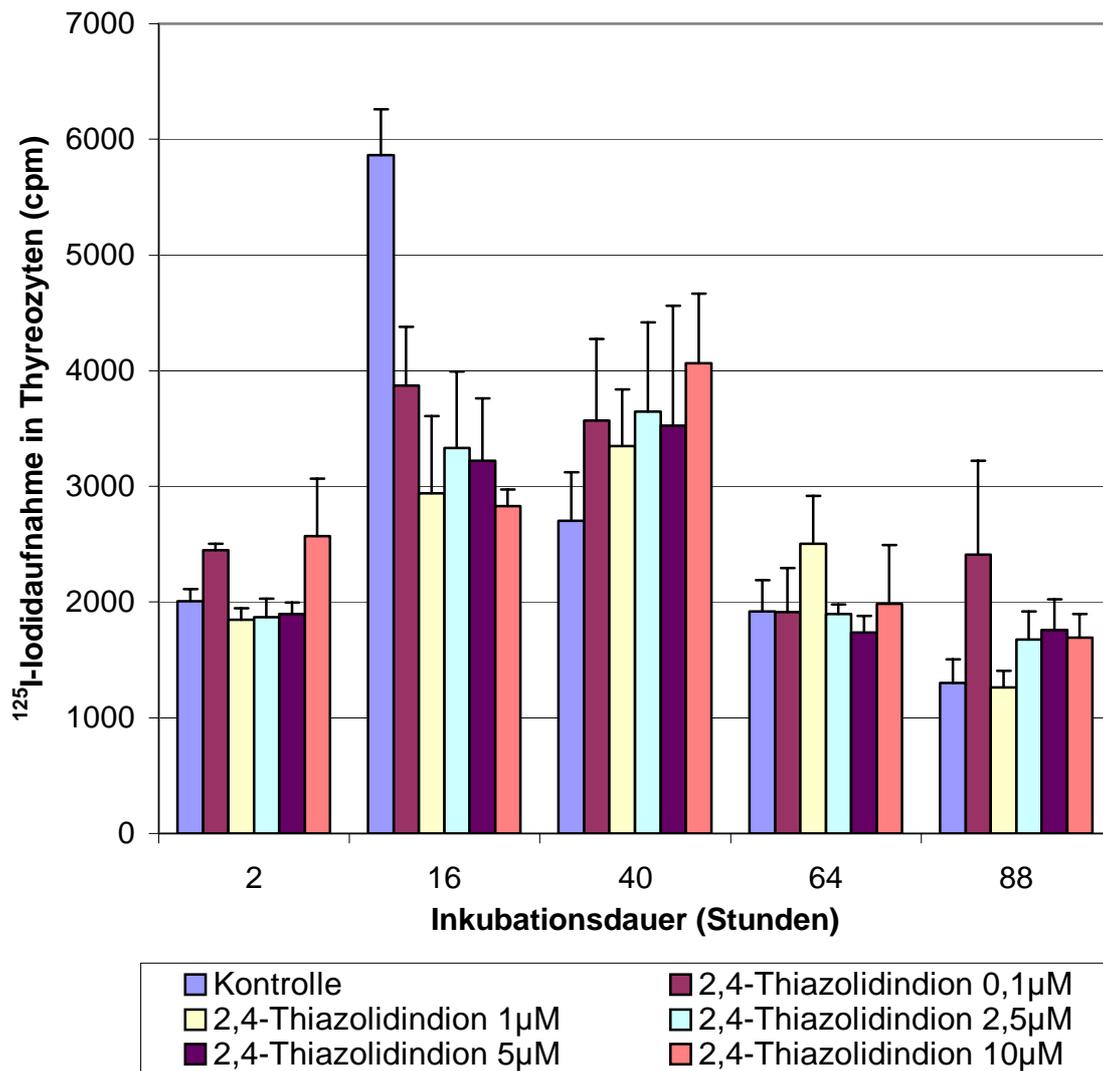
Betrachtete man das Wirkungsprofil des 2,4-Thiazolidindions, so rief es bei Retinol-Mangelmedium eine erhöhte Iodidaufnahme hervor. Bei retinolhaltigem Medium hatte es jedoch nur sehr leichte Effekte (s. Mittelwerte Abb. 16a-18a).



**Abb.16** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µM) auf die <sup>125</sup>I-iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt kein Vitamin A. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe : 4 kBq <sup>125</sup>I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.16 im Anhang.)



**Abb.17** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 μM) auf die <sup>125</sup>I-iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (0,6 μM). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>125</sup>I-Iodid-Zugabe : 4 kBq <sup>125</sup>I. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.17 im Anhang.)



**Abb.18** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyrozyten. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (1,8  $\mu\text{M}$ ). Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe : 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.18 im Anhang.)

#### **4.4 Thymidinaufnahme in kultivierte gesunde Schweinethyreozyten**

##### **4.4.1 <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol- und Vitamin A-Konzentrationen**

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 5 und 10 µM Troglitazon oder mit 5 und 10 µM Tocopherol (Vitamin E) sowie mit 1,3 mU/ ml TSH oder DMSO stimuliert. Die Vitamin A-Konzentrationen im Medium variierten zwischen 0; 0,6 und 1,8 µM. Die stimulierenden Agenzien wurden den Thyreozytenkulturen während des Aussäens hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellen, die weder mit Troglitazon noch mit Tocopherol, TSH oder DMSO behandelt wurden.

Die Aufnahme von Thymidin in die Thyreozyten wurde nach 2, 16, 40, 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit TSH, DMSO und verschiedenen Troglitazon- bzw. Tocopherolkonzentrationen von Anfang an stimuliert wurden. Die Ergebnisse werden in Tabelle 19, 20 und 21 dargestellt. Die den Abb. 19-24 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

Wie Abbildung 19 (Medium ohne Vitamin A) zeigt, hatte weder TSH noch DMSO einen bemerkenswerten Einfluß auf eine additive Thymidinaufnahme in die Schilddrüsenzellen. Die Inkorporation von Thymidin verringerte sich sogar. Dieser Zustand veränderte sich auch nicht durch die Zugabe von Retinol (0,6 µM oder 1,8 µM) zum Medium.

Betrachtete man die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten in Vitamin A-freiem Medium unter Zugabe von Troglitazon, so zeigt sich dagegen ein signifikant gesteigerter Einbau unter 5 µM Troglitazon nach 2, 40, 64 und 88 Stunden, wobei die Höchstwerte nach 40 und 88 Stunden auftraten (Erhöhung um das 2,5fache).

Unter 10 µM Troglitazon betrug der additive Anstieg nach 40 Stunden das 1,7fache der Kontrolle.

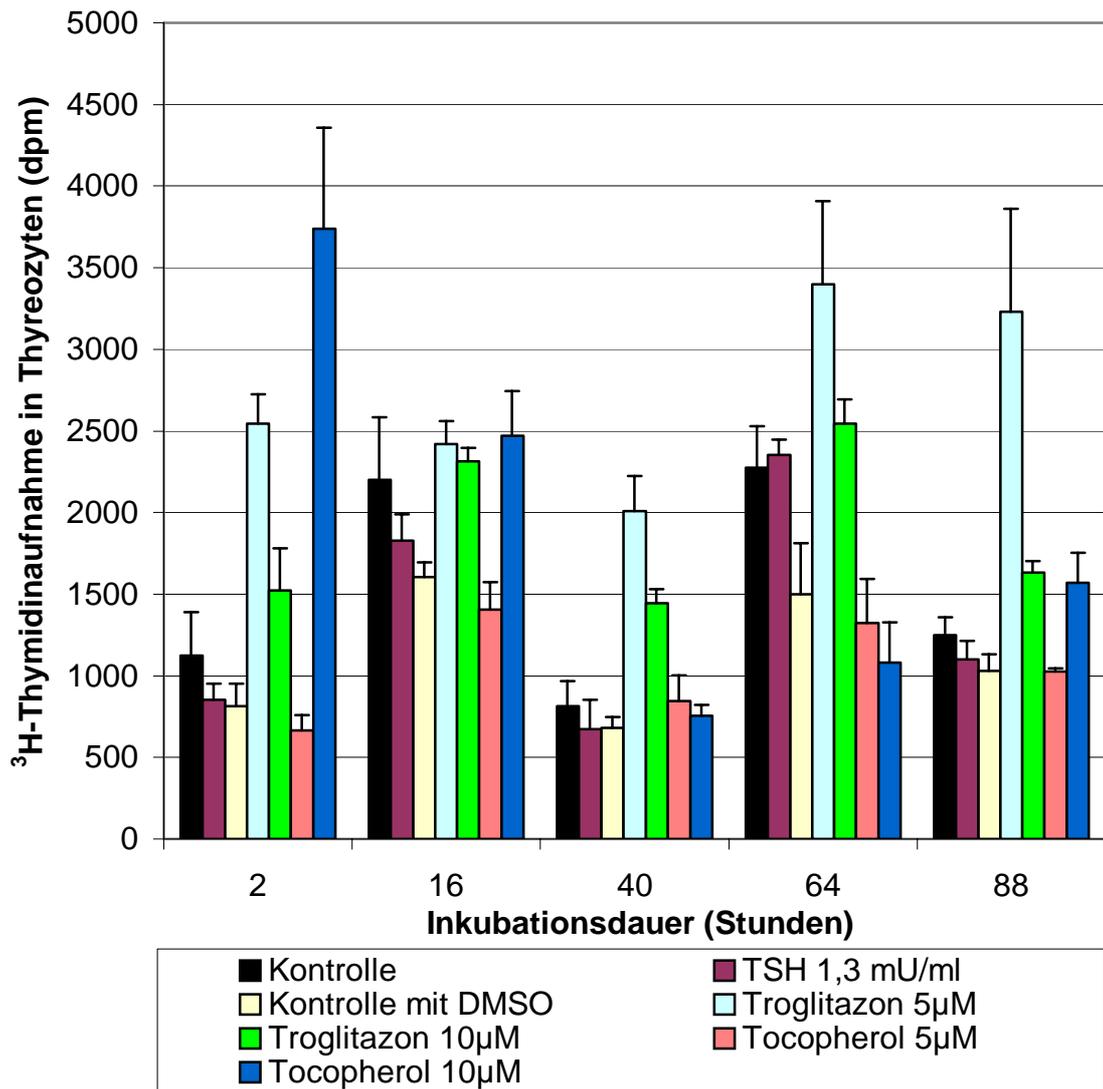
Im Vergleich zu Troglitazon hat 10  $\mu\text{M}$  Tocopherol nach 2 Stunden einen signifikanten additiven Effekt auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme. Der Anstieg betrug das 3,3fache der Thymidinaufnahme der Kontrolle.

Wie Abb. 20 und 21 zeigen, führte ein Vitamin A-Zusatz zum Medium in Verbindung mit Troglitazon zu einem verstärkten additiven Effekt auf die Thymidinaufnahme.

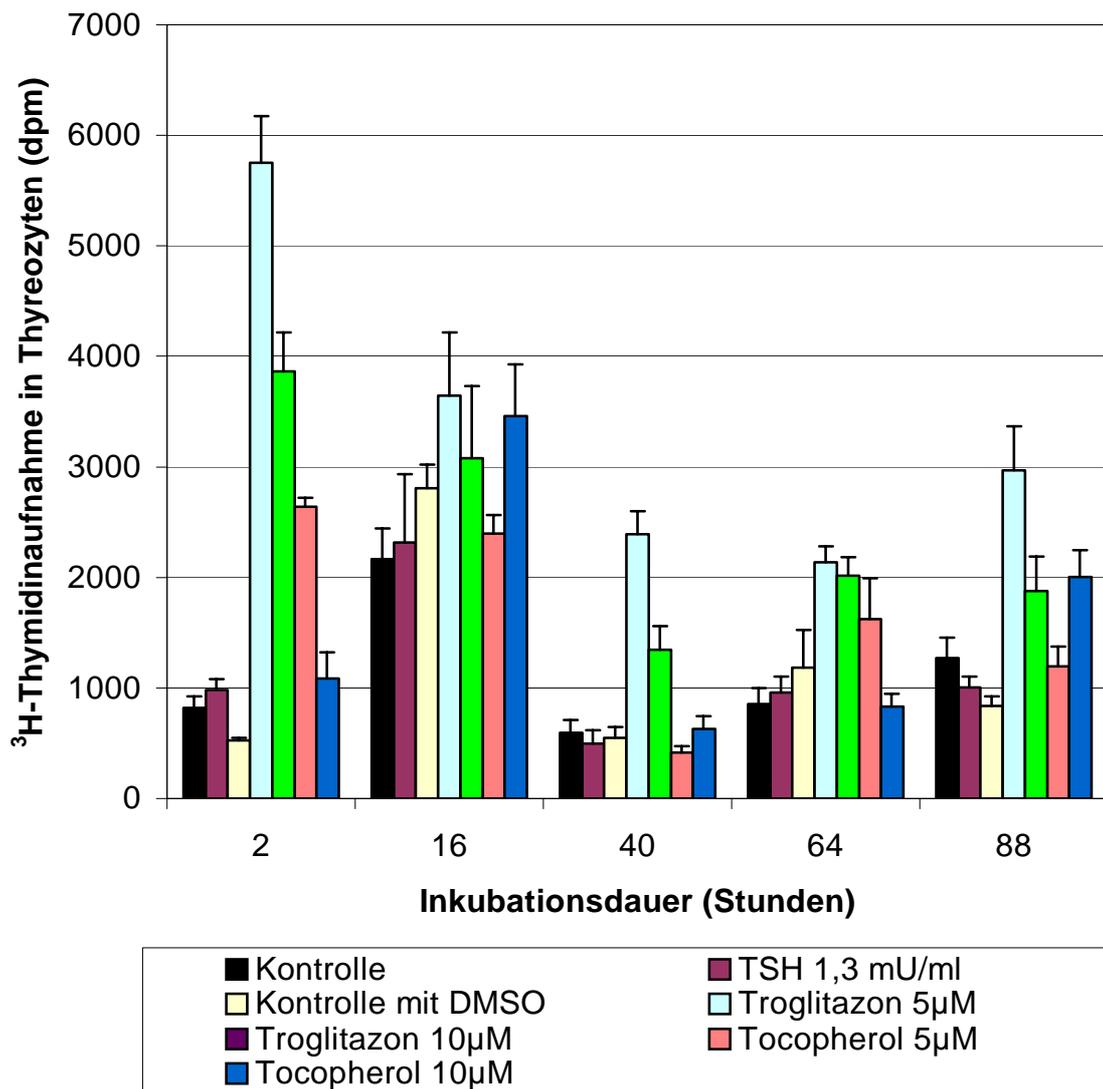
Unter einer Vitamin A Konzentration von 0,6  $\mu\text{M}$  (Abb. 20) und einer Troglitazonkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  kam es nach 2 Stunden Inkubation zu einem stark gesteigerten Einbau von Thymidin in die Thyreozyten, der das 7fache des Einbaus bei der Kontrollkultur erreichte. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden betrug der Einbau unter 5  $\mu\text{M}$  dann nur noch das 1,6fache der Kontrolle. Unter einer Troglitazonkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  lag nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden die Thymidinaufnahme beim 4,7fachen der Kontrolle. Die geringste Thymidinaufnahme in die Thyreozyten fand sich bei dieser Konzentration ebenfalls nach 16 Stunden (1,4faches der Kontrolle). Ein partiell additiver Effekt auf die Thymidinaufnahme wurde auch durch Tocopherol erreicht. Unter 5  $\mu\text{M}$  Tocopherol lag die Thymidinaufnahme nach 2 Stunden um das 3,2fache – und damit signifikant – über jenem der Kontrolle.

In Abb. 21 wird die Thymidinaufnahme unter einer Vitamin A Konzentration von 1,8  $\mu\text{M}$  betrachtet. Troglitazon in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  führte bei allen Erntezeiten zu einer signifikanten Verstärkung der Thymidinaufnahme in die Thyreozyten. Am deutlichsten waren die Effekte nach 16 und nach 88 Stunden. Sie waren aber deutlich niedriger als unter der Vitamin A-Konzentration von 0,6  $\mu\text{M}$ . Unter 5 und 10  $\mu\text{M}$  Tocopherol kam es zu einem leichten additiven Effekt in der Thymidininkorporation, der allerdings nicht zu allen Messzeiten signifikant war. Zum Teil waren die Einbauraten sogar signifikant niedriger als jene der Kontrollen. Unter 10  $\mu\text{M}$  Tocopherol wurde nach 16 Stunden die niedrigste Einbaurate (das 0,2fache der Kontrolle) gemessen.

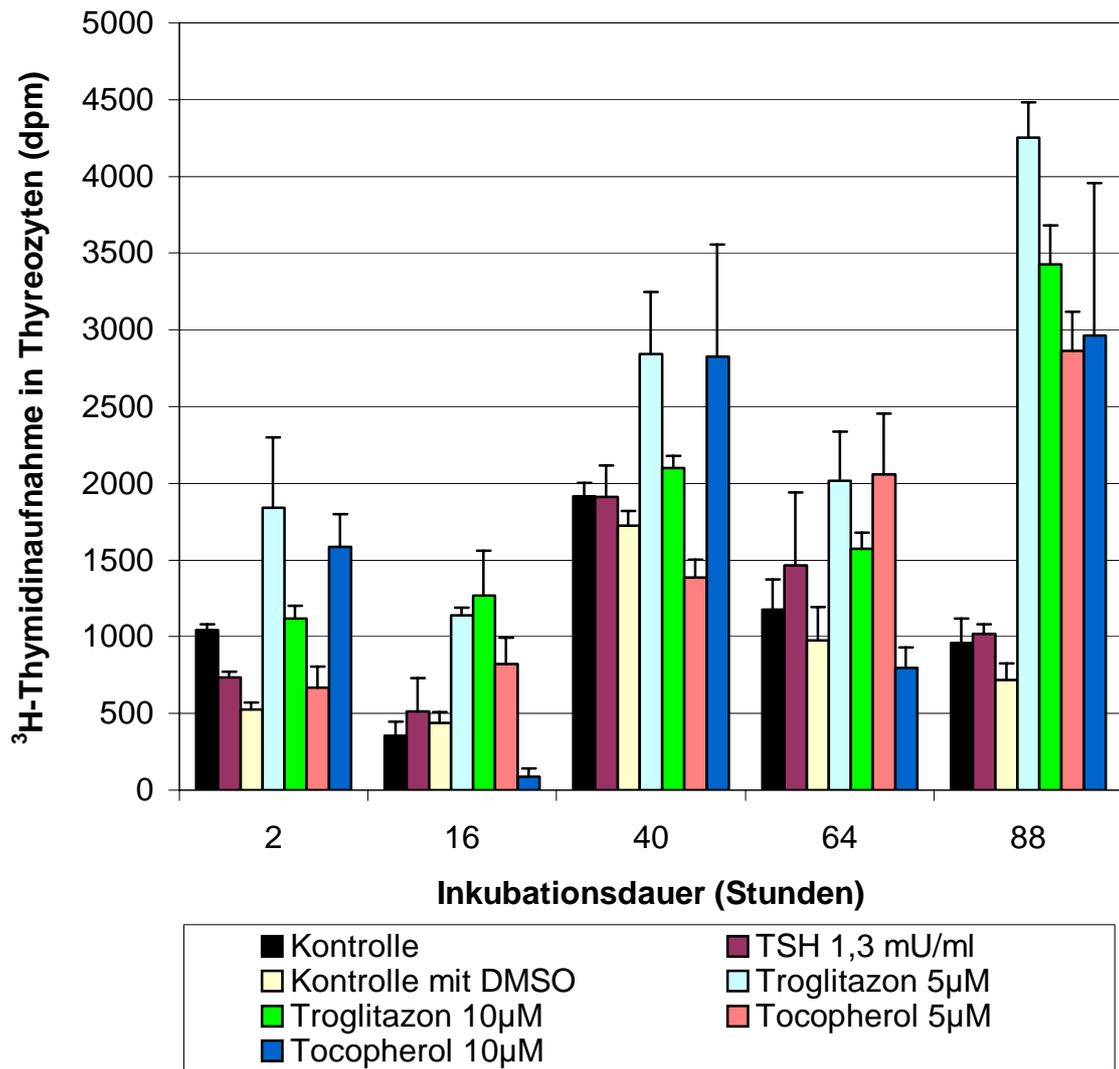
Insgesamt betrachtet steigerte sowohl Troglitazon als auch Tocopherol die Thymidinaufnahmerate erheblich. Besonders deutlich war dies beim Einsatz von retinolfreiem Medium (s. Mittelwerte Abb. 19a-21a).



**Abb.19** Einfluss von Troglitazon (5; 10  $\mu$ M), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (5; 10  $\mu$ M) auf die  $^3$ H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium enthielt kein Vitamin A. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^3$ H-Thymidin-Zugabe: 12 kBq  $^3$ H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.19 im Anhang.)



**Abb.20** Einfluss von Troglitazon (5; 10  $\mu$ M), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (5; 10  $\mu$ M) auf die  $^3$ H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium enthielt Vitamin A (0,6  $\mu$ M). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^3$ H-Thymidin-Zugabe : 12 kBq  $^3$ H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.20 im Anhang.)



**Abb.21** Einfluss von Troglitazon (5; 10 µM), TSH (1,3mU/ml), DMSO, sowie Tocopherol (5; 10 µM) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium enthielt Vitamin A (1,8 µM). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe : 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.21 im Anhang.)

#### **4.4.2 <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in gesunde Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen 2,4-Thiazolidindionkonzentrationen**

Kultivierte Schweinethyreozyten wurden mit 0,1; 1; 2,5; 5 und 10 µM 2,4-Thiazolidindion stimuliert. Die stimulierenden Agentien wurden den Thyreozytenkulturen beim Aussäen zugefügt. Die Retinol-Konzentrationen im Medium variierten zwischen 0; 0,6 und 1,8 µM. Als Kontrollgruppe dienten Schilddrüsenzellkulturen ohne jeglichen Zusätze. Die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 2; 16; 40; 64 und 88 Stunden gemessen. Die Ergebnisse der Thymidininkorporation in die Thyreozyten der Kontrollgruppe wurden mit jenen Gruppen verglichen, die mit 2,4-Thiazolidindion stimuliert wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 22, 23 und 24 dargestellt. Die den Abb. 19-24 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

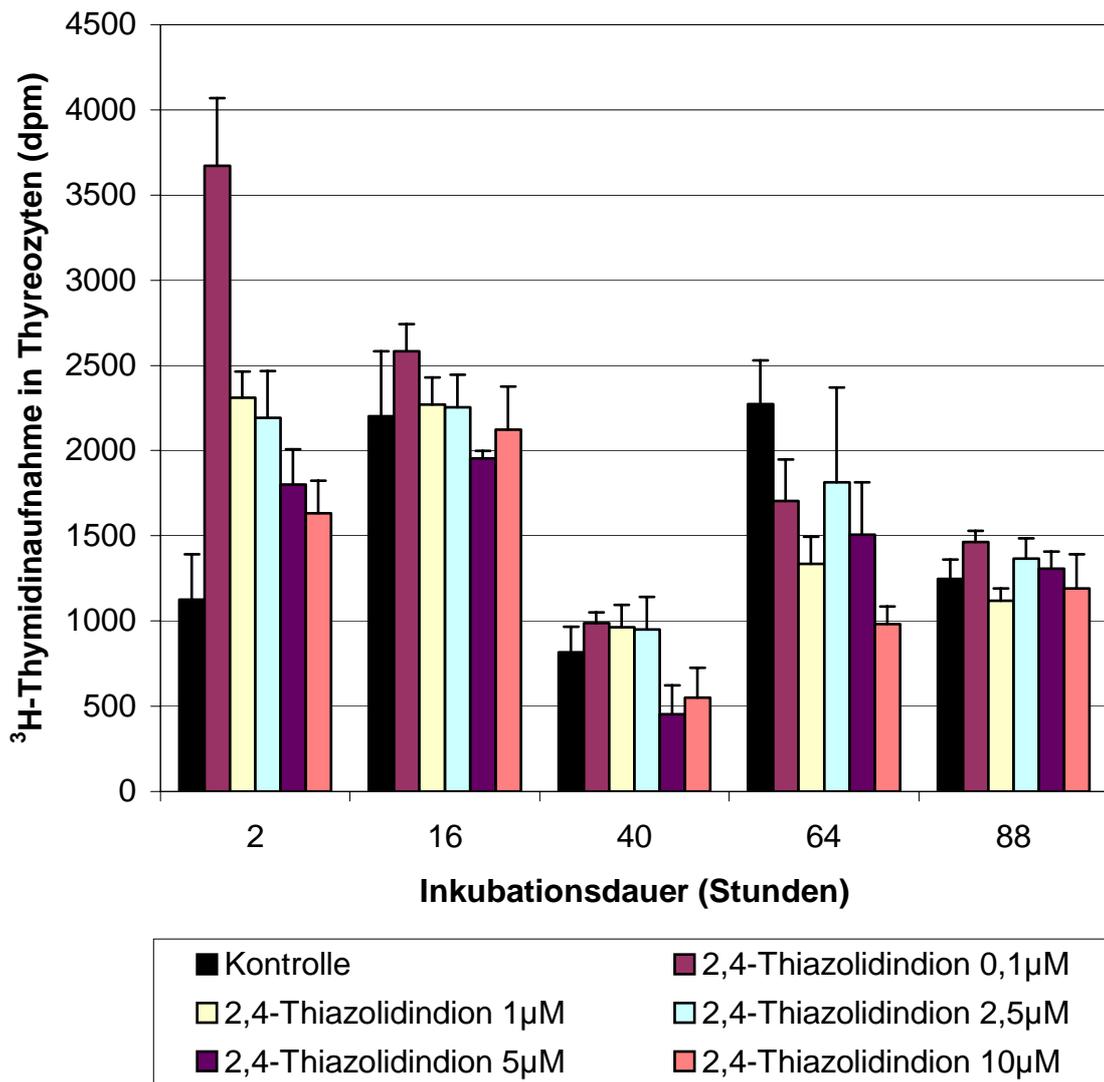
Wie Abb. 22 (Medium ohne Vitamin A) zeigt, haben alle 2,4-Thiazolidindion-Konzentrationen 2 Stunden nach Stimulationsbeginn einen verstärkten Einfluß auf die Thymidinaufnahme. Um so geringer die 2,4-Thiazolidindionkonzentration war, um so stärker war die Thymidinaufnahme. Die höchste Einbaurrate fand sich unter der Konzentration 0,1µM und betrug das 3,2fache der Einbaurrate in die Kontrollkulturen. Dieser Effekt hielt nur kurz an, denn nach 16, 40, 64 und 88 Stunden Stimulationszeit gab es bei keiner Konzentration eine signifikante Verstärkung des Einbaus von <sup>3</sup>H-Thymidin mehr. Zum Teil lag die Thymidininkorporation sogar unter jener der Kontrolle. Unter 10 µM 2,4-Thiazolidindion betrug die Einbaurrate nur das 0,4fache der Kontrolle.

Vergleicht man nun die Kontrollgruppe mit den durch 2,4-Thiazolidindion stimulierten Gruppen, die in Medium mit 0,6 µM Vitamin A kultiviert wurden (Abb. 23), so zeigt sich, daß vor allem 2,4-Thiazolidindion in der Konzentration 0,1 µM zu fast jeder Stimulationszeit eine signifikante additive Thymidinaufnahme hervorrief. Die höchste Einbaurrate mit einer Steigerung um

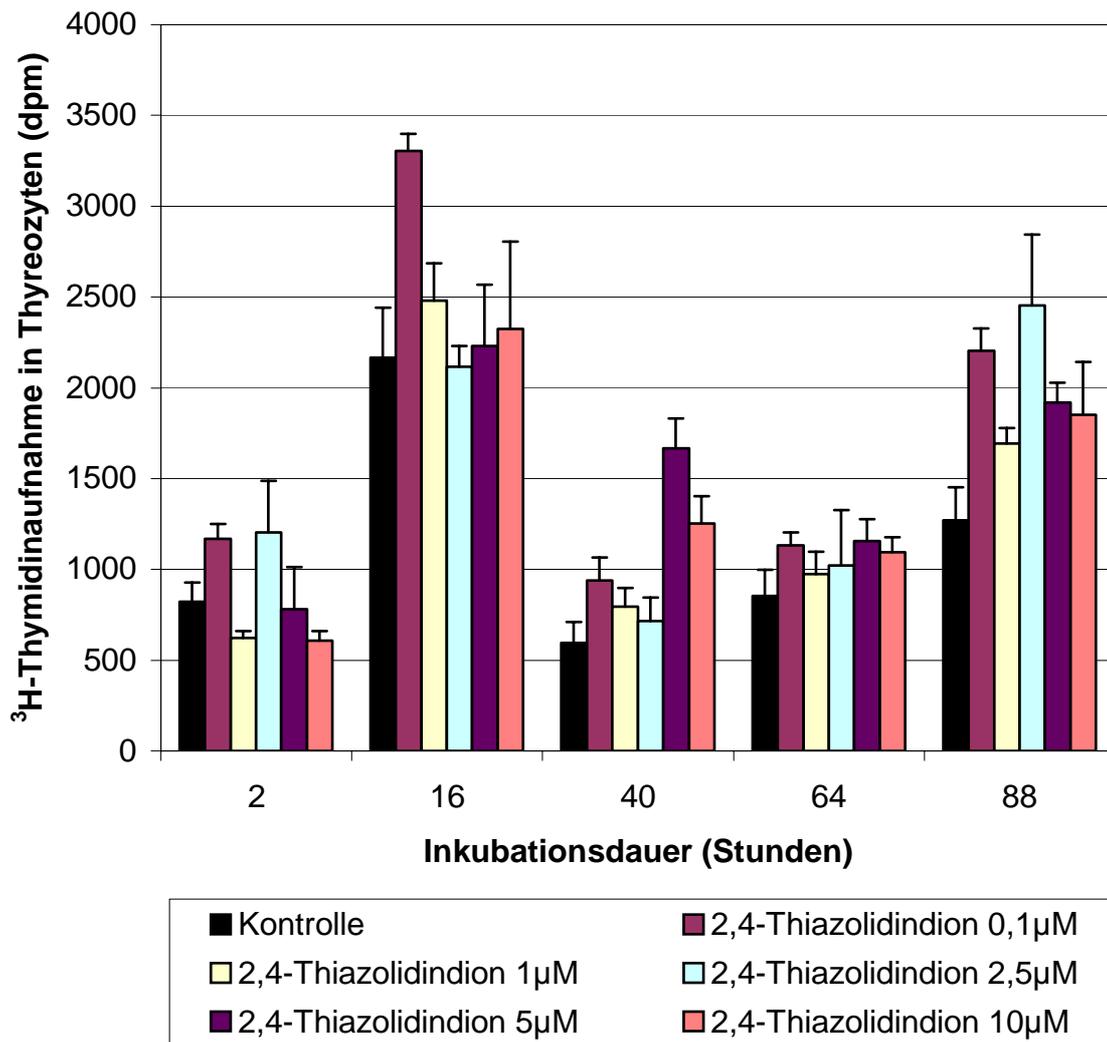
das 2,8fache wurde unter 5  $\mu\text{M}$  2,4-Thiazolidindion nach 40 Stunden Inkubation erreicht.

Bei einer Erhöhung der Vitamin A-Konzentration im Medium von 0,6 auf 1,8  $\mu\text{M}$  (Abb. 24) fanden sich unter 2,4-Thiazolidindion nur vereinzelt signifikant gesteigerte Thymidinaufnahmeraten. Die höchste Einbaurate wurde unter 2,5  $\mu\text{M}$  nach 16 Stunden Inkubationszeit erzielt. Der Steigerungsfaktor betrug hier 3,2.

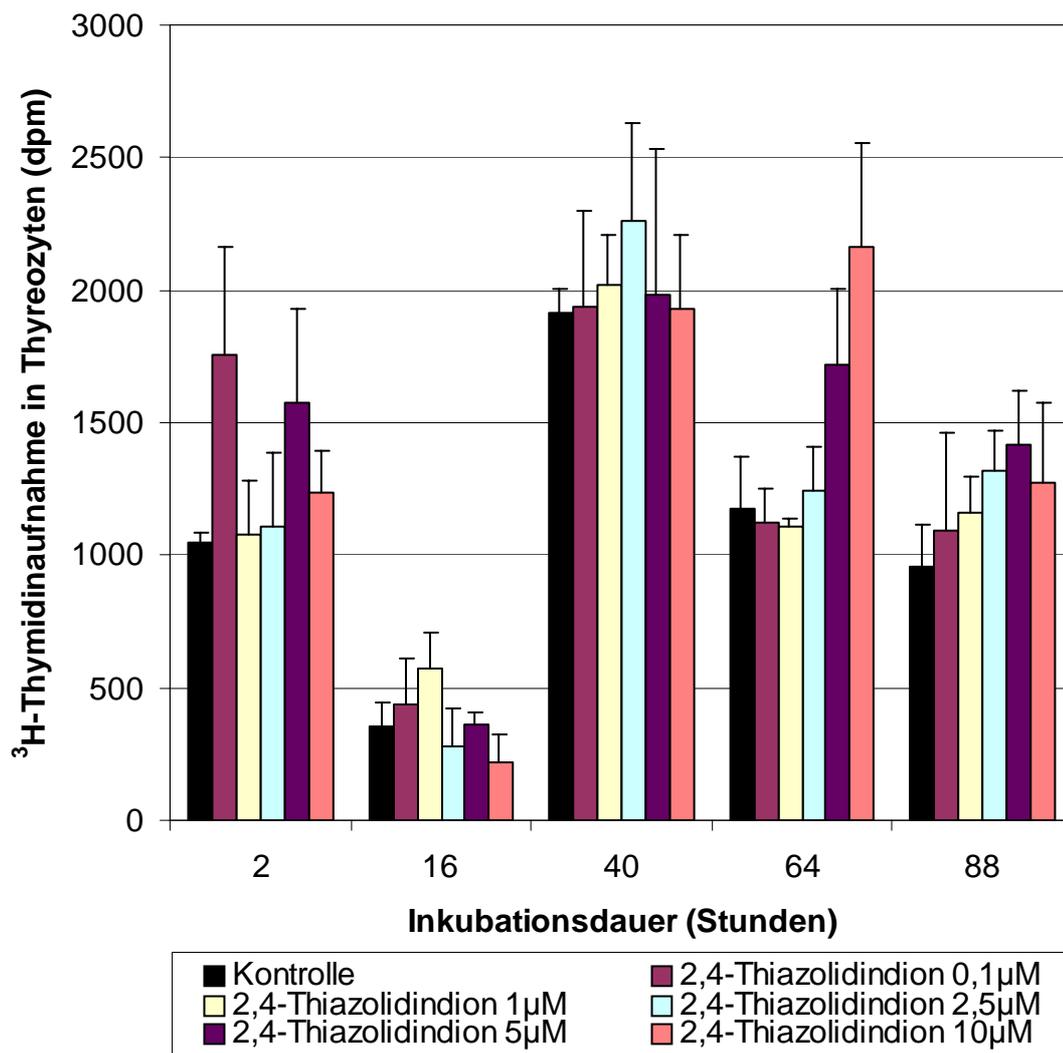
2,4-Thiazolidindion verstärkte wie Troglitazon und Tocopherol die Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten erheblich. Retinol bewirkte hierbei keinen verstärkenden Effekt (s. Mittelwerte Abb. 22a-24a).



**Abb.22** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium enthielt kein Vitamin A. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe: 12 kBq  $^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.22 im Anhang.)



**Abb.23** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µM) auf die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Das Medium enthielt Vitamin A (0,6 µM). Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^3\text{H}$ -Thymidin-Zugabe: 12 kBq  $^3\text{H}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.23 im Anhang.)



**Abb.24** Einfluss von Thiazolidindion (0,1; 1; 2,5; 5; 10 µM) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Das Medium enthielt Vitamin A (1,8 µM). Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Thymidinaufnahme nach 2, 16, 40, 64, 88 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe: 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.24 im Anhang.)

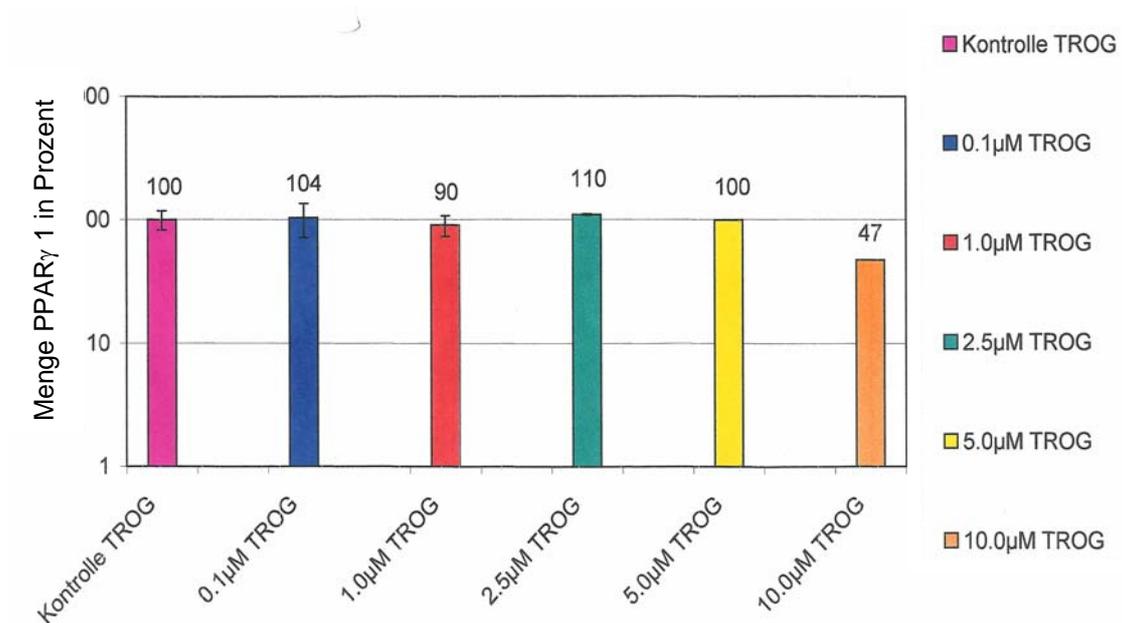
#### **4.5 Quantifizierung der PPAR $\gamma$ -mRNA bei karzinogenen Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazonkonzentrationen**

Kultivierte menschliche Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 wurden mit 0,1; 1; 2,5; 5 und 10  $\mu\text{M}$  Troglitazon stimuliert. Die Zugabe der stimulierenden Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen, die nicht mit Troglitazon versehen wurden, dienten als Kontrollgruppe. Parallel zu dieser Versuchsserie wurde mit Zellen der gleichen Passage ein Kontrollversuch mit  $^{125}\text{I}$ -Iodid- und  $^3\text{H}$ -Thymidinzugabe zum Medium durchgeführt. Nach 30 Stunden Inkubationsdauer wurde sowohl die Quantifizierung der PPAR $\gamma$ -mRNA in den Thyreozyten als auch die  $^{125}\text{I}$ -Iodid- und die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 25, 26 und 27 dargestellt. Die den Abb. 25-27 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

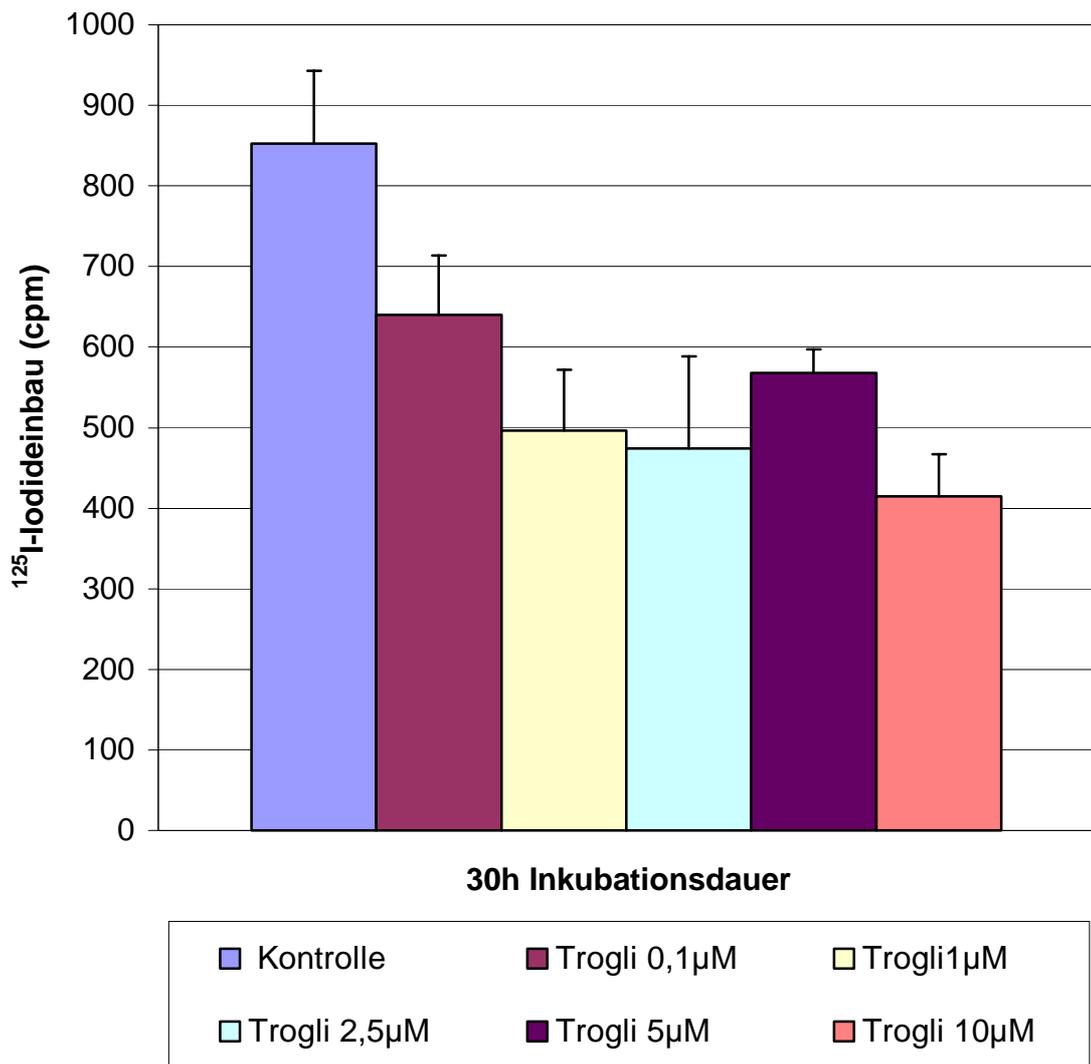
Die Menge an PPAR $\gamma$ -mRNA änderte sich bei keiner der eingesetzten Troglitazon-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle signifikant. Nur unter 0,1 und 2,5  $\mu\text{M}$  Troglitazon erhöhte sich die PPAR $\gamma$ -mRNA geringfügig um 4 bzw. 10 Prozent. Unter 1  $\mu\text{M}$  Troglitazon sank der Prozentsatz sogar leicht ab, unter 10  $\mu\text{M}$  Troglitazon sogar auf nur 47 % der Kontrolle.

Der Kontrollversuch mit Radioiodid zeigte bei keiner Troglitazonkonzentration eine signifikant erhöhte Iodidaufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte lagen sogar deutlich unterhalb des Kontrollwertes.

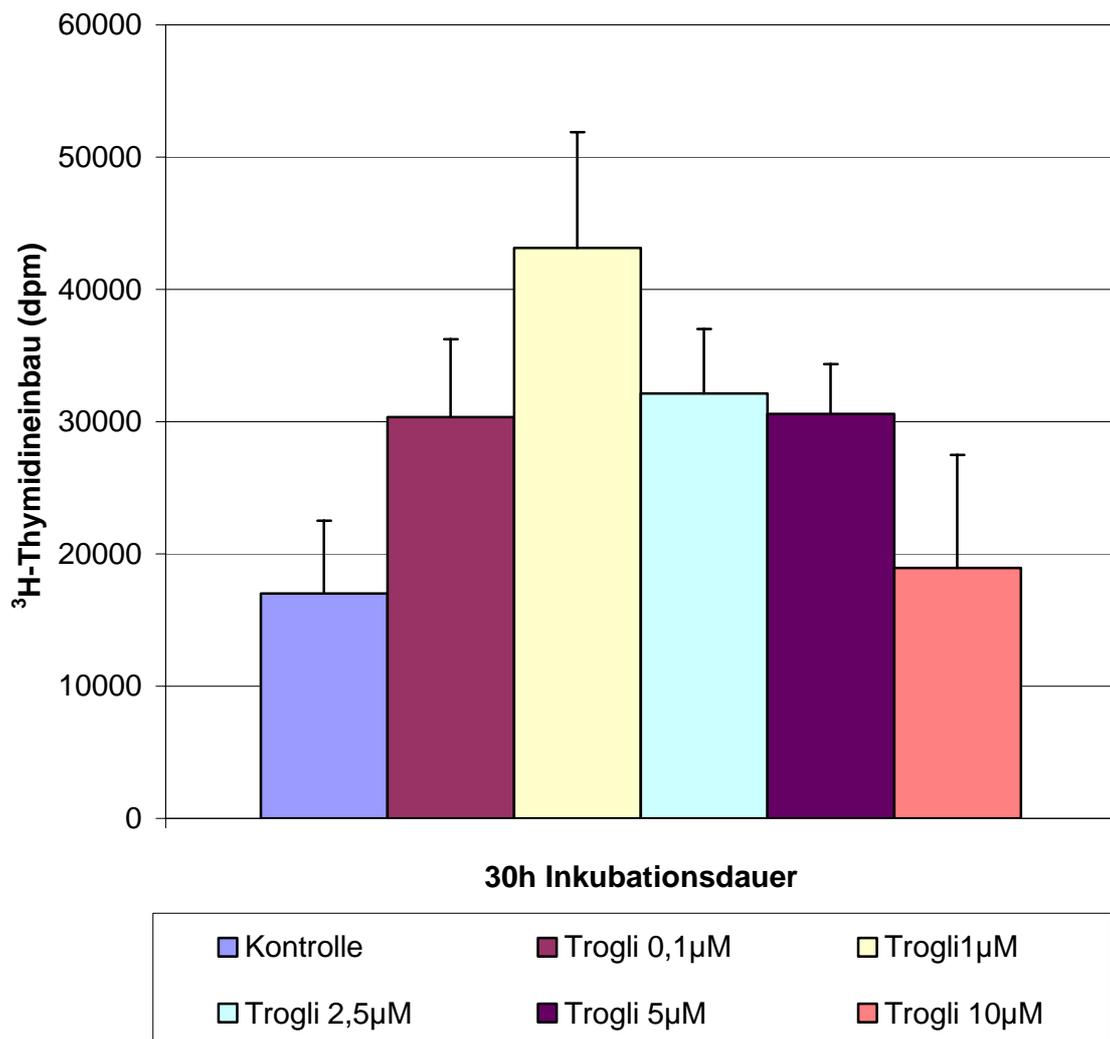
Beim Kontrollversuch zur Thymidinaufnahme konnte ein tendentieller Anstieg der Werte beobachtet werden. Lediglich unter der Troglitazonkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  war die Thymidinaufnahme signifikant um das 2,5fache der Kontrolle erhöht.



**Abb. 25** Quantifizierung der PPAR $\gamma$ -mRNA kultivierter maligner humaner Thyreozyten (FTC 133) unter dem Einfluss von Troglitazon. Die Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die PPAR $\gamma$ -mRNA-Menge nach 30 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000.



**Abb.26**  $^{125}\text{I}$ -Iodidkontrolle parallel zur PPAR $\gamma$ -mRNA-Quantifizierung. Gemessen wurde der Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 2,5; 5; 10  $\mu\text{M}$ ) auf die  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten (FTC 133). Die Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000,  $^{125}\text{I}$ -Iodid-Zugabe: 4 kBq  $^{125}\text{I}$ . (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 26 im Anhang.)



**Abb.27** <sup>3</sup>H-Thymidinkontrolle parallel zur PPAR $\gamma$ -mRNA-Quantifizierung. Gemessen wurde der Einfluss von Troglitazon (0,1; 1; 2,5; 5; 10  $\mu$ M) auf die <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten (FTC 133). Die Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Iodidaufnahme nach 30 Stunden Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, <sup>3</sup>H-Thymidin-Zugabe: 12 kBq <sup>3</sup>H. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 27 im Anhang.)

#### 4.6 Beeinflussung der Apoptose von karzinogenen Thyreozyten durch Staurosporin, Troglitazon und Retinol

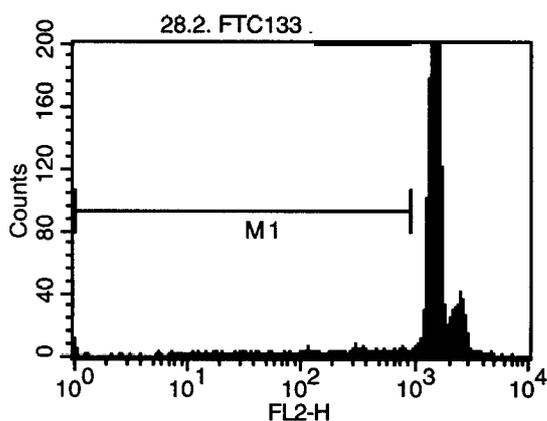
Kultivierte maligne humane Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 wurden entweder mit 5  $\mu\text{M}$  Troglitazon, 2,5  $\mu\text{M}$  Staurosporin oder 5  $\mu\text{M}$  Retinol stimuliert. Die Zugabe der stimulierenden Agenzien erfolgte beim Aussäen der Thyreozytenkulturen. Schilddrüsenzellen ohne spezielle Zusätze zum Medium dienten als Kontrollgruppe. Die Messung erfolgte nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden. Die Ergebnisse sind in Abb. 28 dargestellt. Die der Abb. 28 zugrundeliegenden Ergebnisse wurden an der gleichen Zellpopulation erhoben.

Bei den humanen karzinogenen Schilddrüsenzellen, die in Medium ohne spezielle Zusätze kultiviert wurden, war nur in einem sehr geringen Prozentsatz (7%) eine Zellapoptose zu beobachten.

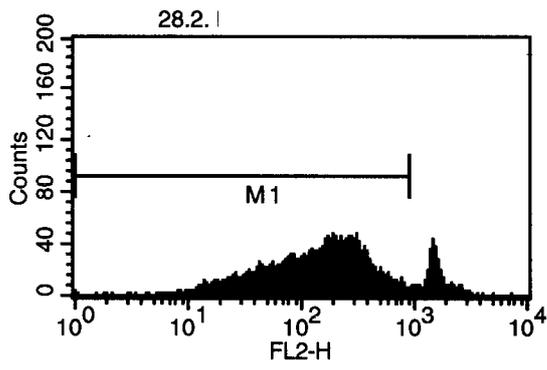
Im Gegensatz dazu bewirkte das Zellgift Staurosporin eine Apoptose bei 88,6 % der Zellen.

Bei dem Medikament Troglitazon mit der Konzentration 5 $\mu\text{M}$  gingen knapp die Hälfte der Zellen in eine Apoptose über; die Apoptoserate betrug 41,6 %.

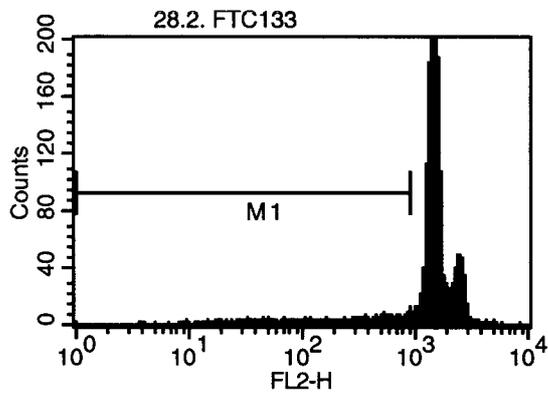
Die Apoptoserate unter Retinol betrug 24,8 %.



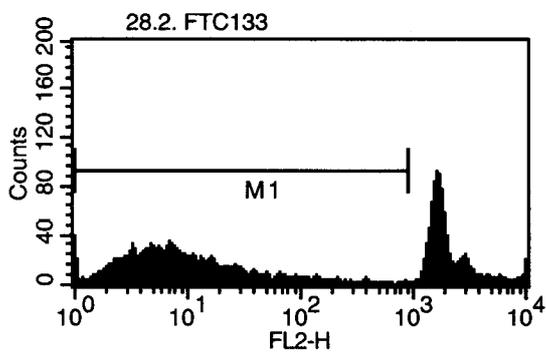
FTC 133; Medium



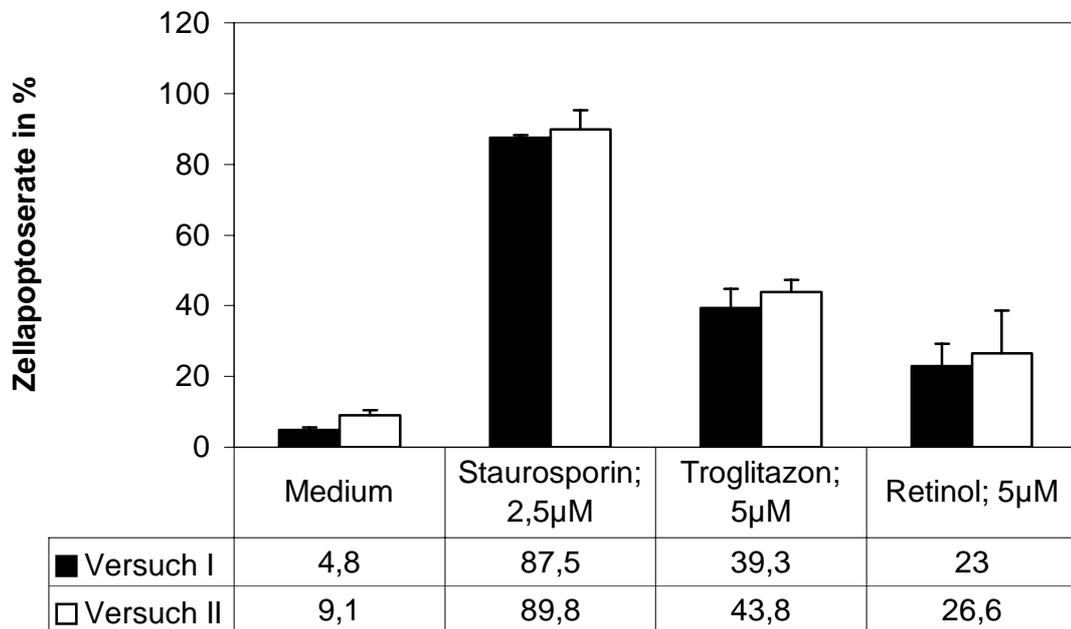
FTC 133; Staurosporin



FTC 133; Troglitazon



FTC 133; Retinoid



**Abb. 28** Apoptoserate (in %) in kultivierten malignen humanen Thyreozyten (FTC 133) bei zusatzfreiem Medium, bei Zugabe von Troglitazon (5  $\mu$ M) oder Staurosporin (2,5  $\mu$ M) oder Retinol (5  $\mu$ M). Die Zugabe der Stimulantien erfolgte bereits beim Aussäen. Gemessen wurde die Apoptoserate nach 48 Stunden Inkubationsdauer. Versuch II ist eine Wiederholung zur Bestätigung der Ergebnisse des Versuchs I. Dargestellt sind Mittelwert und SEM (n=4). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000.

## **5. Diskussion**

### **5.1 Methoden**

Um herauszufinden, ob Troglitazon den Stoffwechsel und hier insbesondere die Iodspeicherung von Schilddrüsenmalignomen beeinflussen kann, wurden in-vitro-Untersuchungen mit karzinogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 133 durchgeführt. Es handelte sich dabei um humane Zellen, welche einem 42 Jahre alten männlichen Patienten mit einem metastasierenden follikulären Schilddrüsenkarzinom (FTC) entnommen wurden. Die Zellen der Zelllinie FTC 133 entstammten dem Primärtumor (Havekes et al. 2000). Zelllinien weisen nur in-vitro-Merkmale auf, weshalb kein direkter Vergleich zu den in-vivo-Eigenschaften gezogen werden konnte.

Ideal wäre nun ein Vergleich dieser transformierten humanen Zellen mit nichttransformierten humanen Zellen gewesen. Da keine unvorbehandelten humanen Zellen zur Verfügung stehen, wurde auf Thyreozyten vom Schwein zu Vergleichszwecken zurückgegriffen. Im Gegensatz zu der Zelllinie FTC 133 ließen sich die Schweinethyreozyten nur in Primärkulturen halten. Diese Primärkulturen stellen ein in-vitro-System mit in-vivo-Merkmalen dar. Der Nachteil der Primärkultur bestand jedoch darin, dass immer wieder neue Zellkulturen angelegt werden mussten. In dem für diese Primärkulturen verwendeten NCTC 135-Medium war eine Reaggregation der isolierten Thyreozyten zu Follikeln möglich, wenn dem Medium innerhalb der ersten 24 Stunden TSH zugefügt wurde. Die Folge sind normale funktionelle Fähigkeiten der Thyreozyten (Delorme et al. 2002).

In transformierten Thyreozyten ist die Fähigkeit zur Iodspeicherung meist verschwunden, da der hierfür erforderliche Natrium-Iodid-Symporter seine Aktivität verloren hat. Von Retinoiden ist bekannt, dass sie diese Fähigkeit wiederherstellen können (Schmutzler C, 1998) und die Thyreozyten dadurch einer Radioiodtherapie zugänglich werden (Haldemann, AR 1999; Schmutzler, C 2001). Die zu untersuchenden Effekte von Troglitazon auf transformierte Thyreozyten wurden daher mit jenen des Retinols verglichen. Retinol und sein Stoffwechselprodukt Retinsäure sind auch noch aus einem weiteren Grund

interessant. Die Retinoide binden an den Kernrezeptor RXR (Ahuja et al., 2003). Troglitazon wiederum bindet an den Kernrezeptor PPAR $\gamma$ , und beide besetzten Kernrezeptoren binden als Heterodimer an das Hormone-response-Element von üblicherweise insulinabhängigen Genen und initiieren deren Transkription. Damit ergab sich die Frage, ob sich Troglitazon oder seine Teilkomponenten plus Retinol in ihrer Wirkung auch verstärken können.

Zur Kontrolle der spezifischen Leistung der Thyreozyten wurde der Einbau von  $^{125}\text{I}$ -Iod gemessen. Ziel war es, die herabgesetzte Radioiodinkorporation in den transformierten Thyreozyten medikamentös zu erhöhen, da eine hohe Radioiodaufnahme in die Thyreozyten von Schilddrüsenmalignomen für eine Radioiodtherapie von Vorteil ist. Bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen besteht die Therapie der Wahl meist aus der totalen Thyreoidektomie. Postoperativ wird dann mit einer Radioiodtherapie zur Ausschaltung von verbleibendem Schilddrüsengewebe fortgefahren. Eine postoperative Radioiodtherapie ist somit eine wichtige und effektive Begleittherapie in der Behandlung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen sowohl bei Kindern als auch bei Erwachsenen. Dadurch kann eine gute Langzeitüberlebensrate und eine gute Prognose erreicht werden (Kumar et al. 2003).

Der Einbau von Thymidin in die Thyreozyten wurde untersucht, weil die Thymidinaufnahme die Voraussetzung für ein Wachstum der Zellen ist. Für diese Untersuchung wurde tritiummarkiertes Thymidin verwendet. Die globale  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten beweist allerdings noch keinen Einbau des Thymidins in die DNS und ist somit für den Nachweis eines Wachstums nicht spezifisch genug, denn das Thymidin könnte auch im Zytosol verweilen (Amann 2002). Vorausgegangene Untersuchungen an Thyreozytenkulturen vom Schwein zeigten, dass die Thymidinaufnahme in gesunde, also nichttransformierte Thyreozyten mit dem Einbau in die DNA parallel verläuft (Wahl 1991) und somit in diesem Fall als Wachstumsparameter gewertet werden darf.

## **5.2 <sup>125</sup>I-Iodid- und <sup>3</sup>H-Thymidininkorporation in kultivierte maligne humane Thyreozyten (FTC 133) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol-, 2,4-Thiazolidindion- und Retinol-konzentrationen**

Betrachtet man die Strukturformel von Troglitazon, so beinhaltet diese unter anderem eine Imid-Gruppe und einem Chromanring (Oxanring mit direkt anschließendem aromatischen Ring). Um herauszufinden, welcher Strukturteil von Troglitazon den erwünschten Effekt auf die Iodidaufnahme und die Thymidininkorporation bewirkte, untersuchten wir Substanzen, die jeweils nur eine der oben genannten funktionellen Gruppen besitzen. Tocopherol besitzt den Chromanring. 2,4-Thiazolidindion hingegen weist die Struktur eines voll gesättigten Derivates des Grundkörpers Thiazol (C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>NS) auf (Römpp 1995). Dieses chemische Gerüst kommt im Troglitazon dem Strukturanteil mit der Imidgruppe nahe (Verspol et al. 2002;).

Die Radioiodaufnahme in kultivierte Thyreozyten verläuft phasenförmig. Für die Beurteilung der Iodidaufnahme ist es wichtig zu wissen, bei welcher Zeit man mit messbaren Effekten rechnen kann. Um das Wirkungsprofil von Troglitazon, bzw. Tocopherol oder 2,4-Thiazolidindion beurteilen zu können, ist es allerdings nicht sinnvoll, nur einzelne Zeiten während der Inkubation zu betrachten. Daher wurden auch alle Aufnahmeraten über die gesamte Inkubationszeit hinweg gemittelt. Hierbei ergab sich bei der Untersuchung der Radioiodinkorporation in kultivierte maligne humane Thyreozyten (FTC 133) unter verschiedenen Troglitazon- und Vitamin A-Konzentrationen (s. Mittelwerte Abb. 1a-3a), dass 5 µM Troglitazon den besten steigernden Effekt auf die Radioiodaufnahme hervorrief. Tocopherol mit der Konzentration von 10 µM hingegen hatte nur einen geringen Effekt, der mit steigender Retinolkonzentration im Medium deutlicher wurde. 2,4-Thiazolidindion hatte keinen sicher steigernden Effekt auf die Radioiodaufnahme (s. Mittelwerte Abb. 4a-6a).

Troglitazon zeigte in seinem Wirkungsprofil den ausgeprägtesten Effekt auf die Radioiodaufnahme. Die Teilkomponente Tocopherol zeigte, wenn sie als solche in Versuchen eingesetzt wurde, dagegen nur eine schwache Wirkung.

Die andere Teilkomponente 2,4-Thiazolidindion wies dagegen keinen Effekt auf. Ausgewählte einzelne Strukturteile von Troglitazon wirkten somit nicht effektiver als das Gesamtmolekül.

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

Retinsäure induziert die Redifferenzierung von Zellen akuter myeloischer Leukämien, Neblastomen, Teratokarzinomen, Melanomen und Rhabdomyosarkomen. Retinsäure wird auch therapeutisch bei der Promyelozytenleukämie und anderer maligner Erkrankungen eingesetzt (Coelho et al. 2004; Smith et al. 1992).

In einer Studie mit 20 Patienten (Simon, D. et al. 1998), die unter einem Schilddrüsenkarzinom litten, wurde festgestellt, dass Retinsäure bei einem Teil der Patienten einen positiven Effekt auf die Redifferenzierung des NIS besaß. Sie reagierten auf eine Retinsäurebehandlung mit einem zunehmenden Radioiodtransport in die Zelle (Schmutzler et al. 2002). Nur bei 6 Patienten (32%) sank der Tumormarker Thyreoglobulin ab. Bei einem Großteil der Patienten (63%) nahm das Thyreoglobulin allerdings weiterhin zu. Dies bedeutet, dass Retinsäure nur einen begrenzten Effekt auf den Tumor zeigt. Als positiv einzustufen ist, dass zumindest bei 50% der Patienten die Iodidaufnahme wieder stimuliert und so eine günstige Voraussetzung für eine Radioiodtherapie geschaffen wurde (Simon, D. et al. 1998).

Retinoide zeigen in Schilddrüsenzellen noch weitere Effekte. Vitamin A reduziert die gesamte zirkulierende Schilddrüsenhormonkonzentration, aber verändert nicht die TSH- und TRH-Konzentrationen (Morley et al. 1980). Des Weiteren reduziert Vitamin A die Schilddrüsengröße und verstärkt zugleich die <sup>131</sup>I Aufnahme in die Schilddrüse (Morley et al. 1980).

Die Wirkung von Retinoiden auf Zellen wird über geeignete Kernrezeptoren vermittelt. Durch diese Rezeptoren wird vorwiegend das Wachstum und die Differenzierung gesteuert und aktiviert (Jetten et al. 1979; Permick et al. 1994).

Ethanol wirkt in mancher Hinsicht sehr ähnlich wie TSH auf Thyreozyten (Nasu, M. et al. 1993). Es kann in Kultur die Iodidaufnahme dosisabhängig stimulieren und bei gleichzeitiger TSH-Stimulation zusätzlich steigern. Die Wirkung von Ethanol kann durch die Aktivierung des cAMP-Systems und durch die Aktivität der mit dem Natrium-Iodid-Symporter gekoppelten Na-Ka-ATPase erklärt werden. Retinol hat wie Ethanol eine alkoholische OH-Gruppe. Wahrscheinlich kann eine Reihe seiner Effekte auch mit seiner Eigenschaft als Alkohol erklärt werden. Retinol kann als Alkohol die Membranfluidität der Thyreozyten verändern. Dadurch können inaktive, aber schon vorhandene NIS-Proteine an die Zelloberfläche gelangen (Meller 2002). Dies ist ein Beispiel, dass auch ohne Neusynthese von NIS-Protein eine Steigerung der Radioiodaufnahme ohne TSH möglich ist. Bei Vitamin A (Retinol) kommt

allerdings noch hinzu, dass es in der Zelle auch zu dem stoffwechselaktiven Metaboliten Retinsäure verstoffwechselt werden kann.

In verschiedenen Untersuchungen wurde die Wirkung von Retinsäure auf follikuläre karzinogene Thyreozyten erforscht. In der follikulären Tumorzelllinie FTC 133 stimulierte Retinsäure die Produktion von NIS-mRNA. Dies kann zu einer Wiederherstellung des Natrium-Iodid-Symporters führen. Allerdings scheint die korrekte Lokalisation des NIS in der Membran noch entscheidender für die Aktivität des Proteins zu sein, denn Schilddrüsenmalignome zeigen häufig noch eine NIS-Expression auf der mRNA- und Proteinebene (Dohan et al. 2001). Nach Schreck et al. 1994, führten Retinoide in dieser Zelllinie aber auch zu einer erhöhten Iodidinkorporation. Auch Auswirkungen auf die Proliferation der Tumorzellen traten unter Retinsäure auf. So hemmte Retinsäure in-vivo das Wachstum, wobei jedoch eine Reduktion der Tumorgroße nicht bestätigt werden konnte (del Senno et al. 1993; Grüning et al. 2003; Simon et al. 2002).

Im Tumorstadium reagieren veränderte Thyreozyten auch unsensibel auf die Einwirkung von TSH. Dieser Effekt beruht nicht auf einer strukturellen Veränderung des TSH-Rezeptors, auf dessen Quantitätsverlust oder auf der verminderten Affinität des Rezeptors. Vielmehr ist eine gestörte Interaktion zwischen dem TSH-Rezeptor und dem G-Protein verantwortlich. Eine Applikation von TSH zur Steigerung der Radioiodaufnahme ist daher bei Schilddrüsenmalignomen häufig ineffektiv (Namba, H. et al. 1993). Die Steigerung der Iodid Aufnahme durch andere Substanzen wird daher um so wichtiger. Außerdem könnte durch TSH das Wachstum des Tumors beschleunigt werden.

Im Vitamin A-freien Medium war die Thymidinaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten unter Tocopheroleinwirkung niedriger als unter Troglitazon, wenn gleiche molare Konzentrationen miteinander verglichen wurden (s. Mittelwerte Abb. 7a-9a). Der Effekt von 2,4-Thiazolidindion auf die Thymidinaufnahme war von den untersuchten Substanzen am ausgeprägtesten. Im Vitamin A-haltigen

Medium trat die Wirkung von Thiazolidindion nicht so deutlich hervor, wie im Vitamin A-freien Medium (s. Mittelwerte Abb. 10a-12a). Troglitazon, welches in seiner Struktur beide untersuchten Komponenten vereinigt, nimmt im Vitamin A-haltigen Medium bei der Thymidinaufnahme unter den untersuchten Substanzen eine Mittelstellung ein.

Die bei der Thymidininkorporation erzielten Aufnahmeleistungen unter Troglitazon, Tocopherol und 2,4-Thiazolidindion bedeuten, dass ein Wachstum der karzinogenen Thyreozyten durch die eingesetzten Substanzen theoretisch weiterhin stattfinden kann. Für den definitiven Beweis, dass ihr Wachstum nicht gehemmt wird, wäre allerdings auch die Erfassung der Thymidinaufnahme in die DNS erforderlich gewesen. Dessen ungeachtet kam es unter Troglitazon gleichzeitig aber auch zu einer gesteigerten Apoptose (siehe Kap. 5.5), wodurch sich eine Nettoproliferation relativierte.

### **5.3 <sup>125</sup>I-Iodid- und <sup>3</sup>H-Thymidininkorporation in kultivierte, nicht-transformierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazon-, Tocopherol-, 2,4-Thiazolidindion- und Retinolkonzentrationen**

Betrachtet man das Wirkungsprofil der eingesetzten Substanzen während der gesamten Inkubationszeit, so rief 2,4-Thiazolidindion in Kulturen mit Vitamin A-freiem Medium eine erhöhte Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten hervor. Im Vitamin A-haltigen Medium zeigte es jedoch keine Wirkung auf die Radioiodaufnahme in Thyreozyten (s. Mittelwerte Abb. 16a-18a). Unter dem Einfluss von Troglitazon war der Effekt etwas schwächer als unter Thiazolidindion, wenn Vitamin A-freies Medium verwendet wurde. Dagegen konnte der durch Troglitazon verursachte leichte Effekt aber auch im Vitamin A-haltigen Medium beobachtet werden. Tocopherol zeigte weder im retinolhaltigen noch im retinolfreien Medium einen signifikanten Effekt auf die Radioiodaufnahme der Thyreozyten (s. Mittelwerte Abb. 13a-15a).

Troglitazon zeigte bei nicht-transformierten Thyreozyten einen mäßigen Effekt auf die Radioiodinkorporation. Betrachtete man seine Strukturkomponenten isoliert, so war der Effekt von Tocopherol eher schwächer, jener von 2,4-Thiazolidindion eher stärker als der von Troglitazon, welches beide Substanzen in seinem Molekül beinhaltet. Somit zeigte Troglitazon bei den nicht-transformierten Thyreozyten (Schweinethyreozyten) im Gegensatz zu den humanen transformierten Thyreozyten nur einen schwachen Effekt auf die Iodidaufnahme.

Bei der Thymidinaufnahme in die kultivierten Schweinethyreozyten konnte eine starke Steigerung beobachtet werden (s. Mittelwerte Abb.19a-24a). Gegenüber der Kontrolle steigerten sowohl Troglitazon, als auch Tocopherol und 2,4-Thiazolidindion die Thymidininkorporation. Am wenigsten deutlich war dieser Effekt, wenn Vitamin A-freies Medium für die Kulturen eingesetzt wurde.

Hinter der Bezeichnung Tocopherol (Vitamin E) verbirgt sich eine Gruppe von Verbindungen, die aus einem für die Vitaminwirkung wesentlichen Chromanring und einer gesättigten Kohlenwasserstoffseitenkette bestehen. Je nach Lokalisation der Kohlenwasserstoffseitenkette unterscheidet man alpha-, beta-, gamma-Tocopherole. Wir verwenden für unsere Untersuchungen alpha-Tocopherol. Vitamin E stellt ein fettlösliches Vitamin in biologischen Membranen dar und ist an der Membranstabilität beteiligt (Pschyrembel 1994). Dem Vitamin E wird eine wichtige präventive Rolle u.a. bei Diabetes, Herzerkrankungen und Neoplasien zugesprochen (Hensley et al. 2004). Mano et al. (1998) führten Untersuchungen durch, in denen der Vitamin E-Spiegel in Schilddrüsengewebe von Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom bestimmt wurde. Im Vergleich zu gesundem thyreoidalen Gewebe war der alpha-Tocopherol-Spiegel in den karzinogen veränderten Zellen erhöht. Dem Vitamin E könnte somit eine Rolle in der Dysfunktion der Schilddrüsenfollikelzellen zugesprochen werden. Eine klinische Studie von Meydani et al. (1998) über zusätzlich verabreichte Vitamin E-Gaben bei gesunden Erwachsenen ergab keine

Auswirkungen auf die Konzentration an Schilddrüsenhormonen. Kang et al. (2000) untersuchten den Einfluss von alpha-Tocopherol auf das Zellwachstum und auf die Redifferenzierung von Primärtumoren der menschlichen Leber. Ihre Ergebnisse sagen aus, dass die Proliferation der Tumorzellen gehemmt und die Redifferenzierung der Zellen induziert wird. Außerdem kann ein Aufheben der malignen phenotypischen Eigenschaften beobachtet werden. Eine Zellredifferenzierung unter Vitamin E, bei der der NIS wieder funktionstüchtig wird, kann auch die eigenen Ergebnisse, bei denen eine erhöhte Iodidaufnahme in karzinogene Thyreozyten unter Vitamin E-Einfluss festgestellt wurde, erklären. Die Frage, weshalb auch die Thymidinaufnahme anstieg, muss jedoch offen bleiben.

Betrachtet man in den von uns erzielten Ergebnissen die Radioiodidaufnahme in gesunde Schweinethyreozyten im Vergleich zum Einbau in humane karzinogene (transformierte) Thyreozyten, so ist festzustellen, dass die Iodidaufnahme unter Troglitazon in karzinogene Thyreozyten ausgeprägter war als die Aufnahme in nichttransformierte Schweinethyreozyten. Die Ursache hierfür könnte einerseits an den Speziesunterschieden liegen, andererseits könnte die Ursache in dem Fakt zu sehen sein, dass es sich im einen Fall um karzinogene, im anderen Fall um gesunde Thyreozyten handelte. Das Ausmaß der Radioiodidaufnahme zwischen den beiden Zellarten ist somit nur mit Vorsicht direkt vergleichbar.

#### **5.4 Quantifizierung der PPAR $\gamma$ -mRNA in humanen karzinogenen Thyreozyten (FTC 133) in Abhängigkeit von unterschiedlichen Troglitazonkonzentrationen**

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) gehören zur Familie der nukleären Hormonrezeptoren. Sie können weiter unterteilt werden in PPAR alpha, beta und gamma, welche von verschiedenen Genen codiert werden (Kumar et al. 1999). Thiazolidindione (TZD) sind die ersten chemischen

Verbindungen, die als PPAR gamma-Liganden entdeckt wurden. Sie stellen eine neue Medikamentenklasse in der Diabetesbehandlung dar. Damit PPAR wirksam werden kann, bildet es mit dem Retinoid-Rezeptor RXR ein Heterodimer. Dieses Heterodimer führt dazu, dass bestimmte DNA-Abschnitte transkribiert und somit bestimmte Proteine gebildet werden (Mukherjee et al., 1997). Ob die Wiederherstellung des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) bei Schilddrüsenmalignomen auf den oben erwähnten Mechanismus zurückgeführt werden kann, ist wissenschaftlich noch offen. Ein Zusammenhang zwischen Liganden für nukleäre Hormonrezeptoren und der NIS-Expression kann jedoch angenommen werden (Tanosaki et al. 2003).

In unseren transformierten humanen Zellen der Zelllinie FTC 133 ließ sich zwar mRNA von PPAR $\gamma$  nachweisen, jedoch stieg diese unter Troglitazon nicht weiter an. Da bei der überwiegenden Anzahl unserer Versuche die Iodidaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten anstieg, lässt sich spekulieren, dass der Effekt der vermehrten Radioiodaufnahme über einen anderen Mechanismus als über den des Kernrezeptors PPAR $\gamma$  abläuft.

In den letzten Jahren wurde die pathophysiologische Bedeutung des PPAR bei verschiedenen Gewebearten erkannt (Ehrmann Jr. et al. 2002). PPAR nimmt Einfluss auf die Regulation des Fettstoffwechsels, auf Entzündungsprozesse, auf die Entwicklung von Artherosklerose oder Diabetes. Außerdem spielt PPAR $\gamma$  eine Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Tumoren (Miller et al., 2000; Li et al., 2001; Everett et al., 2000; Murphy et al., 2000). Es gibt Ergebnisse, die nachwiesen, dass PPAR-Kernrezeptoren das Wachstum verschiedener humaner Tumorarten unterdrücken, indem sie sich bestimmter Mechanismen wie Wachstumsstillstand, Apoptose und Zelldifferenzierung bedienen (Corton et al. 2000; Kersten et al. 2000). Jedoch ist der genaue Übertragungsweg, der zum Wachstumsstillstand und zur Differenzierung der Zellen führt, noch nicht komplett erforscht. Eine Möglichkeit besteht in der Hochregulierung des Tumorsuppressorgens PTEN durch PPAR $\gamma$ -Agonisten (Samid et al., 2000; Lippmann et al., 2000). Insgesamt ist es trotz unvollständigem Wissen offensichtlich, dass die Liganden (Agonisten) von

PPAR die Fähigkeit zur Tumorbekämpfung besitzen und eine neue Möglichkeit in der Tumorbehandlung oder deren Chemoprävention darstellen (Roberts-Thompson, 2000).

### **5.5 Beeinflussung der Apoptoserate von karzinogenen Thyreozyten (FTC 133) durch Troglitazon und Retinol**

Apoptose, der programmierte Zelltod, stellt einen äußerst effektiven und hochentwickelten Vorgang dar, um Zellen aus ihrer Umgebung zu entfernen. Apoptose schützt vor möglichen Folgen der unkontrollierten Zellproliferation, die zu Neoplasien führen kann (Kucharova, 2002). Die Regulation der Apoptose von proliferierenden entarteten Zellen könnte der Schlüssel sein, die Weiterentwicklung einer Erkrankung aufzuhalten (Kiess, W. et al., 1998). Der Vorgang der Apoptose stellt in regulierter Form eine effektive Möglichkeit dar, die Tumorthherapie zu verbessern. Dies könnte erreicht werden, indem entweder die Apoptose im gesunden Gewebe gehemmt oder die Apoptoserate in den Tumorzellen erhöht wird (Milas, L. et al., 1994). Die Apoptose kann auf verschiedenen Wegen initiiert werden und verursacht Zellschäden, die unter anderem den Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien und die Proteolyse von Strukturproteinen beinhaltet (Baker 1998; Arscott 1998). Zu den wichtigsten physiologischen Substanzen, die Apoptose verursachen, zählen Hormone, die als Liganden für nukleäre Rezeptoren fungieren. Vertreter dieser Hormone sind Steroide, Triiodthyronin, Vitamin D und auch die von uns untersuchten Retinoide. Dass Retinoide zu einer Apoptose führen können, ist mehrfach beschrieben worden (Kucharova et al. 2002; Yamazaki et al. 2000; Arends et al. 1991).

Staurosporin dient als Kontrollsubstanz bei in-vitro Untersuchungen zur Apoptose. Es bewirkte bei unseren FTC-Zellen mit 88 % eine sehr hohe Apoptoserate. Diese lag somit um das 12,5fache höher als bei unbehandelten, als Kontrolle dienenden Zellen.

Durch Troglitazon (5 $\mu$ M) konnte bei der Zelllinie FTC 133 ein beträchtlicher Prozentsatz an Apoptose erreicht werden. Mit 41 % an untergegangenen Zellen stellt dies das 5,8fache gegenüber der Kontrolle dar. In der Literatur (Okura et al. 2000) wird hierzu ein Stoffwechselweg über das Tumor-Suppressorgen P53 und das p53-responsive-Stressprotein Gadd45 ohne Aktivierung von PPAR $\gamma$  beschrieben. Ob dieser Weg für unsere Thyreozyten ebenfalls zutrifft, muss dahingestellt bleiben. Wie bereits zuvor erwähnt, stieg andererseits die Thymidinaufnahme unter Troglitazon an. Dieses aufgenommene Thymidin konnte somit nicht als Hinweis auf eine Netto-Proliferation gewertet werden.

Unter Retinol (5 $\mu$ M) stieg die Apoptoserate bei den malignen humanen Thyreozyten auf 25 % an. Diese Rate lag zwar unter derjenigen, die durch Troglitazon hervorgerufen wurde, aber auch dieses Ergebnis war signifikant von der Kontrolle verschieden.

Bevor die in vitro beobachtete Troglitazon-induzierte Apoptose klinisch eingesetzt werden kann, müssen noch mehr Informationen vorliegen. In weiterführenden Untersuchungen muss noch intensiver geklärt werden, wie sich nicht-transformierte Thyreozyten in Bezug auf die induzierte Apoptose verhalten. Nach Fröhlich et al. (2001) führen zum Beispiel Retinoide auch bei nicht-transformierten Schweinethyreozyten zur Apoptose. Diese Retinoidkonzentrationen liegen allerdings wesentlich höher als die Konzentrationen, die die Differenzierungssteigerung in transformierten Zellen hervorrufen. Ziel ist es, bei einem Malignomleiden die gesunden Zellen möglichst zu erhalten.

## 6. Zusammenfassung

Schilddrüsenmalignomzellen verlieren aufgrund ihrer Entartung die Fähigkeit zur Iodaufnahme. Diese ist jedoch Voraussetzung zur Durchführung einer Radioiodtherapie. Von Retinsäurederivaten ist bekannt, dass sie diese Malignomzellen zur Redifferenzierung und somit zur Iodaufnahme anregen können. Nachteilig ist die Toxizität dieser Retinsäurederivate. Ein weiterer potentieller Kandidat für eine Redifferenzierungstherapie ist der Insulinsensitizer Troglitazon, der hier untersucht wurde. Untersucht wurden auch die Komponenten des Troglitazons. Vitamin E (Tocopherol) bildet einen wesentlichen Strukturteil des Troglitazons. Das getestete 2,4-Thiazolidindion hingegen stimmt mit dem anderen Strukturende des Troglitazons überein.

Die Wirkung dieser Substanzen wurde beurteilt an der <sup>125</sup>I-Iodidinkorporation und der <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme sowohl in maligne humane (transformierte) Schilddrüsenzellen der Linie FTC 133 als auch in kultivierte Schweinethyreozyten. Die Schweinethyreozyten entsprechen nicht-transformierten Zellen. In Primärkultur weisen sie ähnliche Merkmale wie humane Thyreozyten in vivo auf. Die Stimulation beider Thyreozytenarten mit Troglitazon erfolgte auch unter verschiedenen Retinolkonzentrationen, um einen synergistischen Effekt zwischen Troglitazon und Retinol erkennen zu können.

Troglitazon erzielte den besten steigernden Effekt auf die Radioiodidaufnahme in humane karzinogene Thyreozyten (FTC 133) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Tocopherol hatte nur eine schwache und 2,4-Thiazolidindion keinerlei Auswirkung auf den Iodstoffwechsel.

Von Troglitazon ist ein Wirkmechanismus auf molekularer Ebene bekannt. Die mRNA seines Kernrezeptors PPAR $\gamma$  konnte in den Schilddrüsenzellen nachgewiesen werden. Da unter Troglitazon die Radioiodid-Inkorporation in die Thyreozyten anstieg, die mRNA von PPAR $\gamma$  aber unverändert blieb, lässt dies die Spekulation zu, dass der Effekt der vermehrten Radioiodaufnahme über

einen anderen Mechanismus als über den des Kernrezeptors PPAR $\gamma$  erzielt wurde.

Die  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten (FTC 133) wurde weder durch Troglitazon noch durch Tocopherol, 2,4-Thiazolidindion oder Retinol gehemmt. Normalerweise geht die Thymidinaufnahme mit der DNS-Synthese und dem Wachstum der Zellen parallel einher. Daraus könnte gefolgert werden, dass die untersuchten Substanzen keinen wachstumshemmenden Effekt haben.

Bei 40% der malignen humanen Thyreozyten trat unter Einfluss von Troglitazon eine Apoptose ein. Dieser Zelltod steht im Widerspruch zu der oben genannten ungehemmten Thymidinaufnahme der entsprechenden Thyreozyten. Dieses ambivalente Verhalten unter Troglitazon lässt vermuten, dass das von der Tumorzelle aufgenommene Thymidin nicht weiterverarbeitet und somit nicht in die DNS eingebaut wurde, sondern im Zytosol liegen blieb.

Die Radioiodaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, die als Modell für nichttransformierte Zellen dienen, erreichte unter Stimulation mit Troglitazon unabhängig von der Retinolkonzentration leicht gesteigerte Einbauraten. 2,4-Thiazolidindion hatte bei retinolfreiem Medium einen stärkeren Effekt als Troglitazon; seine steigernde Wirkung ließ jedoch bei Verwendung von retinolhaltigem Kulturmedium stark nach. Tocopherol steigerte die Iodidaufnahme weniger als Troglitazon oder 2,4-Thiazolidindion; Retinol hatte hierbei keinen additiven Effekt.

Durch die Zugabe von Troglitazon, Tocopherol oder 2,4-Thiazolidindion zu kultivierten Schweinethyreozyten wurde die Thymidinaufnahme in die Zellen in Abhängigkeit von deren Konzentration hochsignifikant gesteigert. Retinol bewirkte hier einen additiven Effekt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ahuja HS., Szanto A., Nagy L., Davies PJ.  
(2004) The retinoid X receptor and its ligands: versatile regulators of metabolic function, cell differentiation and cell death  
J Biol Regul Homeost Agents, 17(1):29-45
- Amann J.N.  
(2002) Untersuchungen an kultivierten Schweinethyreozyten  
Inaug. Dissertation, Universität Tübingen
- Arends MJ., Wyllie AH.  
(1991) Apoptosis: mechanisms and roles in pathology  
Int Rev Exp Pathol, 32:223-254
- Arscott PL., Baker JR.  
(1998) apoptosis and thyroiditis  
Clin Immunol immunopath, 87:207-17
- Baker SJ., Reddy EP.  
(1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily  
Oncogene, 17:3261-3270
- Bennett SM., Agrawal A., Elasha H., Heise M., Jones NP., Walker M., Wilding JP.  
(2004) rosiglitazone improves insulin sensitivity, glucose tolerance and ambulatory blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance  
Diabet Med, 21(5):415-22
- Brauckhoff M., Dorsch K., Hadecke J., Kujat C., Straube F., Krause U., Dralle H.  
(2001) Multinationales Therapiekonzept bei metastasiertem follikularem Schilddrüsenkarzinom mit Hyperthyreose  
Chirurg.; 72 (1): 37-42
- Chung SH., Onoda N., Ishikawa T., Ogisawa K., Takenaka C., Yano Y., Hato F., Hirakawa K.  
(2002) Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Activation Induces Cell Cycle Arrest via the p53-independent Pathway in Human Anaplastic Thyroid Cancer Cells  
Jpn. J. Cancer Res., 93:1358-1365
- Coelho SM., Corbo R., Buescu A., Carvalho DP., Vaisman M.  
(2004) Retinoic acid in patients with radioiodine non-responsive thyroid carcinoma.  
J Endocrinol Invest.; 27 (4): 334-9

- Corton JC., Anderson SP., Stauber A.  
(2000) Central role of peroxisome proliferator-activated receptors in the actions of peroxisome proliferators  
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicology, 40:491-518
- Debril MB., Renaud JP.  
(2001) The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
J Mol Med, 79:30-47
- Delorme N., Remond C., Sartelet E., Clement C., Schneider C., Bellon G., Virino A., Haye B., Martiny L.  
(2002) TGFbeta1 effects on functional activity of porcine thyroid cells cultured in suspension  
J Endocrinol.; 173 (2): 345-55
- Dohan O., Baloch Z., Banrevi Z., Livolsi V., Carrasco N.  
(2001) Predominant Intracellular Overexpression of the NIS in a Large Sampling of Thyroid Cancer Cases  
J Clin Endocrinol & Metabol, 86(6):2697-2701
- Ehrmann J. Jr, Vavrusova N, Collan Y., Kolai Z.  
(2002) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease  
Biomed. Papers, 146(2):11-14
- Everett L., Galli A., Crabb D.,  
(2000) The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease  
Liver, 20:191-199
- 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
- Fujiwara, T., Horikoshi, H.  
(2000) Troglitazone and related compounds: therapeutic potential beyond diabetes  
Life-sciences, 67(20):2405-16
- Gratzl, M., Junqueira L. C., Carneiro, J., Kelley, R. O.  
(2002) Zellkern  
Histologie, 21-34

- Grüning T., Tiepolt C., Zöphel K., Bredow J., Kropp J., Franke WG.  
 (2003) Retinoic acid for redifferentiation of thyroid cancer- does it hold its promise?  
 European Journal of Endocrinology, 148:395-402
- Haldemann AR  
 (1999) The basis for radioiodine therapy in differentiated thyroid cancer  
 Revue-therapeutique, 56(7):403-7
- Havekes, B., Schröder van der Elst, J.P., van der Pluijm, G., Goslings, B.M., Morreau, J., Romijn, J.A., Smit, J.W.A.  
 (2000) Beneficial effects of retinoic acid on extracellular matrix degradation and attachment behaviour in follicular thyroid carcinoma cell lines  
 Journal of endocrinology, 229-238
- Heaney AP., Fernando M., Melmed S.  
 (2003) PPAR $\gamma$  receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas  
 J Clin. Invest., 111(6): 1381-1388
- Hensley K., Benaksas EJ., Bolli R., Comp P., Grammas P., Hamdheydari L., Mou S., Pye QN., Stoddard MF., Wallis G., Williamson KS., West M., Wechter WJ., Floyd RA.  
 (2004) New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxylthylhydroxychroman metabolites in biology and medicine  
 Free Radic Biol Med., 36(1):1-15
- Hernandez R., Teruel T., Lorenzo M.  
 (2003) Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes  
 Diabetologia, 46(12):1618-28
- Janka H. U.  
 (4.2001) Glitazone, Der Internist, Springer Verlag, 587-596
- Jetten, A.M., Jetten M.R., Shapiro, S., Poon, J.  
 (1979) Characterization of the action of retinoids in mouse fibroblast cell lines  
 Exp. Cell. Res., 119:289-299
- Kang JH., Shi YM., Zheng RL.  
 (20009 Effects of ascorbic acid and DL-alpha-Tocopherol on human hepatoma cell proliferation and redifferentiation  
 Acta Pharmacol Sin., 21(4):348-52

- Kawa S., Nikaido T., Unno H., Usada N., Nakayama K., Kiyosawa K.  
(2002) Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone.  
*Pancreas*, 24(1):1-7
- Kersten S., Desvergne B., Wahli W.  
(2000) Roles of PPARs in health and disease  
*Nature*, 405:421-424
- Kiess W., Gallaher B.  
(1998) Hormonal control of programmed cell death/ apoptosis  
*Eur J Endocrinol.*, 138(5):482-91
- Klutmann S., Jenicke L., Geiss-Tonshoff M., Bohuslavizki KH., Wester J., Clausen M.  
(2001) Prevalence of iodine- and thyroglobin-negative findings in differentiated thyroid cancer.  
*Nuclearmedizin*, 40(5):143-47
- Kucharova, S., Farkas, R.  
(2002) Hormone nuclear receptors and their ligands: role in programmed cell death  
*Endocrine Regulations*, 36:37-60
- Kumar A., Bal CS.  
(2003) Differentiated thyroid cancer  
*Indian J Pediatr.*; 70 (9): 707-13
- Kumar R, Thompson EB  
(1999) The structure of the nuclear hormone receptors  
*Steroids*, 64:310-19
- Li AC., Brown KK., Silvestre MJ., Willson TM., Palinski W., Glass CK  
(2001) Effects of PPAR gamma ligands on atherosclerosis  
*Quiagen News*, 1:14-16
- Lippman SM., Lotan R.  
(2000) Advances in the development of retinoids as chemopreventive agents  
*J. Nutr.*, 130:479S-482S
- Mackenzie EJ., Mortimer RH.  
(2004) Thyroid nodules and thyroid cancer  
*Med J Aust.*; 180(12):654-5

- Mano T., Iwase K., Hayashi R., Hayakawa N., Uchimura K., Makino M., Nagata M., Sawai Y., Oda N., Hamada M., Aono T., Nakai A., Nagasaka A., Itoh M.  
(1998) Vitamin E and coenzyme Q concentrations in the thyroid tissues of patients with various thyroid disorders  
*Am J Med Sci.*, 315(4):230-32
- Meller, D.  
(2002) Untersuchungen an kultivierten Schweinethyreozyten  
Inaug. Dissertation , Universität Tübingen
- Meydani SN., Meydani M., Blumberg JB., Leka LS., Pedrosa M., Diamond R., Schaefer EJ.  
(1998) Assessment of the safety of supplementation with different amounts of vitamin E in healthy older adults  
*Am J Clin Nutr.*, 68(2):311-18
- Milas, L., Stephens, LS., Meyn, RE.  
(1994) Relation of apoptosis to cancer therapy  
*In Vivo*; 8:665-73
- Miller RT., Anderson SP, Corton JC., Cattley RC  
(2000) Apoptosis, mitosis and cyclophilin-40 expression in regressing peroxisome proliferator-induced adenomas  
*Carcinogenesis*, 21:647-52
- Morley JE., Melmed S., Reed A., Kasson BG., Levin SR., Pekary AE., Hershman JM.  
(1980) Effekt of Vitamin A on the hypothalamo-pituitary-thyroid axis  
*Am J Physiol*, 238(2):E174-179
- Mukherjee R., Davies PAJ., Crombie DL. Et al.  
(1997) Sensitization of diabetic and obese mice to insulin by retinoid x receptor agonists  
*Nature*, 386:407-410
- Murphy GJ., Holder JC.,  
(2000) PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer  
*Trends Pharmacol. Sci.*, 21:469-474
- Namba, H., Yamashita, S., Kimura, H., Yokoyama, N., Izumi, M., Nagataki, S.  
(1993) Overexpression of the Intact Thyrotropin Receptor in a Human Thyroid Carcinoma Cell Line  
*Endocrinology*, 839-45

- Nasu, M., Sugawara, M.  
(1993) Ethanol has thyrtropin-like activity in cultured porcine thyroid follikles  
Endocrinology, 132(1):155-160
- Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci MC., Grignani F., Riccardi C.  
(1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry  
J Immunol Methods., 139(2):271-9
- Ohta K., Endo T., Haraguchi K., Hershman JM., Onaya T.  
(2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells.  
J Clin. Endocrinol. Metab., 86(5):2170-2177
- Okura T., Nakamura M., Takata Y., Watanabe S., Kitami Y., Hiwada K.  
(2000) Troglitazone induces apoptosis via the p53 and Gadd45 pathway in vascular smooth muscle cells  
European Journal of Pharmacology, 407(3):227-235
- Park JW., Wong MG., Lobo M., Hyun WC., Duh QY., Clark OH.  
(2003) Modulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by chemotherapy in thyroid cancer cell lines.  
Thyroid, 13(12):1103-1110
- Pemrick, S.M., Lucas, D.A., Grippo, J.F.  
(1994) The retinoid receptors  
Leukemia 8 Suppl 3, 1-10
- Pschyrembel  
(1994) Medizinisches Wörterbuch  
Walter de Gruyter Verlag, 257. Aufl.:1544; 1641
- Reinwein D., Benker G.  
(1996) Endokrinologie und Stoffwechsel,  
Thieme Verlag, 159
- Roberts-Thompson SJ.  
(2000) Peroxisome proliferator-activated receptors in tumorigenesis: targets of tumour promotion and treatment  
Immunol. Cell Biol., 78:436-441
- Römpp  
(1995) CD Chemie Lexikon - Version 1,0, Stuttgart/ NY,  
Georg Thieme Verlag

- Samid D., Wells M., Greene ME., Shen W., Palmer CNA., Thibault A.  
(2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a novel target in cancer therapy: binding and activation by an aromatic fatty acid with clinical antitumor activity  
Clin.Cancer Res, 6:933-941
- Scherübl H., Raue F., Georgi P., Ziegler R.  
(1989) Hyperthyreose durch ein hormonproduzierendes follikuläres Schilddrüsenkarzinom  
Klinische Wochenschrift 67  
Springer Verlag, 304-307
- Schmutzler C., Schmitt T.L., Glasre F., Loos U., Kohrle J.  
(2002) The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid  
Molecular-and-cellular endocrinology, 189(1-2):145-155
- Schmutzler C.  
(2001) Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids  
Exp Clin Endocrinol Diabetes, 109(1):41-44
- Schmutzler C., Kohrle 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 transformed FRTL-5 rat thyroid cells  
Biochem Biophys Res Commun; 246(2):562
- Schreck R., Schnieders F., Schmutzler C., Köhrle J.  
(1994) Retinoids stimulate type I 5-deiodase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines  
Journal of Clinical Endocrinol Metab, 79:791-798
- del Senno L., Rossi R., Gandini D., Piva R., Franceschetti P.  
(1993) Retinoic acid-induced decrease of DNA synthesis and peroxidase mRNA levels in human thyroid cells expressing retinoic acid receptor alpha mRNA  
Life Science, 53:1039-1048
- Shen Q., Cline GW., shulman GI., Leibowitz MD., Davies PJ.  
(2004) Effects of rexinoids on glucose transport and insulin-mediated signalling in skeletal muscles of diabetic (db/db) mice  
Biol Chem, 279(19):19721-31

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

(2002) Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study  
European Journal of Nuclear Medicine, 29(6):775-782

Simon, D., Koehrle, J., Reiners, C., Boerner, A.R., Schmutzler, C., Mainz, K., Goretzki, P.E., Roehrer, H.D.

(1998) Redifferentiation Therapy with Retinoids: Therapeutic Option for Advanced Follicular and Papillary Thyroid Carcinoma  
World J Surg, 22(6):569-574

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

(2002) Iodide kinetics and experimental (131)I therapy in a xenotransplanted human sodium-iodide symporter-transfected human follicular thyroid carcinoma cell line  
The Journal of clinical endocrinology and metabolism, 1247-53

Smith MA., Parkinson DR., Cheson BD., Friedman MA.

(1992) Retinoids in cancer therapy  
J Clin. Oncol.; 10(5): 839-64

Spitzweg, C., Heufelder, A., Morris, J.

(2000) Thyroid Iodine Transport  
Thyroid, 4:321-330

Tanosaki S., Ikezoe T., Heaney A., Said JW., Dan K., Akashi M., Koeffler HP.

(2003) Effect of ligands of nuclear hormone receptors on sodium/iodide symporter expression and activity in breast cancer cells  
Breast Cancer Res Treat., 79(3):335-45

Trouttet-Masson S., Selmi-Ruby S., Bernier-Valentin F., Porra V., Berger-Dutrieux, N., Decaussin, M., Peix JL, Perrin A., Bournaud C., Orgiazzi J., Borson-Chazot F., Franc B., Rousset B.

(2004) Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodid symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors  
American journal of pathology, 165(1):25-34

Vazquez, M., Silvestre JS., Prous JR,

(2002) Experimental approaches to study PPAR gamma agonists as antidiabetic drugs  
Clin. Pharmacology, 24(8): 515-23

Verspohl E. J. , Weiland F.

(2002) Insulinsensitizer,  
Pharmazie in unserer Zeit, 280-292

Wahl R.

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

Yamasaki, H., PhD, Bretz, J. D., PhD, Arscott, P.L., BS, Baker, J. R., Jr, MD

(2000) Apoptosis and the thyroid: the biology and potential  
implications for thyroid disease  
Endocrinology & Diabetes, 7:260-264

## 8. Anhang

### 8.1 Statistik-Tabellen

**Tab. 1** zu Abb. 1.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in humane Thyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	2 h	16h	40h	64h	88h
Stimulation					
Kontrolle	347,8	2454,1	394,0	355,5	521,1
SD	150,9	845,3	63,5	65,3	340,8
SEM	75,4	422,6	31,7	32,7	170,4
TSH 1,3 mU/ml	396,4	2395,8	464,5	400,8	612,3
SD	30,2	975,6	86,5	72,8	125,8
SEM	15,1	487,8	43,2	36,4	62,9
Signifikant					
DMSO	326,7	1629,3	404,6	336,9	407,9
SD	71,5	469,6	142,7	60,5	202,5
SEM	35,7	234,8	71,4	30,2	101,3
Signifikant					
Troglitazon 2,5 $\mu\text{M}$	261,4	1009,3	306,4	177,8	233,9
SD	143,8	406,4	143,5	45,1	136,0
SEM	71,9	203,2	71,7	22,5	68
Signifikant					
Troglitazon 5 $\mu\text{M}$	877,0	3489,7	541,1	988,7	912,4
SD	380,5	841,7	128,5	297,9	113,2
SEM	190,3	420,9	64,3	148,9	56,6
Signifikant	2,5	1,4		2,7	1,7
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	633,7	1994,7	804,2	500,0	632,1
SD	70,9	104,2	146,8	231,7	61,3
SEM	35,5	52,1	73,4	115,9	30,7
Signifikant	1,8		2	1,4	
Tocopherol 0,1 $\mu\text{M}$	584,4	1887,5	614,0	412,2	580,6
SD	120,5	615,2	156,0	109,2	82,4
SEM	60,3	307,6	78,0	54,6	41,2
Signifikant	1,6		1,5		
Tocopherol 10 $\mu\text{M}$	659,2	622,7	270,4	1367,6	386,9
SD	105,2	90,6	61,6	284,2	123,8
SEM	52,6	45,3	30,8	142,1	61,9

Signifikant	1,8			3,8	
-------------	-----	--	--	-----	--

**Tab. 2** zu Abb. 2.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in humane Thyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	2 h	16h	40h	64h	88h
Stimulation					
Kontrolle	802,5	298,5	307,5	372,8	467,6
SD	390,1	47,1	101,0	30,7	297,2
SEM	195	23,6	50,5	15,3	148,6
TSH 1,3 mU/ml	743,0	254,3	400,2	336,5	524,0
SD	297,0	75,5	105,8	50,1	72,1
SEM	148,5	37,7	52,9	25,1	36
Signifikant					
DMSO	549,7	264,3	246,9	211,0	443,6
SD	171,2	52,5	25,8	47,5	215,7
SEM	85,6	26,2	12,9	23,8	107,9
Signifikant					
Troglitazon 2,5 $\mu\text{M}$	348,2	243,8	133,2	181,6	296,8
SD	94,7	68,2	44,3	84,3	111,2
SEM	47,3	34,1	22,2	42,2	55,6
Signifikant					
Troglitazon 5 $\mu\text{M}$	1789,8	651,7	718,2	702,4	1256,9
SD	182,5	191,0	174,2	253,0	364,1
SEM	91,3	95,5	87,1	126,5	182,1
Signifikant	2,2	2,1	2,3	1,8	2,6
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	1068,0	578,7	383,5	517,6	925,1
SD	388,3	124,7	28,9	104,8	28,1
SEM	194,2	62,4	14,5	52,4	14,0
Signifikant		1,9			1,9
Tocopherol 0,1 $\mu\text{M}$	934,5	399,8	253,5	607,2	791,6
SD	340,9	23,6	70,3	311,1	72,0
SEM	170,4	11,8	35,1	155,5	36,0
Signifikant				1,6	1,7
Tocopherol 10 $\mu\text{M}$	542,2	785,9	1131,2	440,9	465,6
SD	192,0	333,4	495,3	144,7	65,5
SEM	96,0	166,7	247,7	72,4	32,7
Signifikant		2,6	3,6		

**Tab. 3** zu Abb. 3.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in humane Thyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	2 h	16h	40h	64h	88h
Stimulation					
Kontrolle	577,2	977,2	1014,1	410,6	547,1
SD	127,7	915,1	542,4	82,7	211,3
SEM	63,9	457,6	271,2	41,3	105,6
TSH 1,3 mU/ml	577,2	679,6	1661,0	320,4	497,8
SD	127,7	216,3	825,1	53,4	163,8
SEM	63,9	108,2	412,5	26,7	81,9
Signifikant			1,6		
DMSO	277,0	378,5	1073,2	356,0	510,0
SD	48,0	127,1	401,7	74,9	178,4
SEM	24	63,6	200,9	37,5	89,2
Signifikant					
Troglitazon 2,5 $\mu\text{M}$	319,5	338,8	771,2	379,5	372,0
SD	110,6	175,0	334,5	174,7	117,5
SEM	55,3	87,5	167,2	87,3	58,8
Signifikant					
Troglitazon 5 $\mu\text{M}$	1268,7	1514,6	2715,9	741,3	1557,2
SD	616,7	267,8	718,0	195,8	517,3
SEM	308,4	133,9	359,0	97,9	258,6
Signifikant	2,1	1,5	2,6	1,8	2,8
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	628,5	803,2	1783,9	591,1	744,2
SD	67,0	124,9	465,1	147,7	228,7
SEM	33,5	62,4	232,6	73,9	114,4
Signifikant			1,7	1,4	1,3
Tocopherol 0,1 $\mu\text{M}$	583,2	565,0	1822,8	539,3	834,7
SD	220,2	44,7	304,5	117,3	114,8
SEM	110,1	22,3	152,2	58,6	57,4
Signifikant			1,7		1,5
Tocopherol 10 $\mu\text{M}$	1132,7	949,7	457,1	2214,2	1021,5
SD	108,5	110,7	138,0	119,9	307,4
SEM	54,3	55,4	69,0	60,0	153,7
Signifikant	1,9			5,4	1,8

**Tab. 4** zu Abb. 4.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in humane Thyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	347,8	2454,1	394,0	355,5	521,1
SD	150,9	845,3	63,5	65,3	340,8
SEM	75,4	422,6	31,7	32,7	170,4
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	734,1	623,7	428,4	1341,2	350,6
SD	283,3	104,9	56,4	228,7	84,1
SEM	141,6	52,5	28,2	114,4	42
Signifikant	2,1			3,7	
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	640,0	295,3	326,3	1055,7	271,5
SD	77,3	33,9	122,6	246,8	53,5
SEM	38,6	17	61,3	123,4	26,7
Signifikant	1,8			3	
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	638,8	322,5	348,2	1336,3	367,2
SD	354,5	119,9	113,5	549,2	162,8
SEM	177,2	59,9	56,8	274,6	81,4
Signifikant	1,8			3,7	
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	588,0	265,2	313,6	1346,1	294,8
SD	190,3	83,0	171,9	359,0	103,3
SEM	95,1	41,5	85,9	179,5	51,6
Signifikant	1,7			3,7	
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	605,1	186,1	273,2	1284,5	199,4
SD	169,9	45,4	148,3	668,2	101,5
SEM	84,9	22,7	74,1	334,1	50,8
Signifikant	1,7			3,6	

**Tab. 5** zu Abb. 5.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in humane Thyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	802,5	298,5	307,5	372,8	467,6
SD	390,1	47,1	101,0	30,7	297,2
SEM	195	23,6	50,5	15,3	148,6
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	354,3	844,4	910,0	415,6	349,9
SD	19,9	342,3	209,1	138,8	124,1
SEM	10	171,1	104,6	69,4	62,1
Signifikant		2,8	3		
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	290,9	664,9	621,9	348,1	328,8
SD	174,1	136,7	156,3	91,2	208,4
SEM	87	68,4	78,2	45,6	104,2
Signifikant		2,2	2		
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	579,9	778,4	557,6	449,8	405,3
SD	580,7	50,5	75,0	83,1	241,0
SEM	290,3	25,3	37,5	41,6	120,5
Signifikant		2,6	1,8		
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	241,1	466,3	391,5	325,3	376,4
SD	56,5	229,1	110,1	131,5	178,7
SEM	28,2	114,5	55,1	65,7	89,4
Signifikant		1,5			
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	595,7	344,7	299,9	232,6	244,4
SD	274,0	112,1	95,0	60,8	108,4
SEM	137,0	56,1	47,5	30,4	54,2
Signifikant					

**Tab. 6** zu Abb.6.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in humane Thyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	577,2	977,2	1014,1	410,6	547,1
SD	127,7	915,1	542,4	82,7	211,3
SEM	63,9	457,6	271,2	41,3	105,6
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	1152,6	568,4	647,6	1370,6	809,5
SD	142,4	79,5	141,7	203,6	312,4
SEM	71,2	39,8	70,9	101,8	156,2
Signifikant	2			3,3	1,4
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	983,3	438,5	546,3	1440,6	771,8
SD	87,6	106,0	146,1	397,9	217,1
SEM	43,8	53	73	199	108,6
Signifikant	1,7			3,5	1,4
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	826,7	335,0	439,5	969,4	516,2
SD	123,2	126,7	136,8	427,9	137,8
SEM	61,6	63,4	68,4	214	68,9
Signifikant	1,4			2,3	
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	674,6	392,0	410,3	1032,1	609,5
SD	61,1	68,3	86,2	208,5	339,0
SEM	30,5	34,2	43,1	104,3	169,5
Signifikant				2,5	
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	511,1	267,0	426,4	691,6	382,3
SD	80,5	69,8	61,4	219,7	99,8
SEM	40,3	34,9	30,7	109,9	49,9
Signifikant				1,6	

**Tab. 7** zu Abb. 7.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in humane Thyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM), n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	5170,5	70516,4	64239,6	45898,5	39160,0
SD	3006,9	28954,0	48287,9	10190,9	25301,7
SEM	1503,5	14477	24143,9	5095,4	12650,9
TSH 1,3 mU/ml	9409,7	92168,2	89873,9	45743,7	69441,0
SD	5139,2	25644,7	29514,6	10032,8	12865,6
SEM	2569,6	12822,3	14757,3	5016,4	6432,8
Signifikant	1,8		1,4		1,7
DMSO	3386,3	55288,9	61250,3	33391,8	69559,1
SD	1268,5	4014,6	13816,8	4522,4	6613,5
SEM	634,3	2007,3	6908,4	2261,2	3306,8
Signifikant	0,6	0,7			1,7
Troglitazon 0,1 $\mu\text{M}$	7610,6	61472,0	69842,2	46266,8	71012,0
SD	5059,3	23134,1	28090,0	16407,4	23240,9
SEM	2529,6	11567	14045	8203,7	11620,4
Signifikant	1,4				1,8
Troglitazon 1 $\mu\text{M}$	10684,0	60298,6	84056,7	58884,6	71551,0
SD	4611,4	12280,7	26212,3	14090,8	8679,9
SEM	2305,7	6140,3	13106,2	7045,4	4340,0
Signifikant	2				1,8
Troglitazon 2,5 $\mu\text{M}$	7017,3	33775,4	58706,7	50912,6	64418,9
SD	4751,9	15264,7	27747,1	19059,4	15086,6
SEM	2376,0	7632,4	13873,6	9529,7	7543,3
Signifikant		0,4			1,6
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	3914,6	58642,0	60656,6	39842,7	60617,1
SD	530,9	25484,7	32113,4	5716,5	2744,9
SEM	265,4	12742,4	16056,7	2858,3	1372,5
Signifikant					1,5
Tocopherol 0,1 $\mu\text{M}$	5359,3	39641,5	51425,8	39065,2	58406,4
SD	5072,6	26854,4	40727,7	19117,9	19554,6
SEM	2536,3	13427,2	20363,9	9558,9	9777,3
Signifikant		0,5			1,5
Tocopherol 1 $\mu\text{M}$	4096,5	44276,9	40839,0	35184,8	46727,1
SD	3230,7	39768,6	15787,2	15022,8	17411,6

SEM	1615,4	19884,3	7893,6	7511,4	8705,8
Signifikant		0,6	0,6		
Tocopherol 2,5µM	5270,8	32451,0	32544,9	47119,8	58537,3
SD	3486,2	20223,3	11989,6	17132,4	17344,4
SEM	1743,1	10111,7	5994,8	8566,2	8672,2
Signifikant		0,4	0,5		1,5
Tocopherol 10µM	12954,3	84145,4	83712,2	38389,8	60798,0
SD	3904,6	50667,4	20784,6	24524,1	8765,2
SEM	1952,3	25333,7	10392,3	12262,1	4382,6
Signifikant	2,5				1,5

**Tab. 8** zu Abb. 8. <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in humane Thyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant (p<0,05) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	2 h	16h	40h	64h	88h
Stimulation					
Kontrolle	4591,5	56766,0	100996,1	43621,6	40666,1
SD	3114,5	37599,8	35207,3	8792,9	27978,3
SEM	1557,2	18799,9	17603,6	4396,4	13989
TSH 1,3 mU/ml	8678,1	97807,2	99142,7	59798,4	49405,2
SD	2968,4	19665,3	25130,8	19003,6	5888,4
SEM	1484,2	9832,6	12565,4	9501,8	2944,2
Signifikant	1,8	1,7			
DMSO	4899,1	78264,4	70735,0	59329,0	53700,4
SD	75,0	6228,8	15419,9	5930,0	6905,8
SEM	37,5	3114,4	7710	2965	3452,9
Signifikant			0,7		
Troglitazon 0,1µM	7534,0	95752,9	78854,1	63117,4	61432,9
SD	3931,0	41406,3	41184,3	23850,6	15965,2
SEM	1965,5	20703,1	20592,2	11925	7982,6
Signifikant	1,6	1,6		1,4	1,5
Troglitazon 1µM	8829,8	112781,4	79520,0	75666,3	70680,4
SD	2329,4	24651,6	26558,1	18331,3	12523,4
SEM	1164,7	12325,8	13279,0	9165,7	6261,7
Signifikant	1,9	1,9		1,7	1,7
Troglitazon 2,5µM	8285,0	81158,1	63871,1	64550,8	63527,3
SD	2335,9	23732,3	21047,0	18423,6	8053,0

SEM	1168,0	11866,2	10523,5	9211,8	4026,5
Signifikant	1,8	1,4	0,6	1,4	1,5
Troglitazon 10µM	6021,9	82873,4	105952,1	64357,5	52142,5
SD	1102,4	14181,7	7667,4	5174,7	5902,9
SEM	551,2	7090,9	3833,7	2587,4	2951,5
Signifikant		1,4		1,4	
Tocopherol 0,1µM	5999,5	73176,3	69608,2	57069,4	55389,6
SD	3083,9	21857,0	27887,7	22579,9	15258,0
SEM	1541,9	10928,5	13943,8	11289,9	7629,0
Signifikant					
Tocopherol 1µM	5247,7	70285,0	50403,5	50883,4	49461,2
SD	2889,4	23652,7	21038,2	15777,9	7694,8
SEM	1444,7	11826,4	10519,1	7888,9	3847,4
Signifikant			0,5		
Tocopherol 2,5µM	6485,1	86742,6	54201,2	71535,2	57216,1
SD	2426,2	17979,7	9932,0	16531,3	5707,7
SEM	1213,1	8989,9	4966,0	8265,7	2853,9
Signifikant	1,4	1,5	0,5	1,6	1,4
Tocopherol 10µM	7266,9	90431,1	83560,7	40164,3	57592,4
SD	3857,7	25237,0	51562,3	8575,4	11625,2
SEM	1928,9	12618,5	25781,1	4287,7	5812,6
Signifikant	1,5	1,6			1,4

**Tab. 9** zu Abb. 9. <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in humane Thyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant (p<0,05) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	2 h	16h	40h	64h	88h
Stimulation					
Kontrolle	9384,5	89489,8	75450,1	46204,5	30022,4
SD	4052,6	29454,1	29619,4	17999,3	20280,7
SEM	2026,3	14727	14810	8999,6	10140
TSH 1,3 mU/ml	10057,6	93138,0	80734,6	52883,4	47825,1
SD	4369,2	20276,2	26593,7	10892,5	8409,7

SEM	2184,6	10138	13297	5446,2	4204,8
Signifikant					1,6
DMSO	4879,9	67621,4	44542,5	40713,7	41501,8
SD	815,6	3567,6	7763,2	3580,0	1959,6
SEM	407,8	1783,8	3881,6	1790	979,8
Signifikant	0,5		0,6		
Troglitazon 0,1µM	8056,1	69208,0	69156,5	58188,6	55156,4
SD	4613,3	35459,5	39124,1	20954,6	16251,4
SEM	2306,6	17730	19562	10477	8125,7
Signifikant					1,8
Troglitazon 1µM	11358,7	67924,6	73676,7	67637,5	59311,6
SD	2518,6	27737,1	26492,0	12463,3	14089,0
SEM	1259,3	13868,6	13246,0	6231,6	7044,5
Signifikant				1,4	1,9
Troglitazon 2,5µM	9059,2	49142,5	49832,1	58054,0	57909,1
SD	4659,1	28419,8	20043,9	13279,6	10103,5
SEM	2329,6	14209,9	10021,9	6639,8	5051,7
Signifikant		0,5	0,6		1,9
Troglitazon 10µM	10240,7	86710,0	64510,3	49534,6	46213,9
SD	2243,8	7507,2	9416,3	11111,1	6712,7
SEM	1121,9	3753,6	4708,2	5555,5	3356,4
Signifikant					1,5
Tocopherol 0,1µM	8190,4	64666,4	63099,8	52458,8	54659,4
SD	5863,3	22267,2	26403,4	20228,3	19084,1
SEM	2931,6	11133,6	13201,7	10114,2	9542,0
Signifikant					1,8
Tocopherol 1µM	6861,4	36408,8	40578,2	53837,8	48656,6
SD	5375,7	18219,4	20680,9	17822,1	16460,9
SEM	2687,8	9109,7	10340,4	8911,0	8230,5
Signifikant		0,4	0,5		1,6
Tocopherol 2,5µM	11147,4	44927,1	53383,1	68972,6	59540,6
SD	2770,1	16135,5	18834,3	15495,3	12881,3
SEM	1385,1	8067,8	9417,2	7747,6	6440,6
Signifikant		0,5		1,5	1,9
Tocopherol 10µM	7471,6	60430,9	62126,1	54468,7	48689,3
SD	3145,3	33346,0	40093,9	27328,8	8292,0
SEM	1572,6	16673,0	20047,0	13664,4	4146,0
Signifikant		0,6			1,6

**Tab. 10** zu Abb. 10.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in humane Thyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	5170,5	70516,4	64239,6	45898,5	39160,0
SD	3006,9	28954,0	48287,9	10190,9	25301,7
SEM	1503,5	14477	24143,9	5095,4	12651
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	14329,2	98423,9	111763,1	60193,5	61100,8
SD	4207,7	22289,3	23585,9	14710,0	8940,5
SEM	2103,8	11145	11792,9	7355	4470,2
Signifikant	2,7	1,3	1,7		1,5
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	9593,2	67363,8	83703,1	61752,9	53772,7
SD	2068,8	13346,2	21607,4	19455,4	596,5
SEM	1034,4	6673,1	10803,7	9727,7	298,3
Signifikant	1,8				
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	11723,3	75430,2	93732,3	60193,5	62294,7
SD	4744,2	35089,2	36558,5	14710,0	16025,2
SEM	2372,1	17545	18279,3	7355	8012,6
Signifikant	2,2		1,4		1,6
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	13349,0	82022,4	109029,7	65838,5	62294,9
SD	5449,1	36966,1	22817,6	13612,3	12960,9
SEM	2724,6	18483,1	11408,8	6806,1	6480,5
Signifikant			1,7	1,4	1,6
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	9914,8	51375,6	96704,2	48793,8	60968,0
SD	4305,9	35996,1	33532,8	19718,9	13848,4
SEM	2152,9	17998,0	16766,4	9859,4	6924,2
Signifikant	1,9		1,5		1,5

**Tab. 11** zu Abb. 11.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in humane Thyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	4591,5	56766,0	100996,1	43621,6	40666,1
SD	3114,5	37599,8	35207,3	8792,9	27978,3
SEM	1557,2	18799,9	50498	21811	20333
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	10235,3	114813,3	105342,0	51549,8	72069,3
SD	3423,6	14342,2	31841,6	18060,7	9401,3
SEM	1711,8	7171,1	15920,8	9030,4	4700,7
Signifikant	2,2	2			1,7
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	8327,0	94096,5	55498,6	36859,2	58048,0
SD	2099,1	7377,2	7315,3	5556,2	3942,1
SEM	1049,5	3688,6	3657,6	2778,1	1971
Signifikant	1,8	1,6	0,5		1,4
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	8959,6	85883,9	55498,6	52430,8	73136,6
SD	4398,0	36604,6	7315,3	15354,0	16537,1
SEM	2199	18302,3	3657,6	7677	8268,6
Signifikant	1,9	1,5	0,5		1,8
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	12004,7	105774,9	84693,4	58426,7	83076,7
SD	2899,4	22277,4	33526,8	10366,2	9936,4
SEM	1449,7	11138,7	16763,4	5183,1	4968,2
Signifikant	2,6	1,8			2
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	10639,1	68440,6	60551,0	58426,7	75699,9
SD	4089,8	36503,4	27474,9	10366,2	10776,8
SEM	2044,9	18251,7	13737,5	5183,1	5388,4
Signifikant	2,3		0,6		1,8

**Tab. 12** zu Abb. 12.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in humane Thyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	9384,5	89489,8	75450,1	46204,5	30022,4
SD	4052,6	29454,1	29619,4	17999,3	20280,7
SEM	2026,3	14727	14810	8999,6	10140
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	9760,9	79624,8	69458,1	53892,6	66845,1
SD	341,9	6162,4	25658,9	3452,8	10493,1
SEM	171	3081,2	12829	1726,4	5246,6
Signifikant					2,2
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	7704,7	56091,5	81938,7	43600,5	59926,7
SD	2752,2	26388,3	69592,0	19882,0	17358,0
SEM	1376,1	13194	34796	9941	8679
Signifikant		0,6			2
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	5696,9	41203,0	54861,7	42063,3	56164,6
SD	2520,4	22312,1	38273,2	12466,5	13741,2
SEM	1260,2	11156	19137	6233,3	6870,6
Signifikant	0,6	0,4			1,8
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	7213,5	42319,5	60720,1	56185,5	63228,3
SD	1837,1	17952,6	26956,5	14098,1	8140,3
SEM	918,5	8976,3	13478,3	7049,1	4070,1
Signifikant		0,4			2,1
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	6794,4	25229,9	44100,1	48972,3	54453,4
SD	3409,4	12443,5	23026,3	19741,9	22236,6
SEM	1704,7	6221,8	11513,2	9870,9	11118,3
Signifikant		0,3	0,6		1,8

**Tab. 13** zu Abb. 13.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1369,5	2862,0	1742,9	1272,9	954,6
SD	163,7	275,9	420,2	325,9	215,8
SEM	81,9	138	210,1	163	107,9
TSH 1,3 mU/ml	1706,8	2788,8	1860,0	1592,3	1682,6
SD	541,9	409,1	551,0	20,0	199,3
SEM	271	204,5	275,5	10	99,7
Signifikant					1,7
DMSO	1240,9	2857,1	1822,7	1295,0	1170,1
SD	121,7	195,2	362,5	180,7	343,4
SEM	60,9	97,6	181,3	90,4	171,7
Signifikant					
Troglitazon 0,1 $\mu\text{M}$	1381,9	2740,3	1807,0	1440,8	1428,6
SD	202,6	739,4	302,9	92,4	297,4
SEM	101,3	369,7	151,5	46,2	148,7
Signifikant					1,5
Troglitazon 1 $\mu\text{M}$	1252,9	2406,5	1439,5	1220,4	1292,4
SD	243,4	228,9	216,6	256,7	239,2
SEM	121,7	114,5	108,3	128,4	119,6
Signifikant					
Troglitazon 5 $\mu\text{M}$	1521,0	3021,5	2361,7	1573,2	1364,3
SD	545,1	274,4	562,9	407,0	428,8
SEM	272,6	137,2	281,5	203,5	214,4
Signifikant					1,4
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	1446,6	2774,2	1634,3	1454,4	1493,4
SD	69,7	355,0	211,5	178,5	204,9
SEM	34,9	177,5	105,7	89,3	102,4
Signifikant					1,5
Tocopherol 1 $\mu\text{M}$	1192,3	1945,1	1394,8	993,7	1389,2
SD	151,1	919,7	340,1	285,1	526,3
SEM	75,5	459,9	170,0	142,5	263,2
Signifikant					1,4
Tocopherol 2,5 $\mu\text{M}$	1096,0	2278,1	1503,8	696,1	1431,1
SD	136,0	92,4	283,1	327,2	220,7
SEM	68,0	46,2	141,6	163,6	110,4
Signifikant					1,5

Tocopherol 5µM	1079,7	2432,7	1674,2	1451,7	1577,3
SD	97,0	181,9	470,1	551,2	312,3
SEM	48,5	91,0	235,0	275,6	156,1
Signifikant					1,6

**Tab. 14** zu Abb. 14.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1776,1	4962,4	2444,5	1783,4	2072,6
SD	352,3	1093,8	791,7	429,2	772,7
SEM	176,2	546,9	395,9	214,6	386,4
TSH 1,3 mU/ml	2011,8	4054,3	3504,4	2367,5	2715,0
SD	348,6	2275,6	852,0	770,7	246,0
SEM	174,3	1137,8	426	385,3	123
Signifikant			1,4		
DMSO	1726,4	6236,2	2443,6	1492,4	3017,9
SD	489,6	468,4	1056,6	112,9	2215,4
SEM	244,8	234,2	528,3	56,4	1107,7
Signifikant					1,4
Troglitazon 0,1µM	1610,8	5185,2	3009,5	3192,1	3008,4
SD	819,5	820,1	1998,9	1019,5	980,3
SEM	409,8	410,1	999,4	509,8	490,1
Signifikant				1,7	1,4
Troglitazon 1µM	1894,3	5645,1	3829,1	2610,2	3399,0
SD	230,6	1455,7	1431,9	836,1	1043,0
SEM	115,3	727,8	716,0	418,1	521,5
Signifikant			1,5	1,4	1,6
Troglitazon 5µM	3429,3	6199,5	3081,7	1873,4	1911,0
SD	682,9	604,5	490,1	420,2	355,8
SEM	341,4	302,2	245,1	210,1	177,9
Signifikant	1,9				

Troglitazon 10µM	3059,0	5598,1	2668,3	2067,2	1890,5
SD	132,5	2544,3	412,4	181,3	477,8
SEM	66,3	1272,1	206,2	90,7	238,9
Signifikant	1,7				
Tocopherol 1µM	2447,7	4993,8	2287,7	1727,4	1782,5
SD	143,2	203,0	524,6	247,2	437,1
SEM	71,6	101,5	262,3	123,6	218,5
Signifikant					
Tocopherol 2,5µM	2556,3	2811,9	2132,2	1850,0	1646,0
SD	471,3	1932,1	331,3	310,8	251,3
SEM	235,6	966,1	165,6	155,4	125,7
Signifikant	1,4				
Tocopherol 5µM	2580,5	5412,2	2057,1	2100,6	1632,4
SD	258,3	1613,7	463,6	471,3	323,2
SEM	129,2	806,9	231,8	235,6	161,6
Signifikant	1,4				

**Tab. 15** zu Abb. 15. <sup>125</sup>I-Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant (p<0,05) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	2 h	16h	40h	64h	88h
Stimulation					
Kontrolle	2009,9	5861,5	2702,3	1921,0	1301,5
SD	208,3	793,7	839,1	541,7	410,0
SEM	104,2	396,8	419,6	270,8	205
TSH 1,3 mU/ml	1890,3	5408,6	3685,8	3006,9	2137,8
SD	225,7	720,2	729,0	717,3	1417,4
SEM	112,8	360,1	364,5	358,6	708,7
Signifikant				1,5	1,6
DMSO	2073,8	4396,2	3293,3	3044,5	1074,4
SD	478,7	549,7	677,6	530,0	593,4
SEM	239,4	274,8	338,8	265	296,7
Signifikant				1,5	

Troglitazon 0,1µM	1919,9	3235,3	3401,0	2087,0	1396,1
SD	387,9	1139,1	1221,8	304,8	472,9
SEM	193,9	569,6	610,9	152,4	236,4
Signifikant					
Troglitazon 1µM	1970,8	4291,6	2624,9	2116,4	2204,7
SD	397,2	460,0	274,2	175,4	576,6
SEM	198,6	230,0	137,1	87,7	288,3
Signifikant					1,7
Troglitazon 5µM	1802,0	6555,3	2974,8	2172,9	1894,9
SD	337,8	376,9	519,8	407,7	354,8
SEM	168,9	188,5	259,9	203,8	177,4
Signifikant					1,4
Troglitazon 10µM	1740,7	5450,9	3294,1	2262,1	3035,8
SD	460,9	574,1	250,8	546,7	732,0
SEM	230,4	287,0	125,4	273,4	366,0
Signifikant					2,3
Tocopherol 1µM	1559,6	4630,7	2875,0	1841,5	2941,1
SD	157,2	1138,4	211,2	506,5	250,0
SEM	78,6	569,2	105,6	253,2	125,0
Signifikant					2,2
Tocopherol 2,5µM	1806,2	4093,6	2844,2	1772,7	2609,0
SD	179,9	292,1	458,2	374,6	1338,8
SEM	89,9	146,1	229,1	187,3	669,4
Signifikant					2
Tocopherol 5µM	1610,7	4653,4	2334,2	1546,6	1994,9
SD	172,8	2109,7	1626,0	103,1	776,4
SEM	86,4	1054,9	813,0	51,5	388,2
Signifikant					1,5

**Tab. 16** zu Abb. 16.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1369,5	2862,0	1742,9	1272,9	954,6
SD	163,7	275,9	420,2	325,9	215,8
SEM	81,9	138	210,1	163	107,9
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	2435,9	4447,5	2152,7	2464,9	1898,3
SD	157,6	649,6	596,7	827,0	1045,0
SEM	78,8	324,8	298,3	413,5	522,5
Signifikant	1,7	1,5		1,9	1,9
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	2099,5	4372,1	1911,6	2262,7	1170,3
SD	106,5	401,3	426,2	1311,7	257,6
SEM	53,3	200,7	213,1	655,8	128,8
Signifikant	1,5	1,5		1,7	
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	2202,6	3577,7	2201,5	2687,5	1417,6
SD	329,9	957,2	854,1	1070,1	503,1
SEM	164,9	478,6	427,1	535	251,6
Signifikant	1,6			2,1	1,4
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	2093,0	3725,6	2213,5	2118,6	1731,7
SD	232,8	547,2	643,1	837,7	605,3
SEM	116,4	273,6	321,6	418,9	302,6
Signifikant	1,5			1,6	1,8
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	1894,9	3696,7	1702,8	2276,6	1277,7
SD	552,1	682,9	198,3	901,5	342,2
SEM	276,1	341,5	99,2	450,7	171,1
Signifikant				1,7	

**Tab. 17** zu Abb. 17.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1776,1	4962,4	2444,5	1783,4	2072,6
SD	352,3	1093,8	791,7	429,2	772,7
SEM	176,2	546,9	395,9	214,6	386,4
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	2116,0	5029,6	3121,7	1644,4	2780,9
SD	325,6	1448,7	732,8	567,0	503,6
SEM	162,8	724,4	366,4	283,5	251,8
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	1771,2	5631,7	3014,8	1255,8	2846,2
SD	94,9	842,0	659,8	487,2	297,7
SEM	47,5	421	329,9	243,6	148,9
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	1995,7	4438,4	2323,2	1364,1	3013,9
SD	793,4	1201,2	627,5	186,6	939,2
SEM	396,7	600,6	313,8	93,3	469,6
Signifikant					1,4
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	1888,7	3643,0	2866,5	1719,2	2592,7
SD	185,4	1554,7	659,3	593,0	390,6
SEM	92,7	777,3	329,6	296,5	195,3
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	1821,7	5119,0	2454,4	1562,2	2129,7
SD	227,2	813,9	483,2	221,3	318,2
SEM	113,6	407,0	241,6	110,7	159,1
Signifikant					

**Tab. 18** zu Abb. 18.  $^{125}\text{I}$ -Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	2009,9	5861,5	2702,3	1921,0	1301,5
SD	208,3	793,7	839,1	541,7	410,0
SEM	104,2	396,8	419,6	270,8	205
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	2447,9	3871,2	3566,9	1915,3	2411,4
SD	113,6	1016,6	1413,3	761,5	1619,9
SEM	56,8	508,3	706,6	380,8	809,9
Signifikant					1,8
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	1848,0	2938,5	3346,3	2503,2	1264,5
SD	196,9	1335,9	986,8	832,9	284,3
SEM	98,4	668	493,4	416,4	142,1
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	1869,0	3329,2	3647,8	1899,7	1677,3
SD	317,5	1331,6	1540,3	157,2	484,2
SEM	158,7	665,8	770,1	78,6	242,1
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	1899,4	3223,0	3526,0	1735,5	1758,5
SD	195,3	1082,8	2070,6	291,8	535,2
SEM	97,7	541,4	1035,3	145,9	267,6
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	2569,3	2832,4	4063,0	1986,9	1693,2
SD	996,1	281,6	1208,9	1008,1	411,1
SEM	498,1	140,8	604,5	504,1	205,6
Signifikant			1,5		

**Tab. 19** zu Abb. 19.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1125,4	2202,3	815,4	2274,8	1247,6
SD	531,6	763,5	302,1	509,2	224,6
SEM	265,8	381,7	151,1	254,6	112,3
TSH 1,3 mU/ml	852,0	1828,1	674,0	2353,2	1101,8
SD	197,2	323,3	356,3	189,3	225,2
SEM	98,6	161,7	178,2	94,6	112,6
Signifikant					
DMSO	813,5	1605,2	681,5	1498,3	1028,6
SD	272,8	183,5	132,5	631,2	206,3
SEM	136,4	91,7	66,3	315,6	103,2
Signifikant				0,6	
Troglitazon 5 $\mu\text{M}$	2545,3	2419,9	2008,6	3399,3	3231,3
SD	359,6	278,7	430,9	1018,3	1258,9
SEM	179,8	139,4	215,4	509,2	629,5
Signifikant	2,2		2,4	2,5	2,6
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	1523,3	2313,8	1443,5	2544,0	1633,4
SD	513,8	164,6	171,1	298,4	139,5
SEM	256,9	82,3	85,5	149,2	69,7
Signifikant			1,7		
Tocopherol 5 $\mu\text{M}$	665,2	1405,4	846,5	1325,0	1027,2
SD	188,7	338,4	312,4	535,5	33,9
SEM	94,4	169,2	156,2	267,8	17,0
Signifikant	0,6	0,6		0,6	
Tocopherol 10 $\mu\text{M}$	3739,4	2470,1	756,3	1079,5	1569,4
SD	1239,2	552,9	134,2	498,9	369,6
SEM	619,6	276,5	67,1	249,4	184,8
Signifikant	3,3			0,4	

**Tab. 20** zu Abb. 20.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	822,0	2164,9	595,6	852,7	1270,2
SD	209,7	554,2	230,0	289,2	367,1
SEM	104,8	277,1	115	144,6	183,5
TSH 1,3 mU/ml	981,1	2317,5	497,8	959,3	1006,3
SD	203,5	1227,4	246,0	286,4	192,0
SEM	101,7	613,7	123	143,2	96
Signifikant					
DMSO	526,2	2805,0	547,5	1186,5	836,5
SD	46,9	429,9	199,4	673,0	178,9
SEM	23,5	215	99,7	336,5	89,4
Signifikant	0,6			1,4	
Troglitazon 5 $\mu\text{M}$	5751,8	3646,4	2391,8	2138,7	2966,2
SD	840,4	1135,9	417,2	285,2	804,2
SEM	420,2	568	208,6	142,6	402,1
Signifikant	7	1,6	4	2,5	2,3
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	3863,0	3077,8	1347,2	2016,6	1875,6
SD	711,5	1309,3	419,6	332,7	628,9
SEM	355,7	654,7	209,8	166,4	314,5
Signifikant	4,7	1,4	2,2	2,3	1,4
Tocopherol 5 $\mu\text{M}$	2637,6	2395,2	417,3	1621,2	1195,3
SD	169,9	336,7	114,4	743,5	355,5
SEM	85,0	168,4	57,2	371,7	177,8
Signifikant	3,2			2	
Tocopherol 10 $\mu\text{M}$	1084,4	3460,4	628,4	829,6	2001,8
SD	481,1	934,5	231,7	235,6	494,5
SEM	240,6	467,3	115,9	117,8	247,2
Signifikant		1,6			1,5

**Tab. 21** zu Abb. 21. <sup>3</sup>H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant (p<0,05) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1044,3	354,0	1917,1	1175,2	958,4
SD	77,6	184,7	171,5	398,6	318,1
SEM	38,8	92,3	85,7	199,3	159
TSH 1,3 mU/ml	734,6	513,0	1909,6	1466,0	1018,2
SD	78,0	435,1	412,1	947,3	123,9
SEM	39	217,6	206,1	473,7	61,9
Signifikant		1,4			
DMSO	526,5	439,2	1723,4	975,6	717,2
SD	90,4	139,3	195,8	439,9	215,2
SEM	45,2	69,6	97,9	220	107,6
Signifikant	0,5				
Troglitazon 5µM	1842,6	1137,3	2841,5	2015,6	4252,5
SD	916,2	107,4	813,3	646,9	461,4
SEM	458,1	53,7	406,6	323,4	230,7
Signifikant	1,7	3,2	1,4	1,7	4,4
Troglitazon 10µM	1116,7	1268,2	2099,8	1571,8	3425,0
SD	168,7	584,9	159,0	212,2	515,6
SEM	84,4	292,4	79,5	106,1	257,8
Signifikant		3,5			3,5
Tocopherol 5µM	667,0	823,3	1385,0	2058,6	2862,9
SD	279,1	341,3	234,6	793,0	508,9
SEM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Signifikant	0,6	2,3	0,7	1,7	3
Tocopherol 10µM	1585,8	86,5	2823,8	797,8	2962,8
SD	422,3	114,2	1463,1	262,7	1990,0
SEM	211,1	57,1	731,5	131,4	995,0
Signifikant	1,5	0,2	1,4	0,6	3,0

**Tab. 22** zu Abb. 22.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1125,4	2202,3	815,4	2274,8	1247,6
SD	531,6	763,5	302,1	509,2	224,6
SEM	265,8	381,7	151,1	254,6	112,3
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	3672,8	2582,6	987,4	1702,8	1464,4
SD	791,5	320,1	128,0	488,3	127,7
SEM	395,8	160,1	64	244,2	63,8
Signifikant	3,2				
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	2311,1	2269,2	963,7	1334,0	1121,0
SD	308,3	324,2	264,2	324,5	140,0
SEM	154,1	162,1	132,1	162,3	70
Signifikant	2			0,6	
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	2191,6	2255,8	949,6	1812,6	1366,6
SD	550,2	380,5	384,0	1114,5	239,9
SEM	275,1	190,3	192	557,2	119,9
Signifikant	1,9				
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	1802,3	1954,0	453,1	1507,4	1307,6
SD	408,8	86,2	337,8	610,6	201,8
SEM	204,4	43,1	168,9	305,3	100,9
Signifikant	1,6		0,5	0,7	
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	1632,7	2124,3	551,4	983,3	1192,8
SD	383,3	505,6	345,3	202,4	397,8
SEM	191,6	252,8	172,6	101,2	198,9
Signifikant	1,4		0,6	0,4	

**Tab. 23** zu Abb. 23.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	822,0	2164,9	595,6	852,7	1270,2
SD	209,7	554,2	230,0	289,2	367,1
SEM	104,8	277,1	115	144,6	183,5
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	1168,9	3305,0	937,8	1132,3	2202,5
SD	164,5	189,1	252,3	141,6	247,7
SEM	82,2	94,5	126,2	70,8	123,8
Signifikant	1,4	1,5	1,5		1,7
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	621,2	2479,3	796,0	975,3	1693,2
SD	77,3	410,4	204,8	245,9	169,2
SEM	38,6	205,2	102,4	122,9	84,6
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	1203,2	2116,3	716,4	1020,2	2452,6
SD	568,0	225,6	256,2	611,3	779,8
SEM	284	112,8	128,1	305,7	389,9
Signifikant	1,4				1,9
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	780,0	2229,6	1667,9	1155,6	1918,4
SD	463,7	674,1	328,4	240,7	218,7
SEM	231,8	337,0	164,2	120,4	109,3
Signifikant			2,8		1,5
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	608,0	2325,6	1252,2	1094,3	1852,2
SD	105,7	960,2	299,3	167,2	582,4
SEM	52,8	480,1	149,7	83,6	291,2
Signifikant			2,1		1,4

**Tab. 24** zu Abb. 24.  $^3\text{H}$ -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden) Stimulation	2 h	16h	40h	64h	88h
Kontrolle	1044,3	354,0	1917,1	1175,2	958,4
SD	77,6	184,7	171,5	398,6	318,1
SEM	38,8	92,3	85,7	199,3	159
2,4-Thiazolidindion 0,1 $\mu\text{M}$	1760,1	439,6	1934,1	1120,7	1096,1
SD	807,2	349,1	733,0	259,4	738,1
SEM	403,6	174,6	366,5	129,7	369,1
Signifikant	1,6				
2,4-Thiazolidindion 1 $\mu\text{M}$	1077,7	574,6	2017,3	1105,2	1163,9
SD	401,9	263,8	375,5	67,1	259,2
SEM	201	131,9	187,7	33,5	129,6
Signifikant					
2,4-Thiazolidindion 2,5 $\mu\text{M}$	1110,4	1150,4	2263,4	1244,4	1318,7
SD	552,5	1764,2	738,4	324,0	298,3
SEM	276,2	882,1	369,2	162	149,2
Signifikant		3,2			
2,4-Thiazolidindion 5 $\mu\text{M}$	1576,6	363,1	1981,5	1717,3	1417,4
SD	710,9	88,0	1109,0	579,4	400,8
SEM	355,5	44,0	554,5	289,7	200,4
Signifikant	1,5			1,4	1,4
2,4-Thiazolidindion 10 $\mu\text{M}$	1238,8	218,6	1929,0	2166,1	1273,4
SD	316,9	208,9	558,4	779,7	598,8
SEM	158,5	104,5	279,2	389,9	299,4
Signifikant		0,6		1,8	

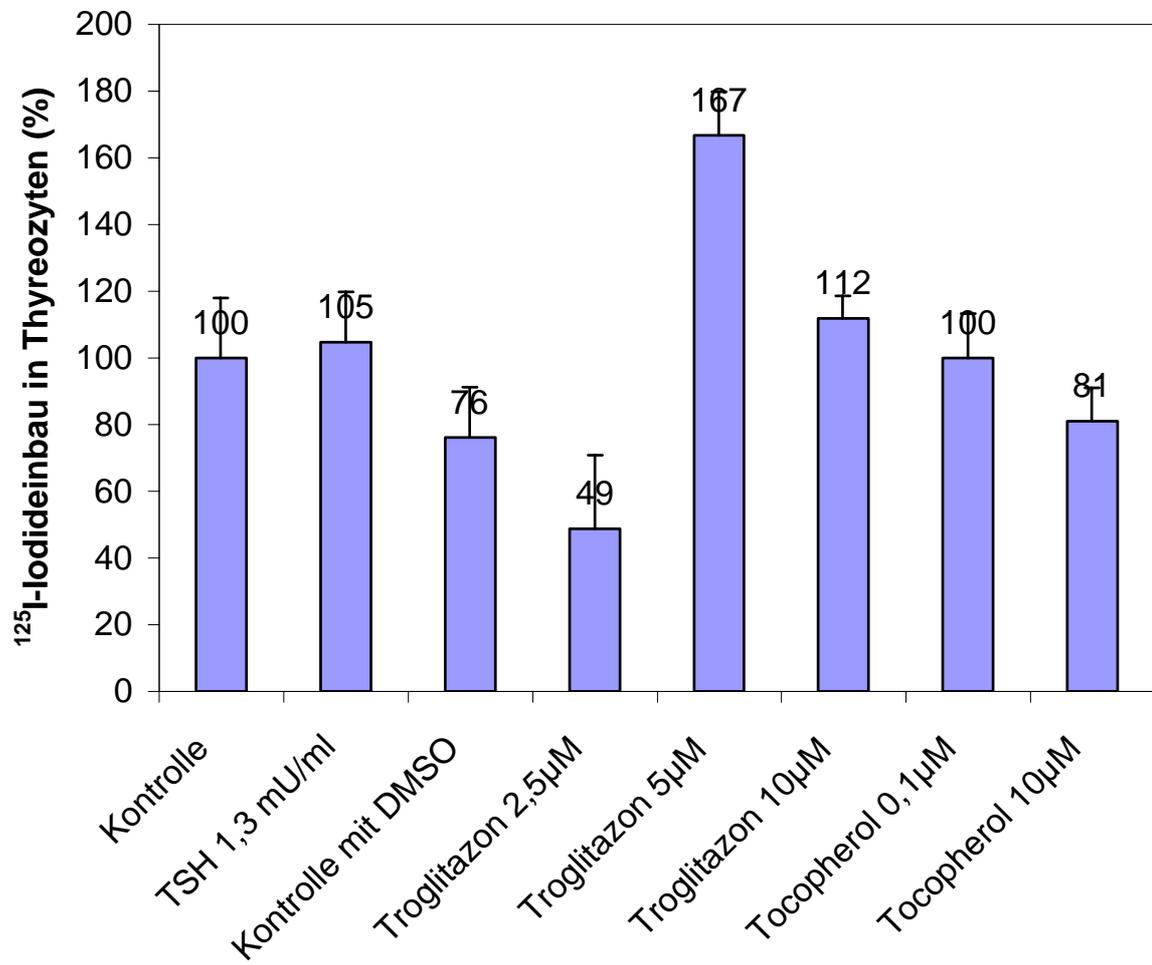
**Tab. 26.** zu Abb.26: Zum PPAR $\gamma$ -/- Retinsäurerezeptor-Versuch die zugehörige <sup>125</sup>I-Iodidkontrolle in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant (p<0,05) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache des Iodideinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	30h
Stimulation	
Kontrolle Troglitazon	852,7
SD	180,7
SEM	90,3
Troglitazon 0,1 $\mu$ M	639,8
SD	147,6
SEM	73,8
Signifikant	
Troglitazon 1 $\mu$ M	496,7
SD	150,0
SEM	75
Signifikant	
Troglitazon 2,5 $\mu$ M	474,2
SD	228,8
SEM	114,4
Signifikant	
Troglitazon 5 $\mu$ M	567,6
SD	59,7
SEM	29,9
Signifikant	
Troglitazon 10 $\mu$ M	415,0
SD	104,5
SEM	52,3
Signifikant	

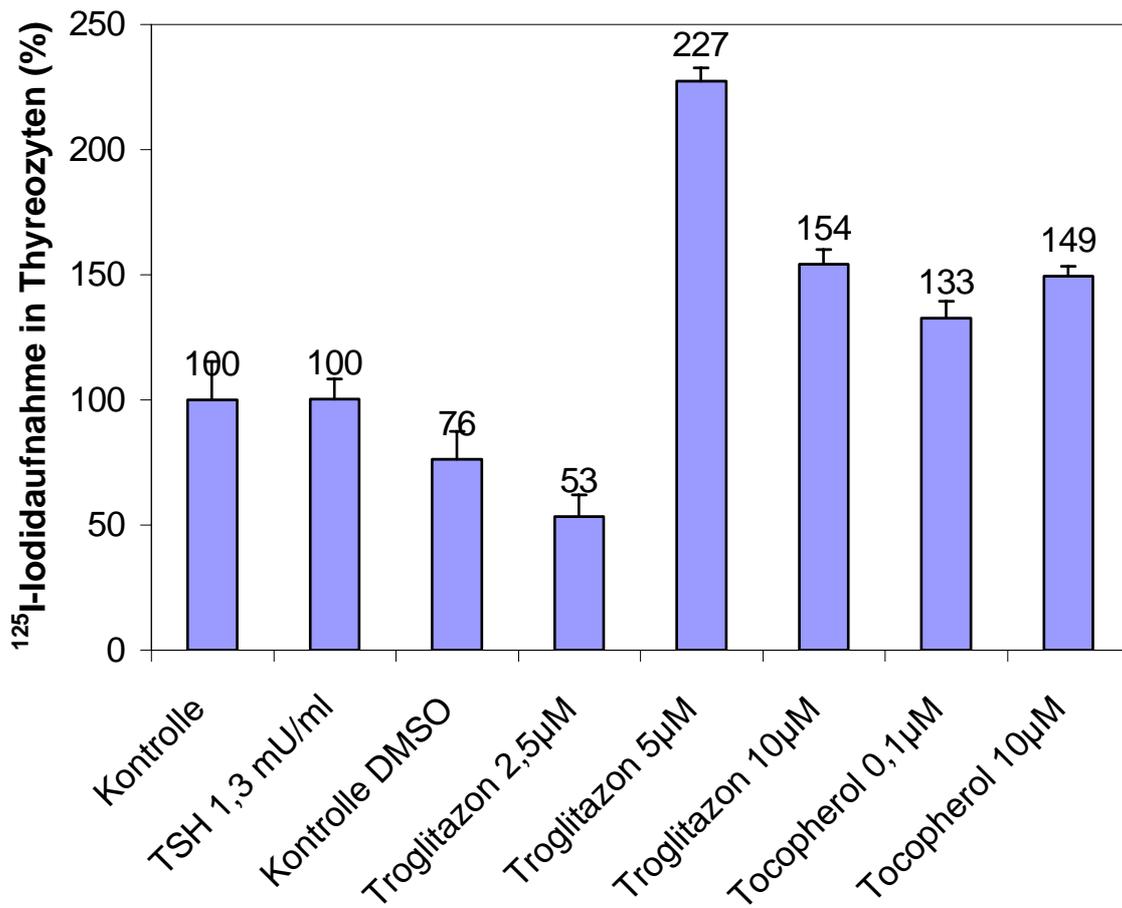
**Tab. 27.** zu Abb.27: Zum PPAR $\gamma$ - Retinsäurerezeptor-Versuch die zugehörige  $^3\text{H}$ -Thymidinkontrolle in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=5. Als signifikant ( $p < 0,05$ ) gelten Einbauwerte, die mindestens das 1,4fache oder weniger als das 0,7fache des Thymidineinbaus der Kontrolle erreichen (Angabe des Vielfachen).

Zeit (Stunden)	30 h
Stimulation	
Kontrolle Troglitazon	17005,3
SD	11047,3
SEM	5523,7
Troglitazon 0,1 $\mu\text{M}$	30346,1
SD	11776,3
SEM	5888,2
Signifikant	1,7
Troglitazon 1 $\mu\text{M}$	43152,4
SD	17436,8
SEM	8718,4
Signifikant	2,5
Troglitazon 2,5 $\mu\text{M}$	32141,8
SD	9711,6
SEM	4855,8
Signifikant	1,8
Troglitazon 5 $\mu\text{M}$	30581,1
SD	7559,8
SEM	3779,9
Signifikant	1,7
Troglitazon 10 $\mu\text{M}$	18935,6
SD	17068,5
SEM	8534,3
Signifikant	

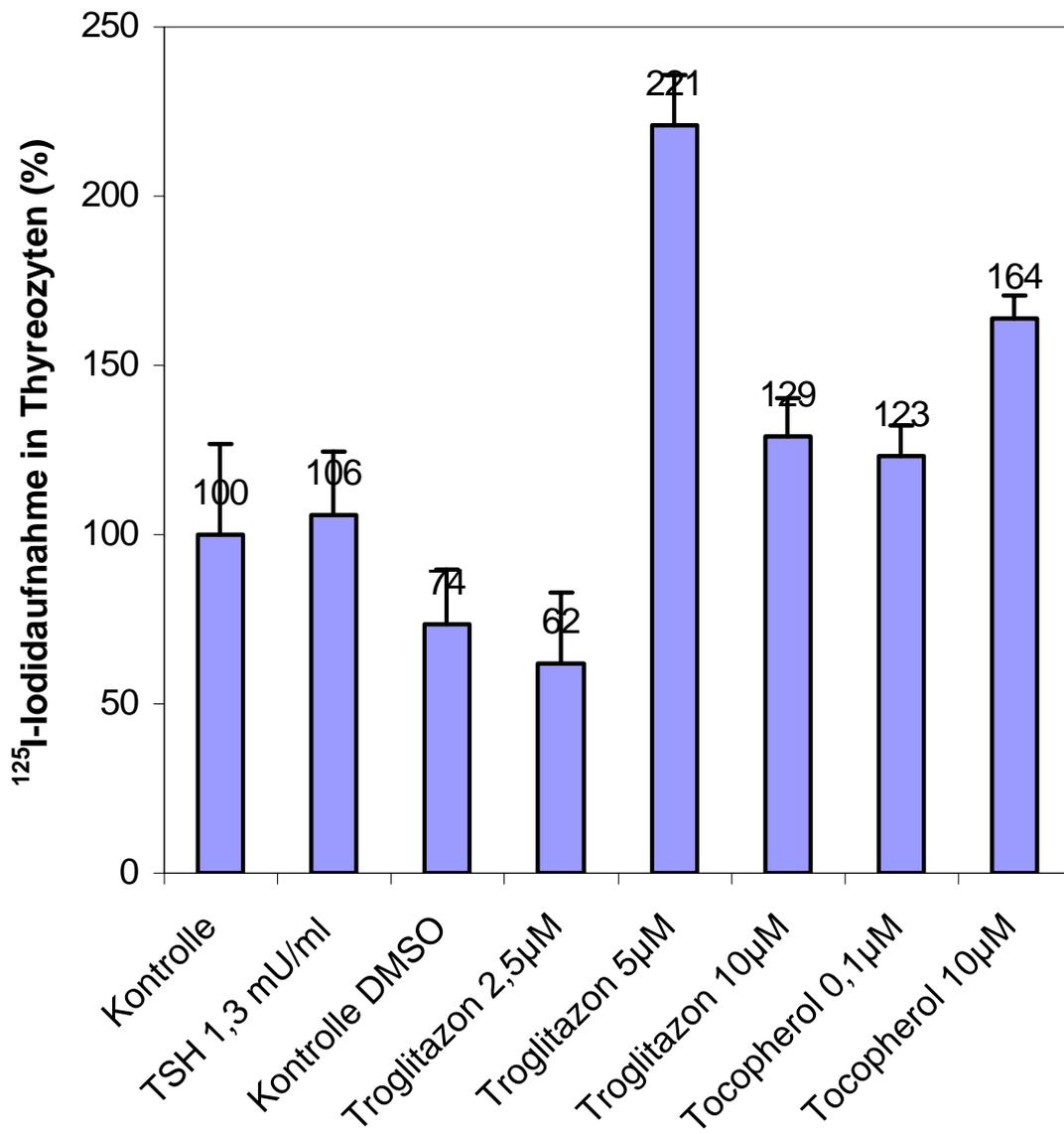
## 8.2 Mittelwerte und SEM normiert auf die Kontrolle



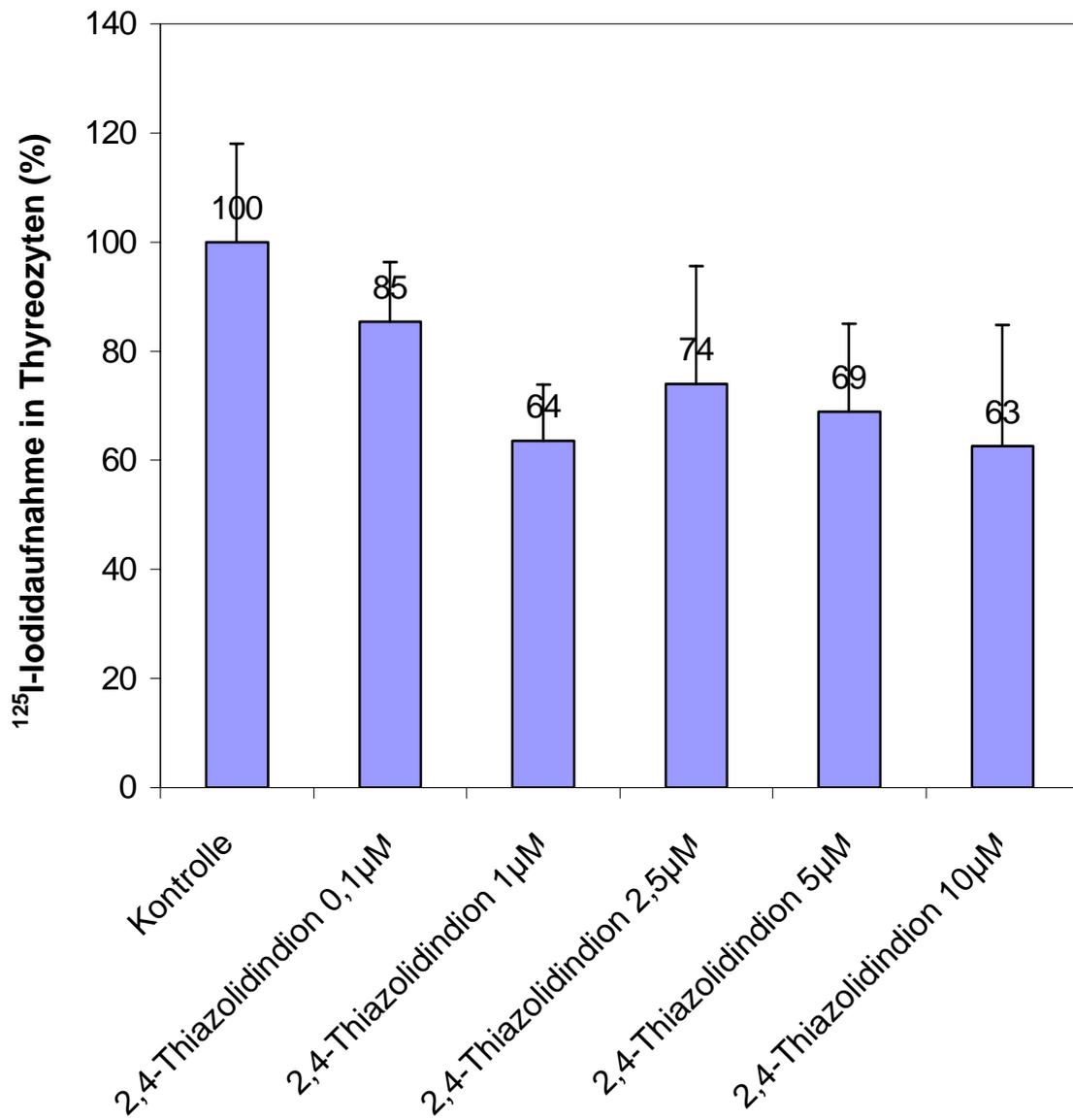
**Abb. 1a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 1 normiert auf die Kontrolle



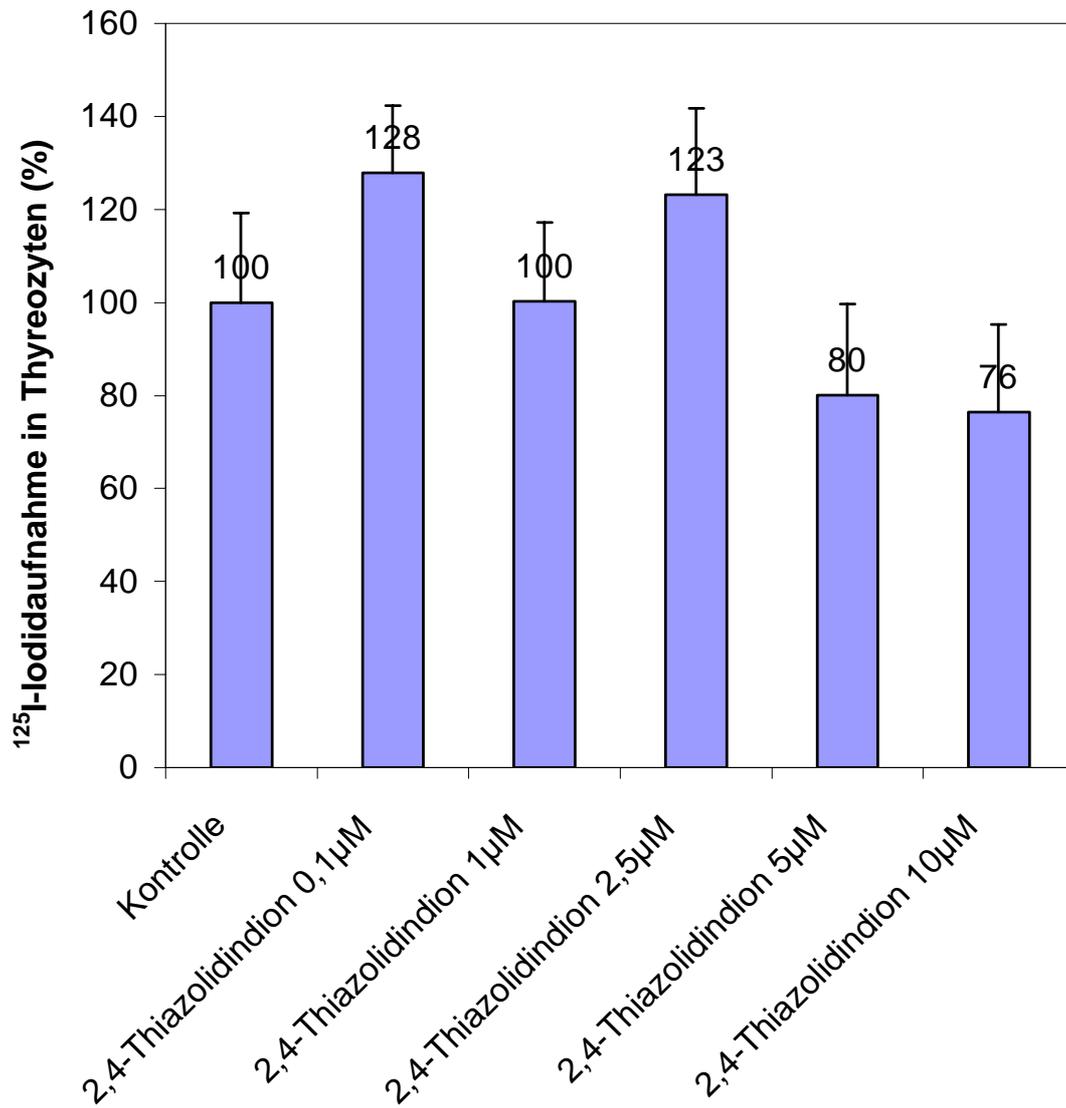
**Abb. 2a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 2 normiert auf die Kontrolle.



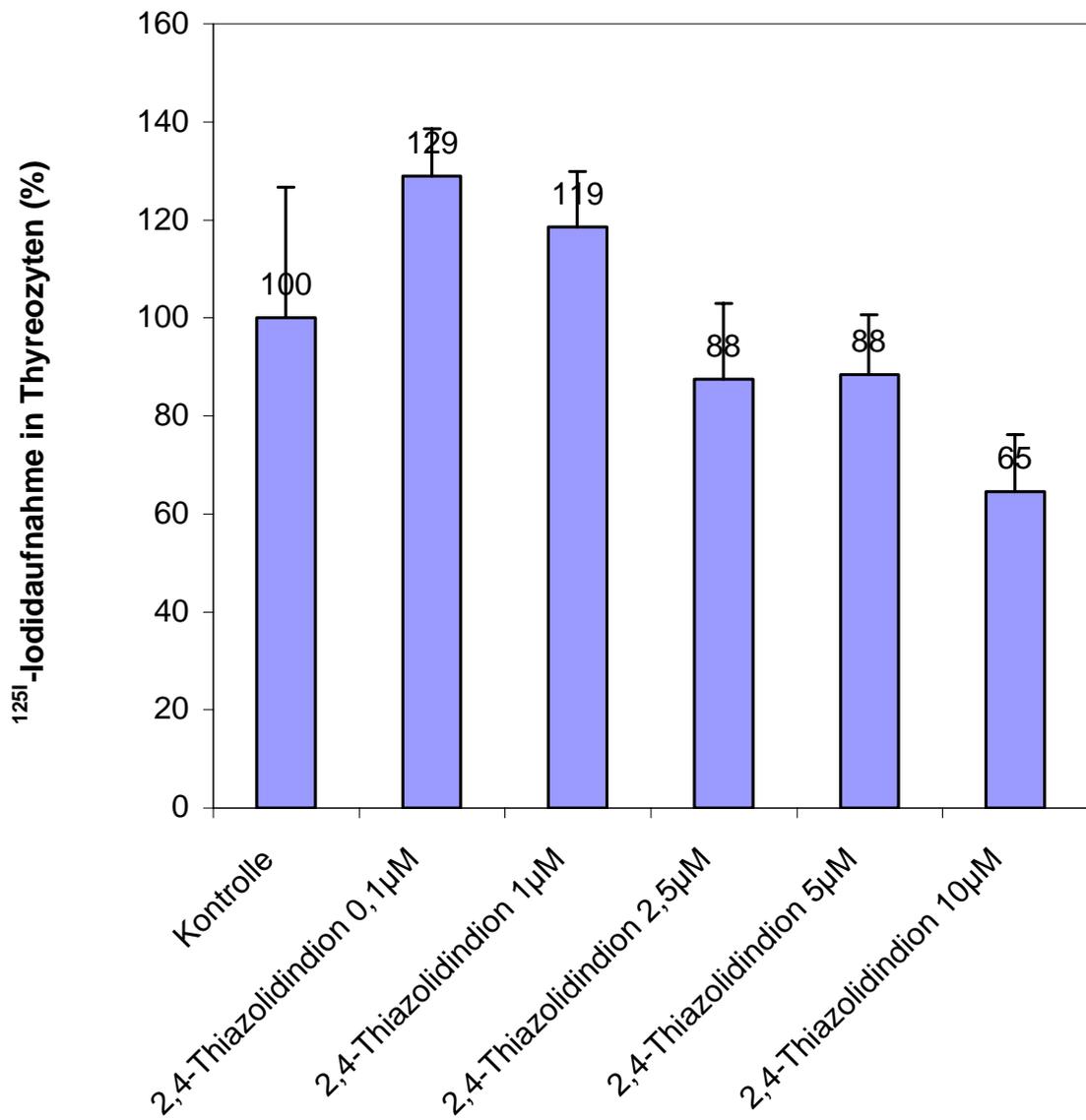
**Abb. 3a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 3 normiert auf die Kontrolle.



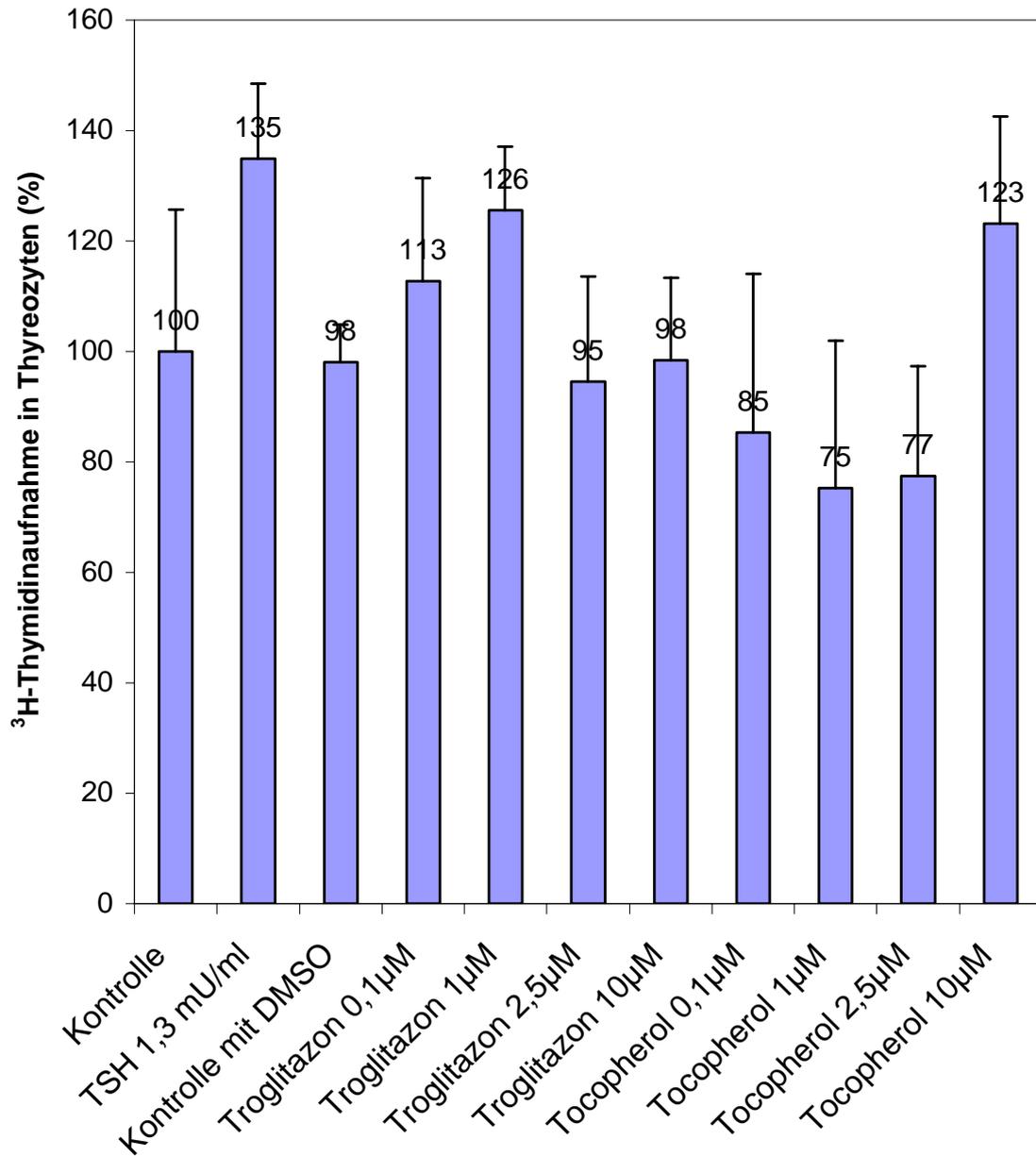
**Abb. 4a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 4 normiert auf die Kontrolle.



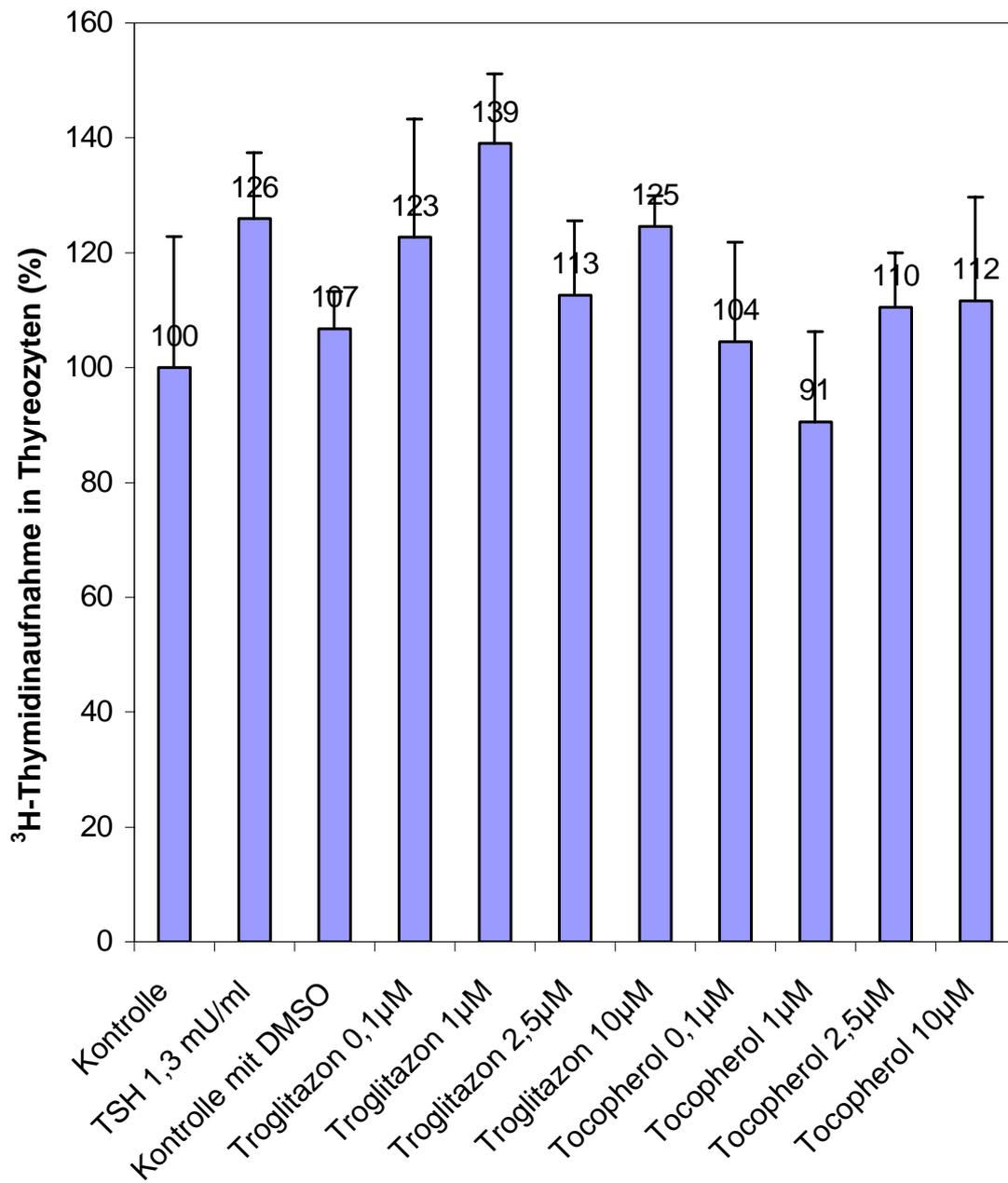
**Abb 5a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 5 normiert auf die Kontrolle.



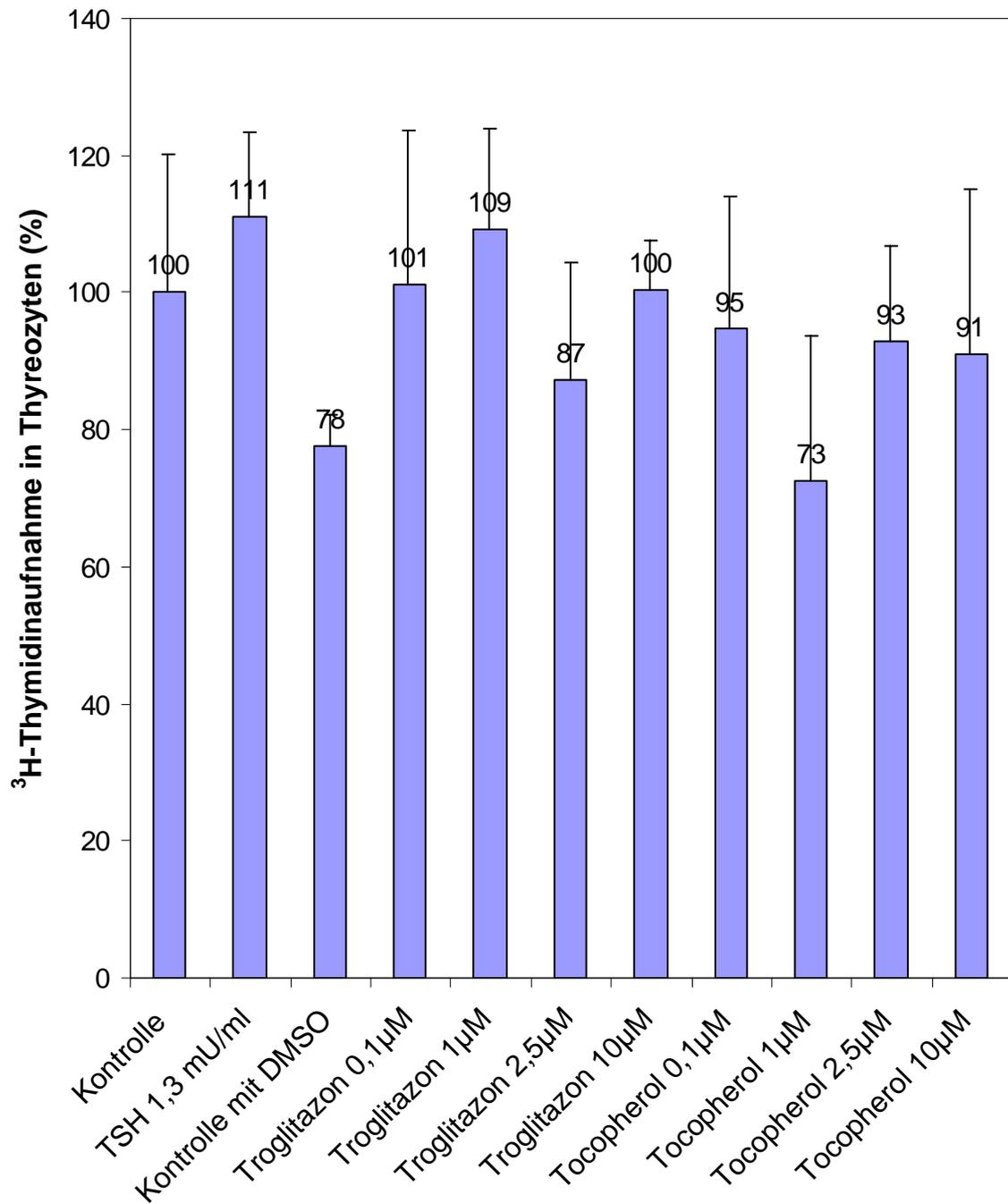
**Abb. 6a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 6 normiert auf die Kontrolle.



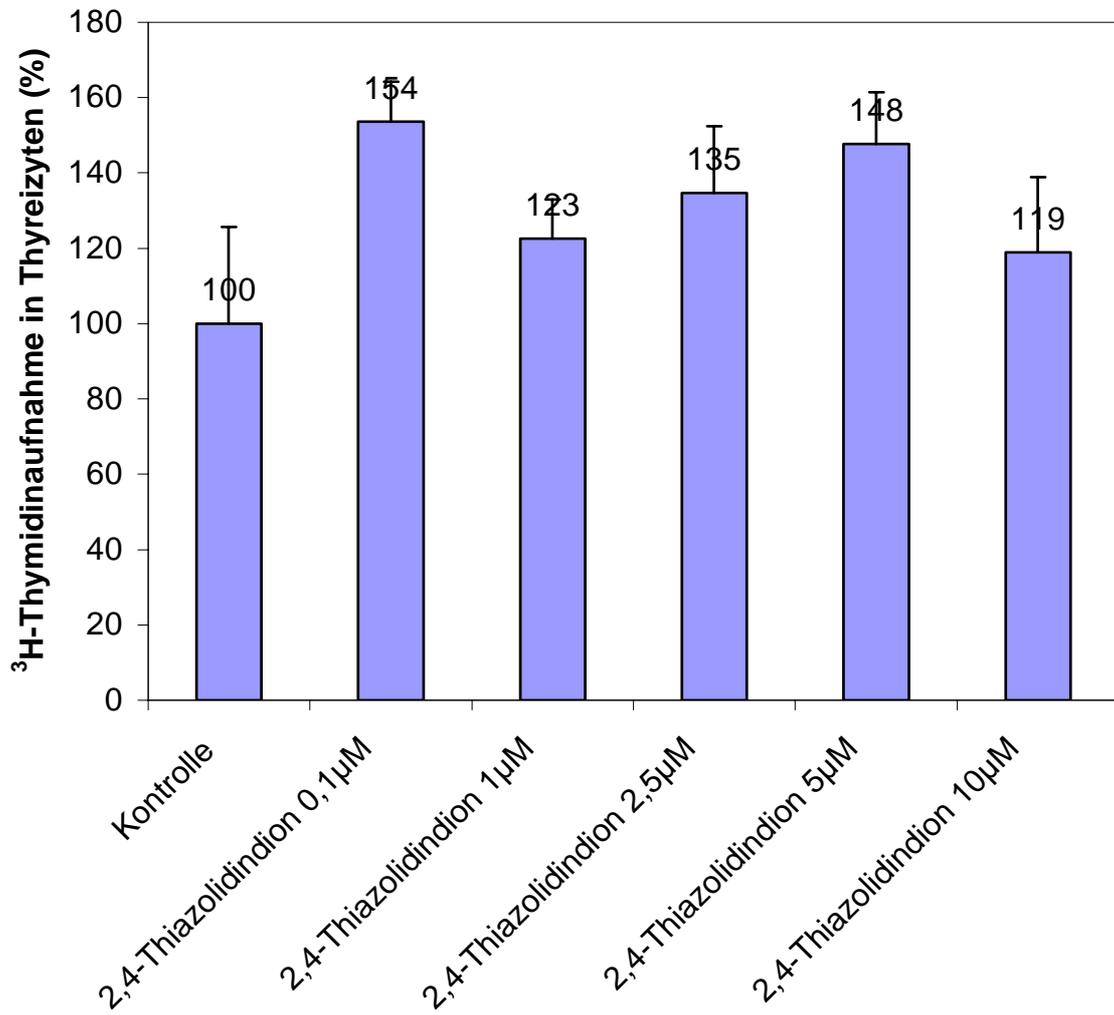
**Abb. 7a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 7 normiert auf die Kontrolle.



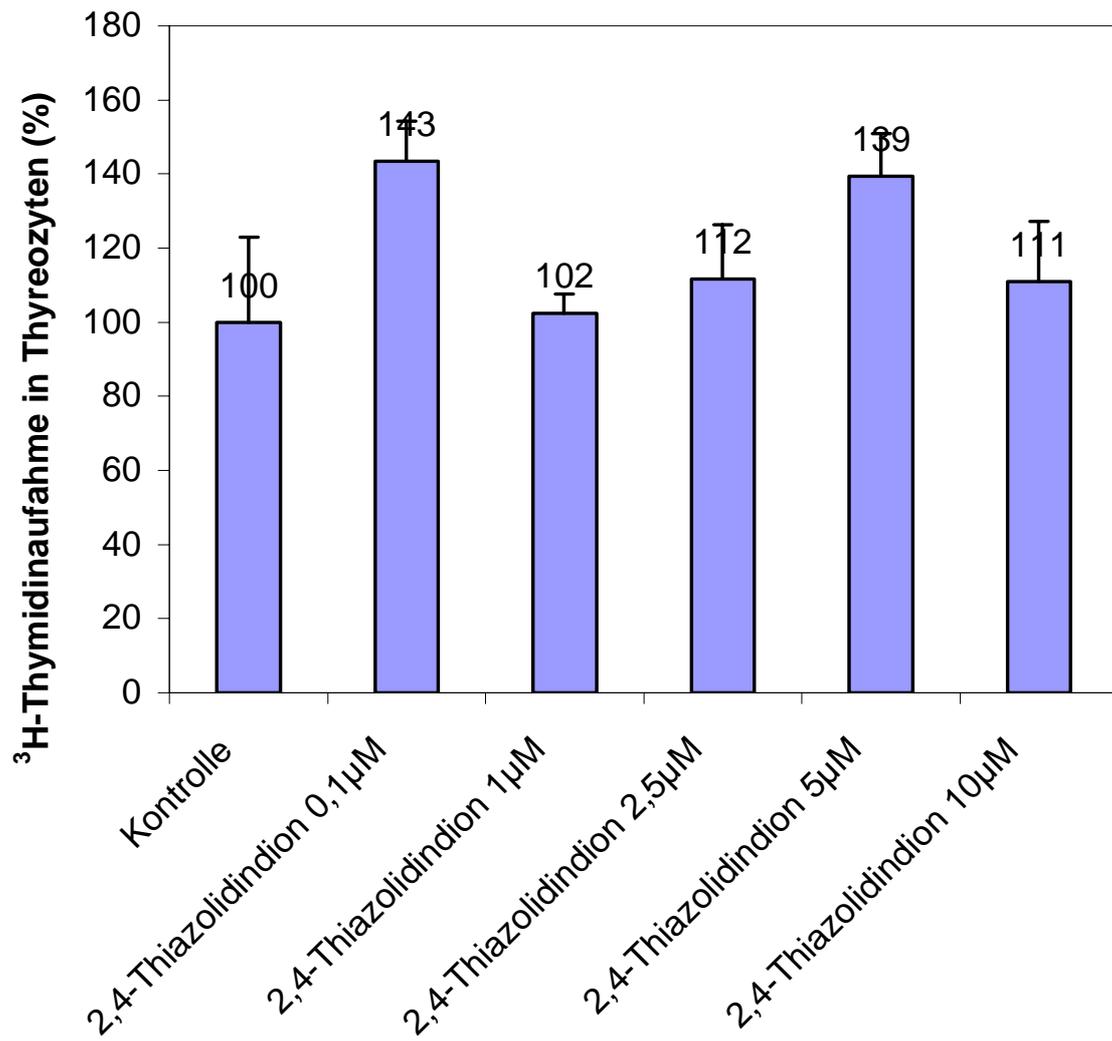
**Abb. 8a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 8 normiert auf die Kontrolle.



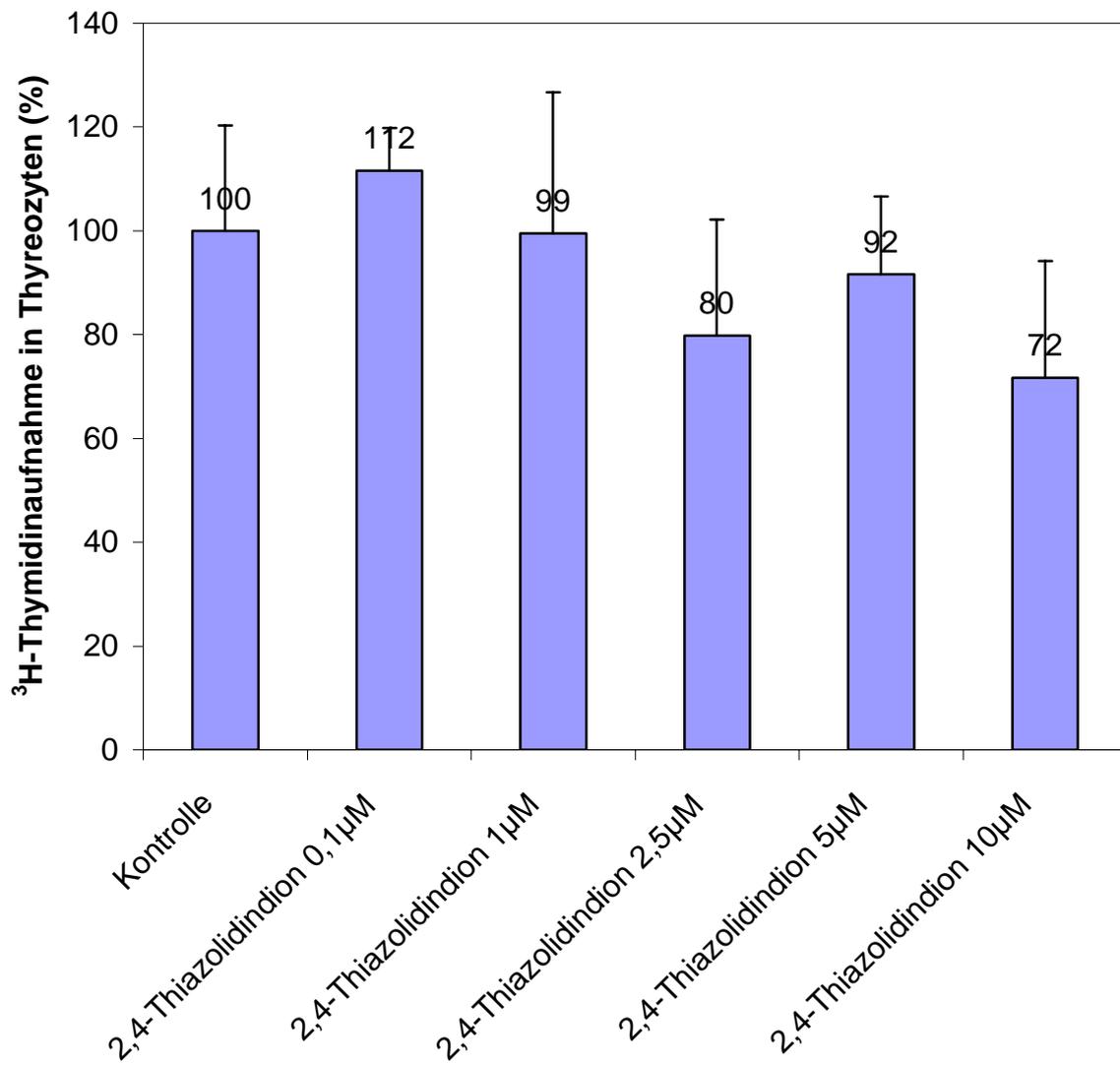
**Abb. 9a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 9 normiert auf die Kontrolle.



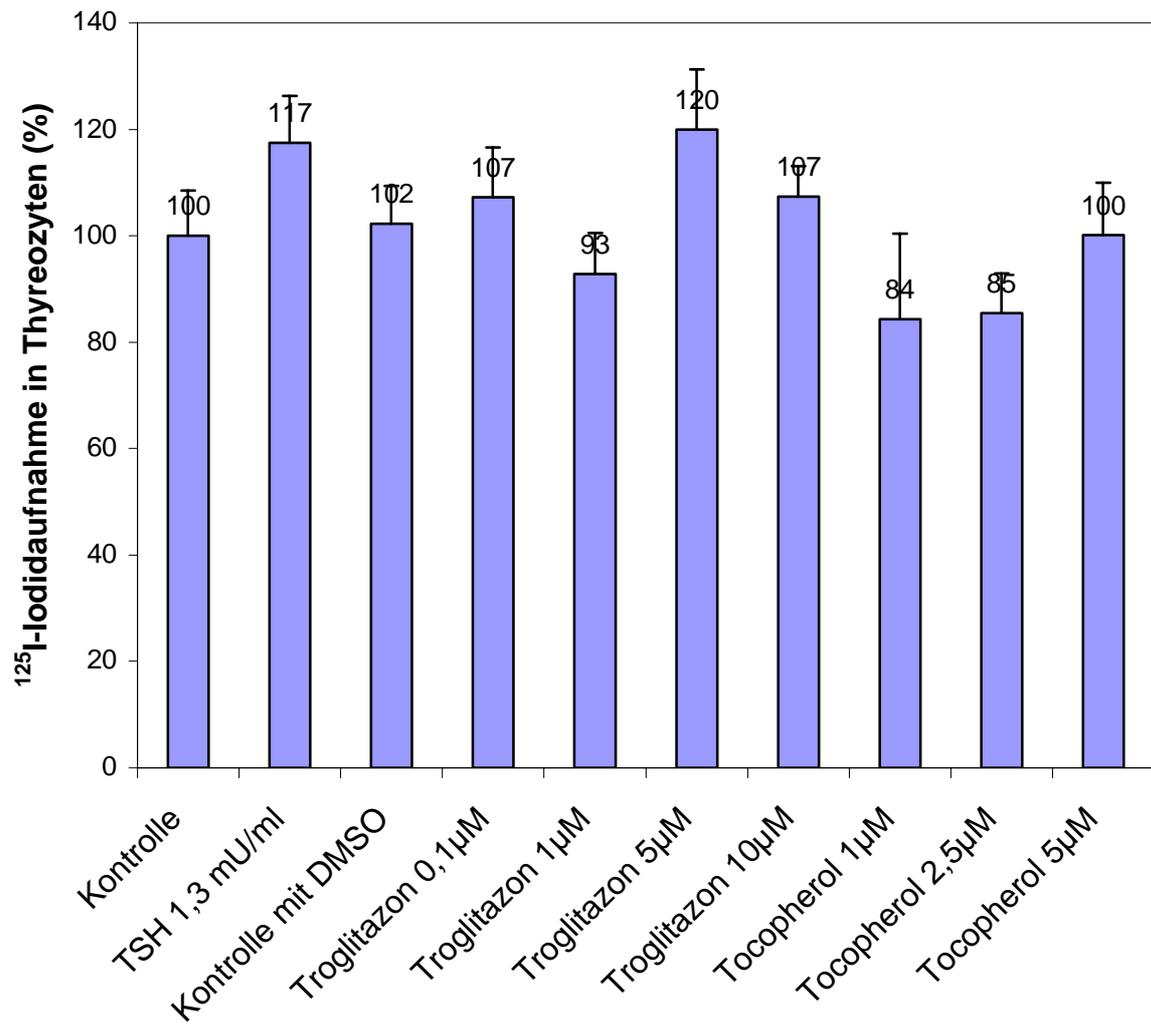
**Abb. 10a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 10 normiert auf die Kontrolle.



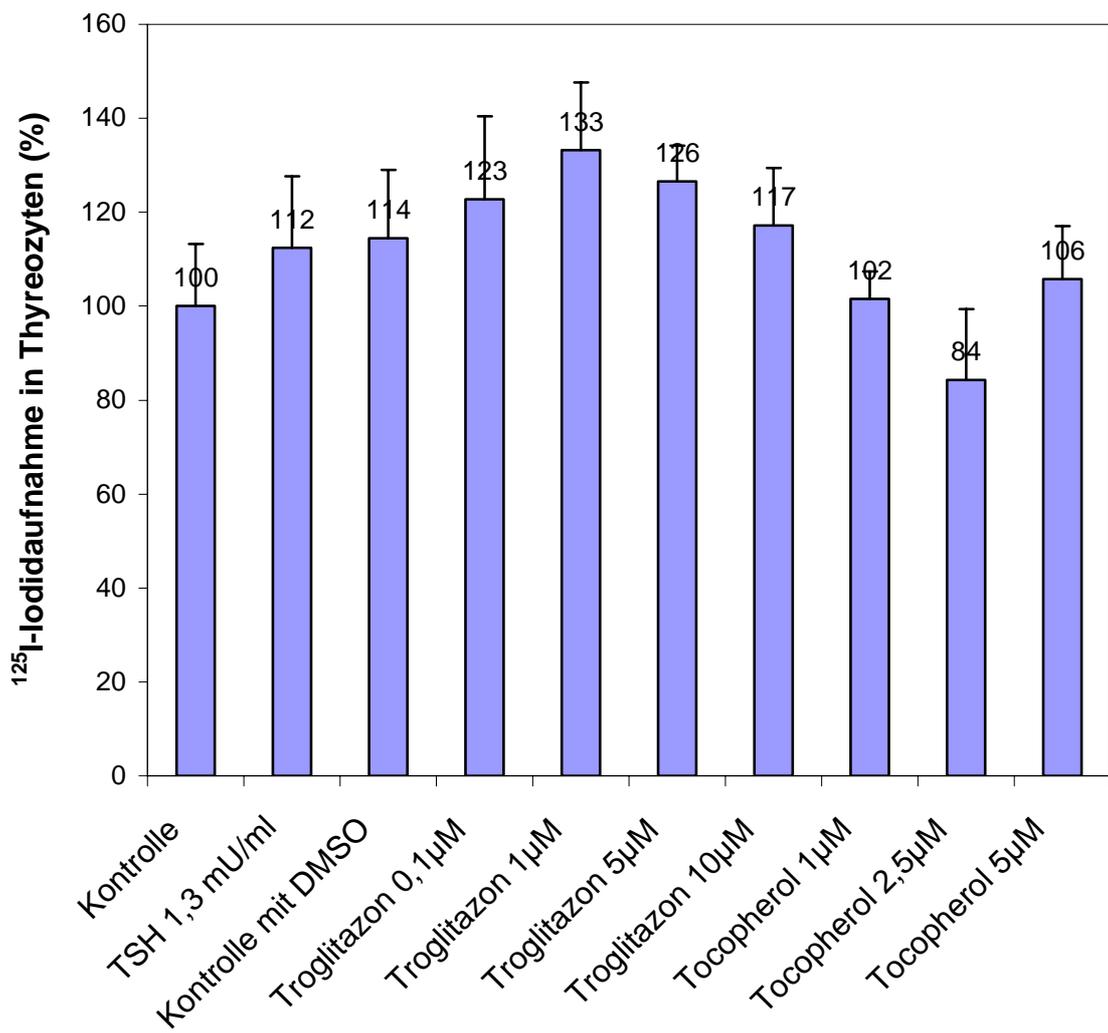
**Abb. 11a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 11 normiert auf die Kontrolle.



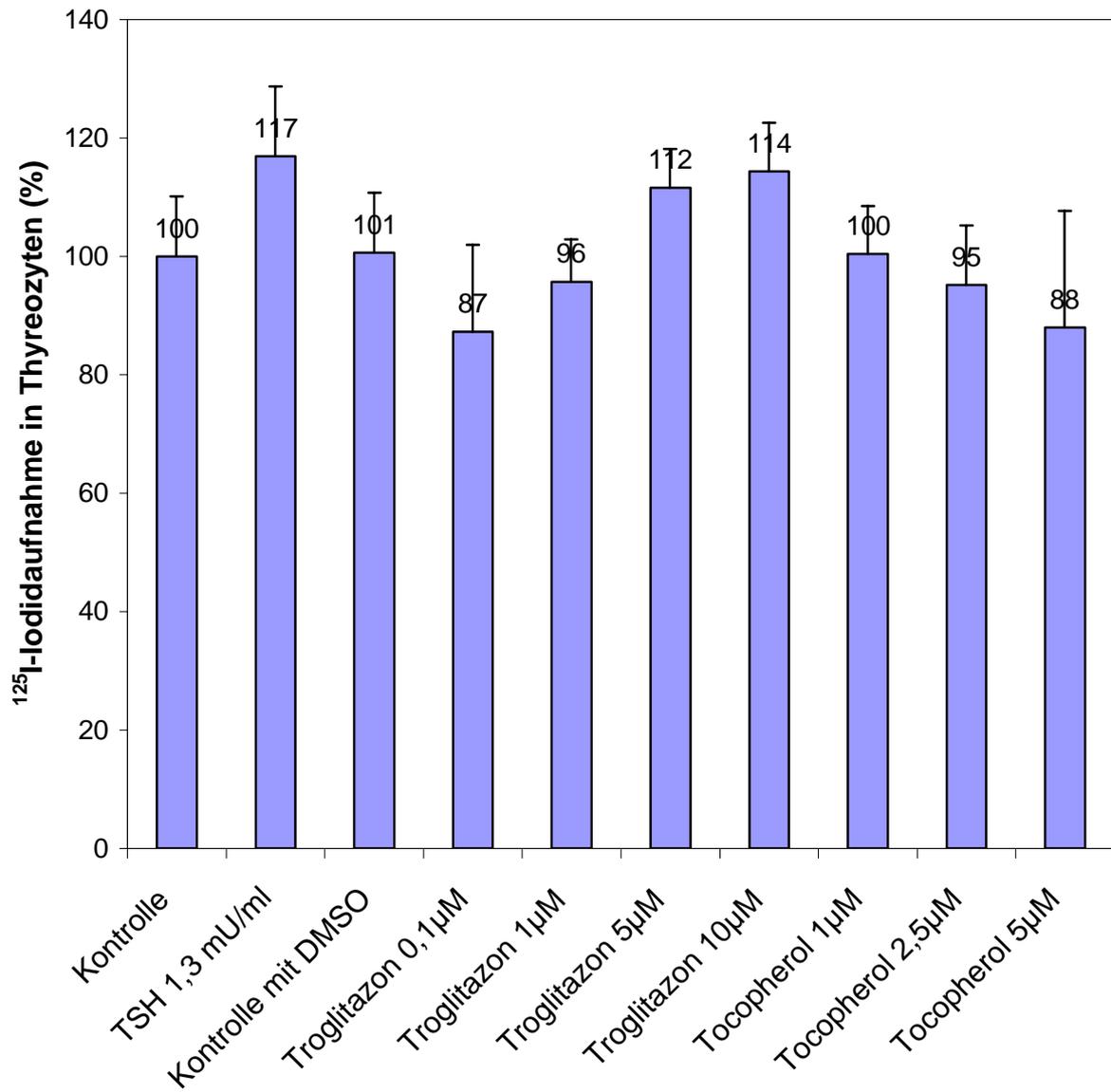
**Abb. 12a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 12 normiert auf die Kontrolle.



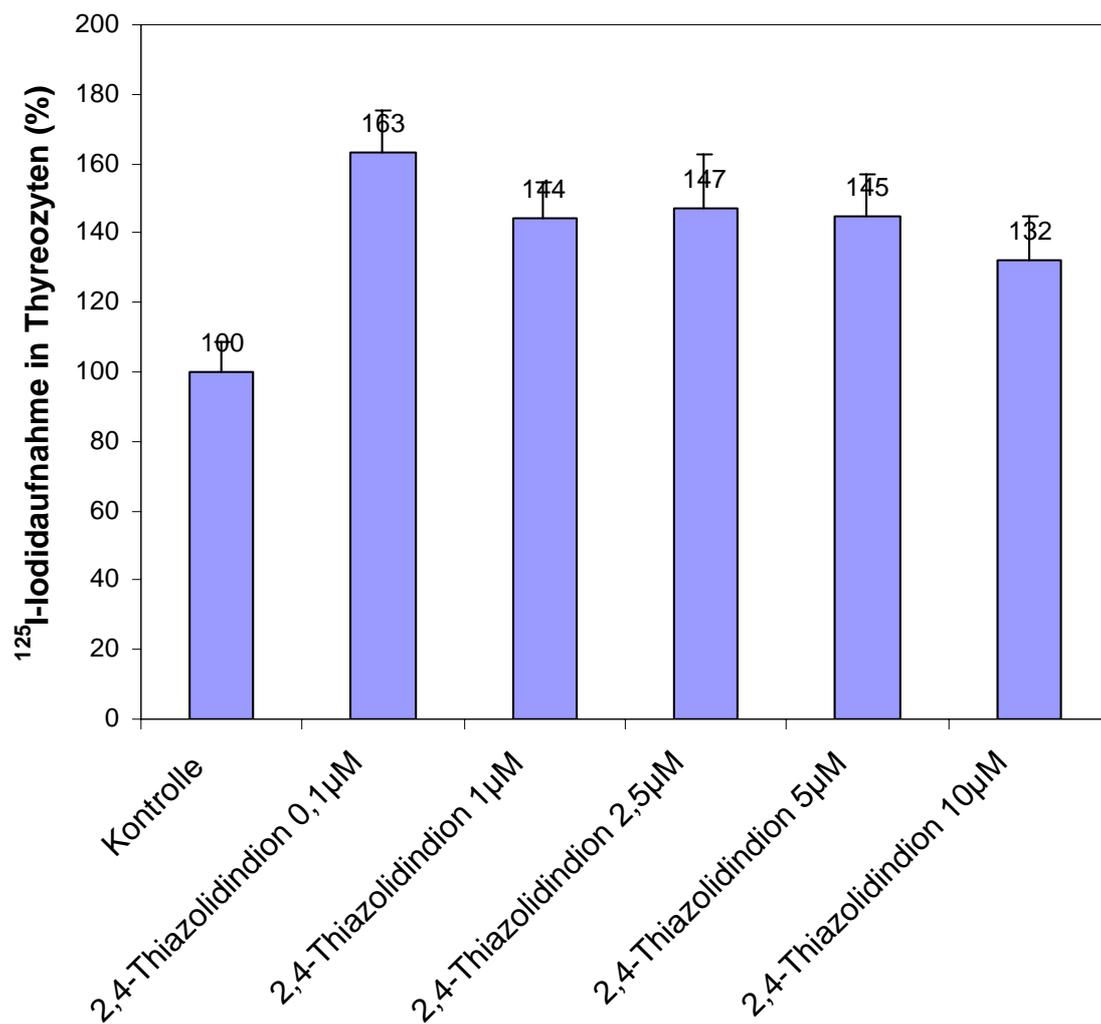
**Abb. 13a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 13 normiert auf die Kontrolle.



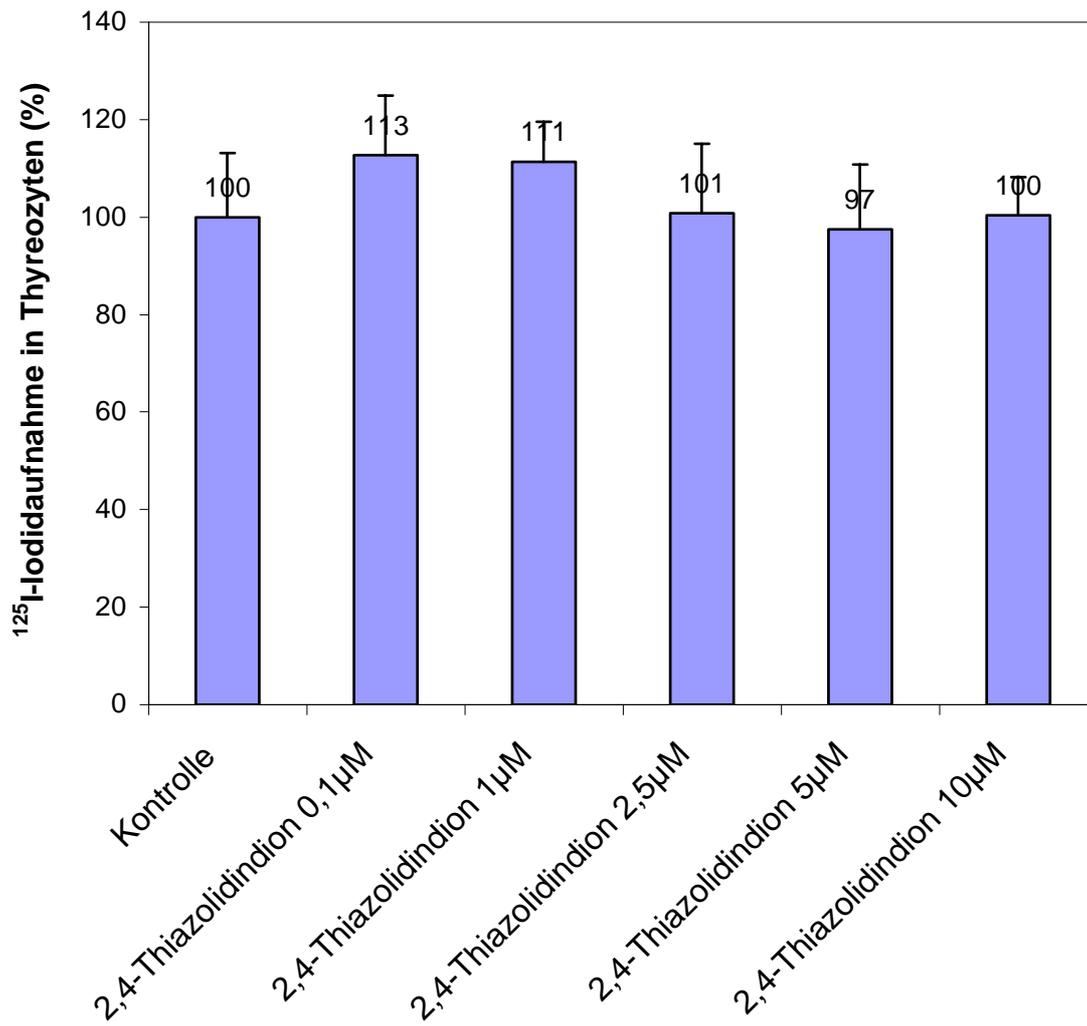
**Abb. 14a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 14 normiert auf die Kontrolle.



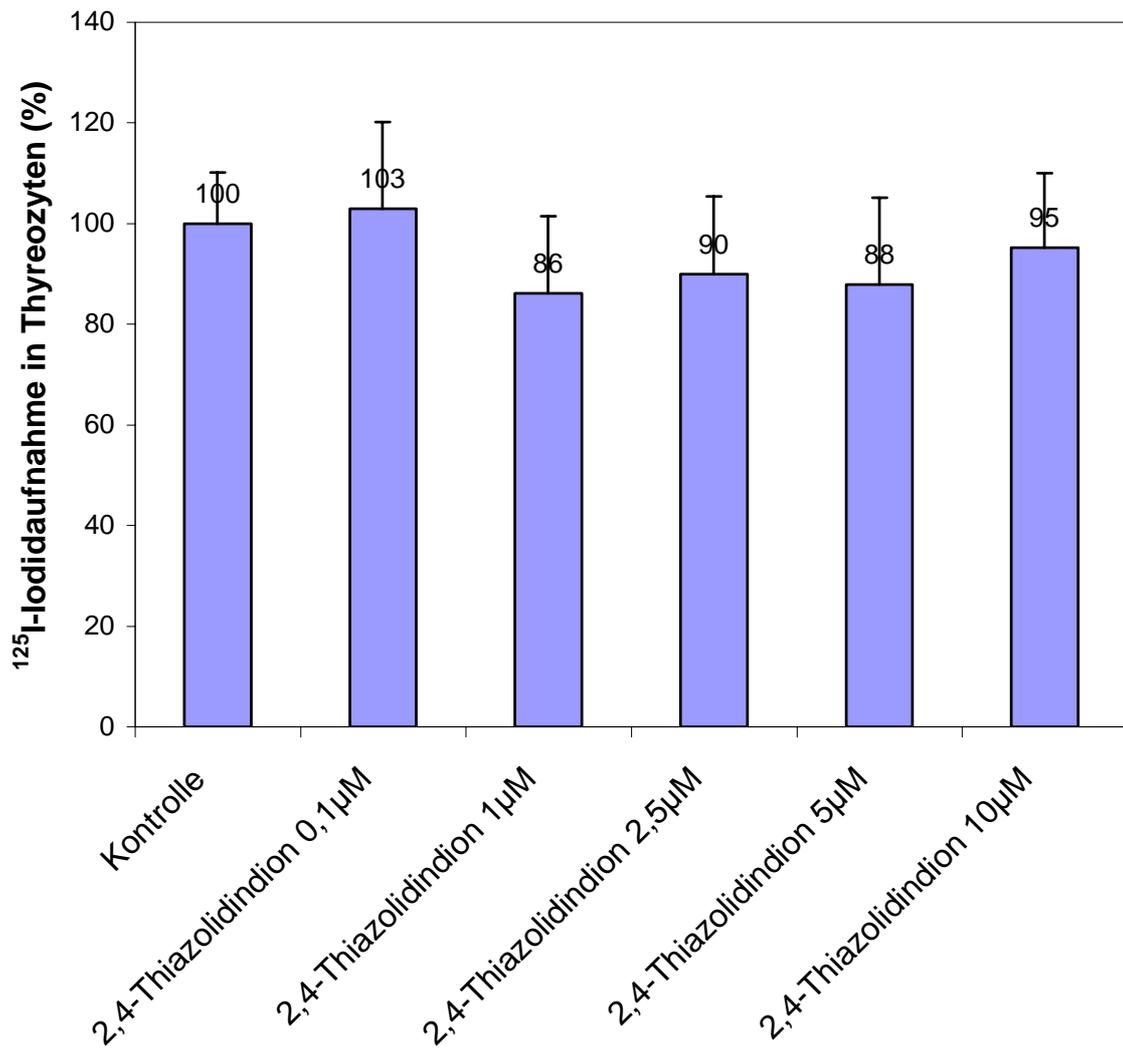
**Abb. 15a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 15 normiert auf die Kontrolle.



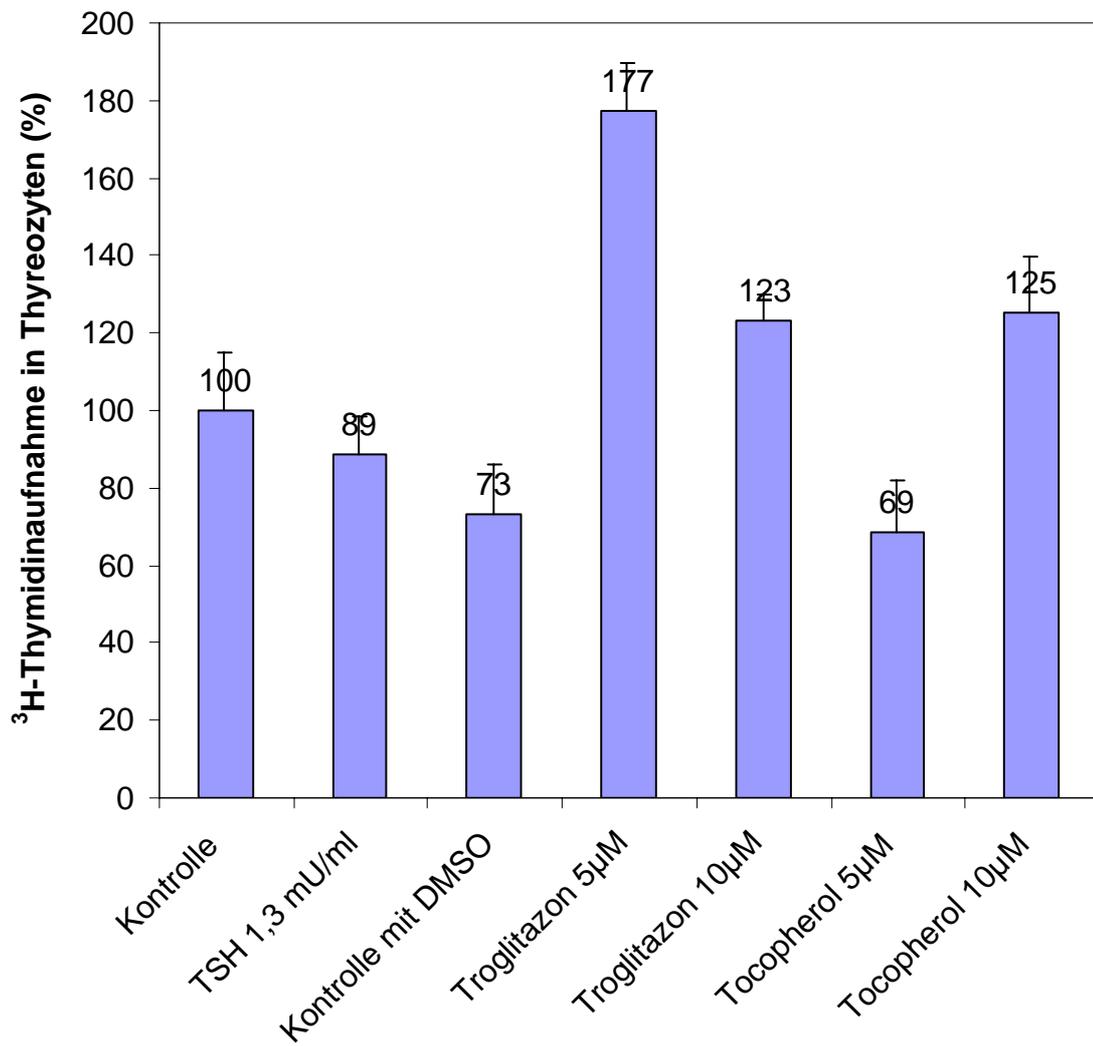
**Abb. 16a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 16 normiert auf die Kontrolle.



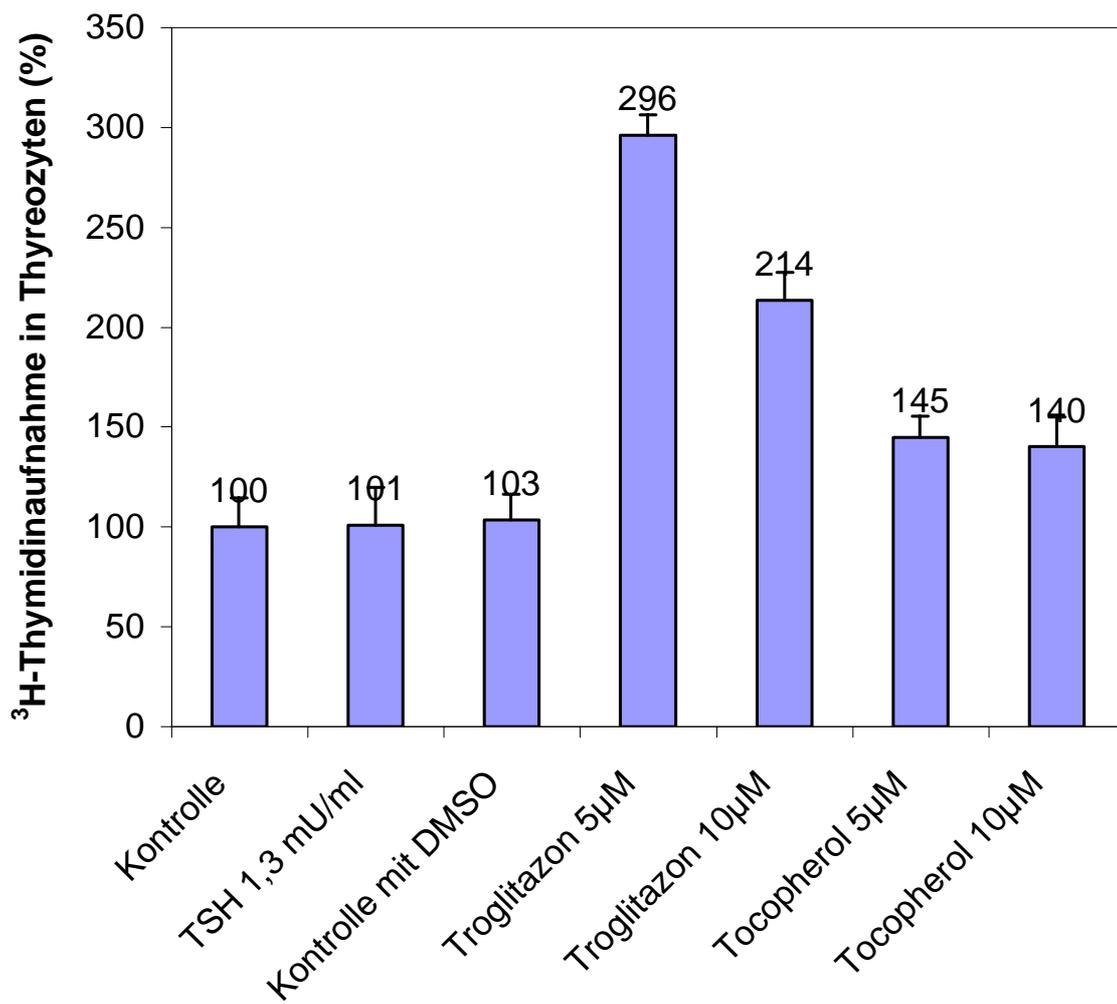
**Abb. 17a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 17 normiert auf die Kontrolle.



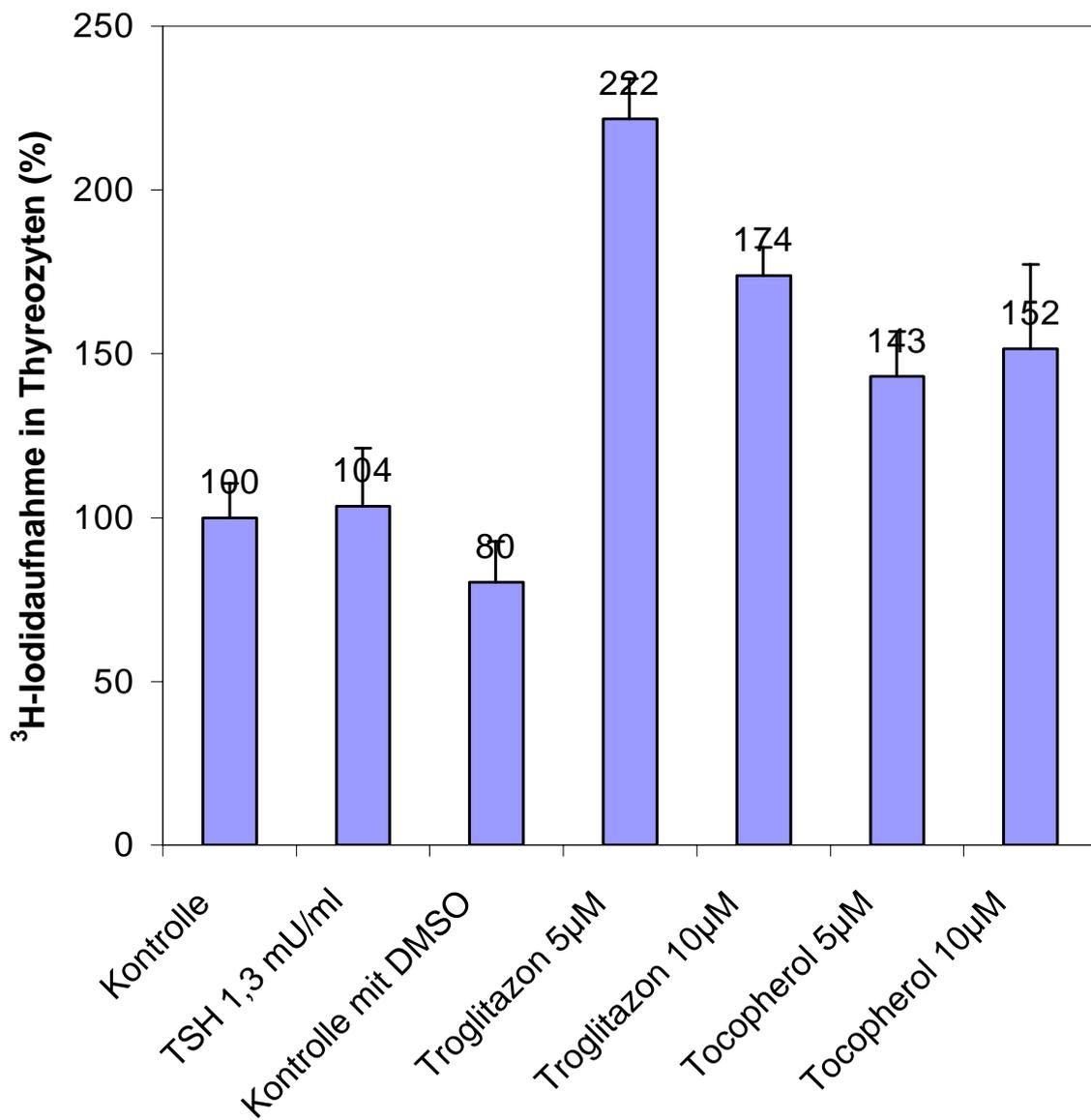
**Abb. 18a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 18 normiert auf die Kontrolle.



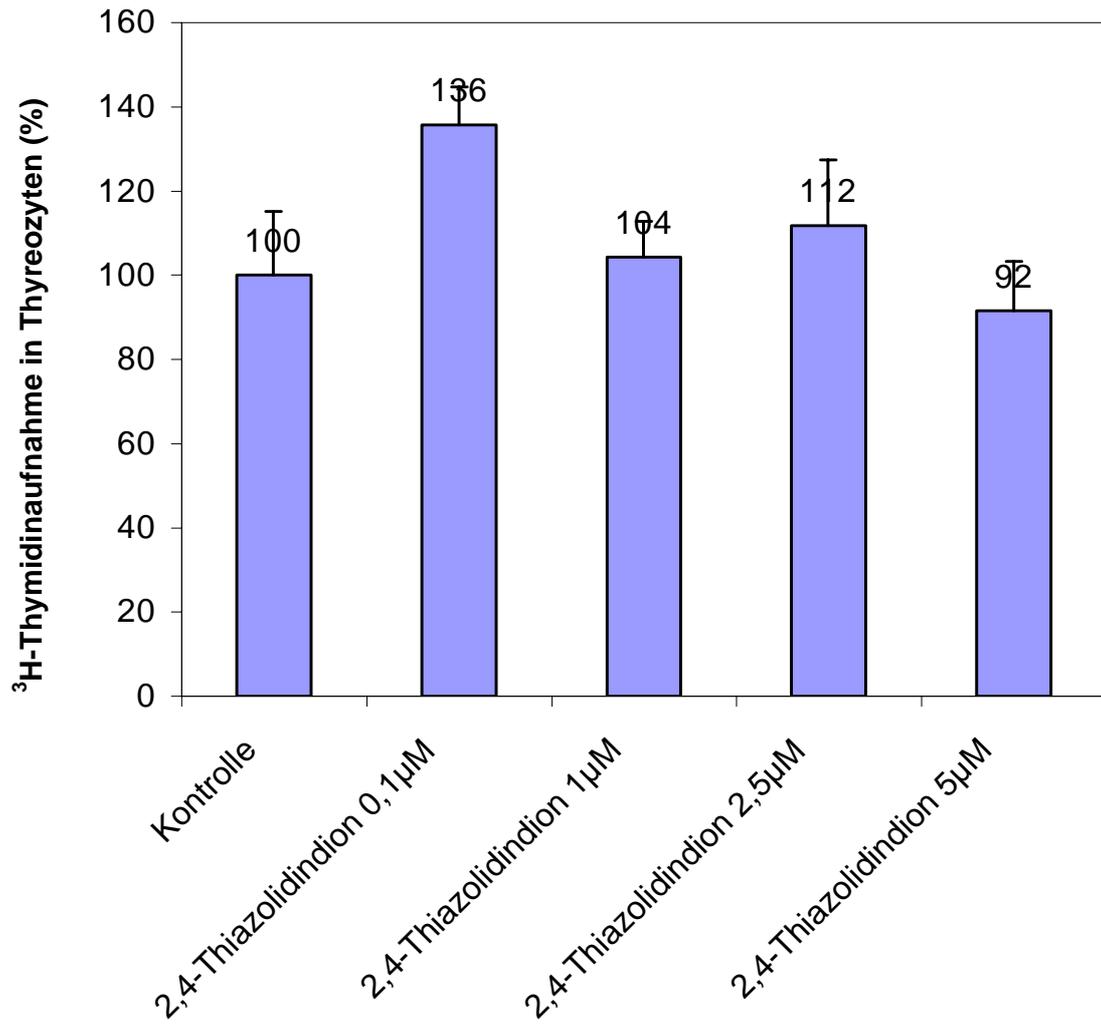
**Abb. 19a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 19 normiert auf die Kontrolle.



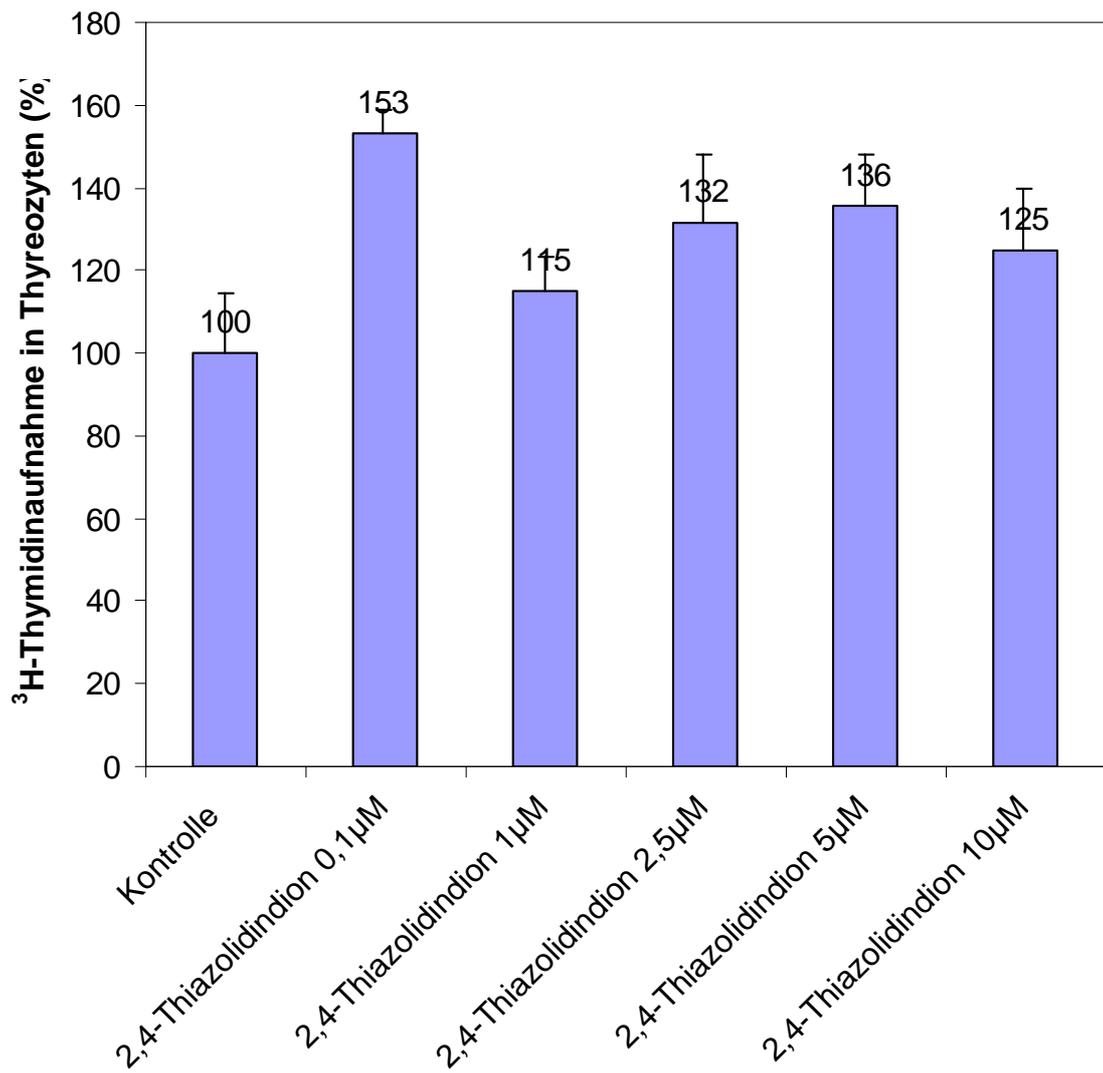
**Abb. 20a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 20 normiert auf die Kontrolle.



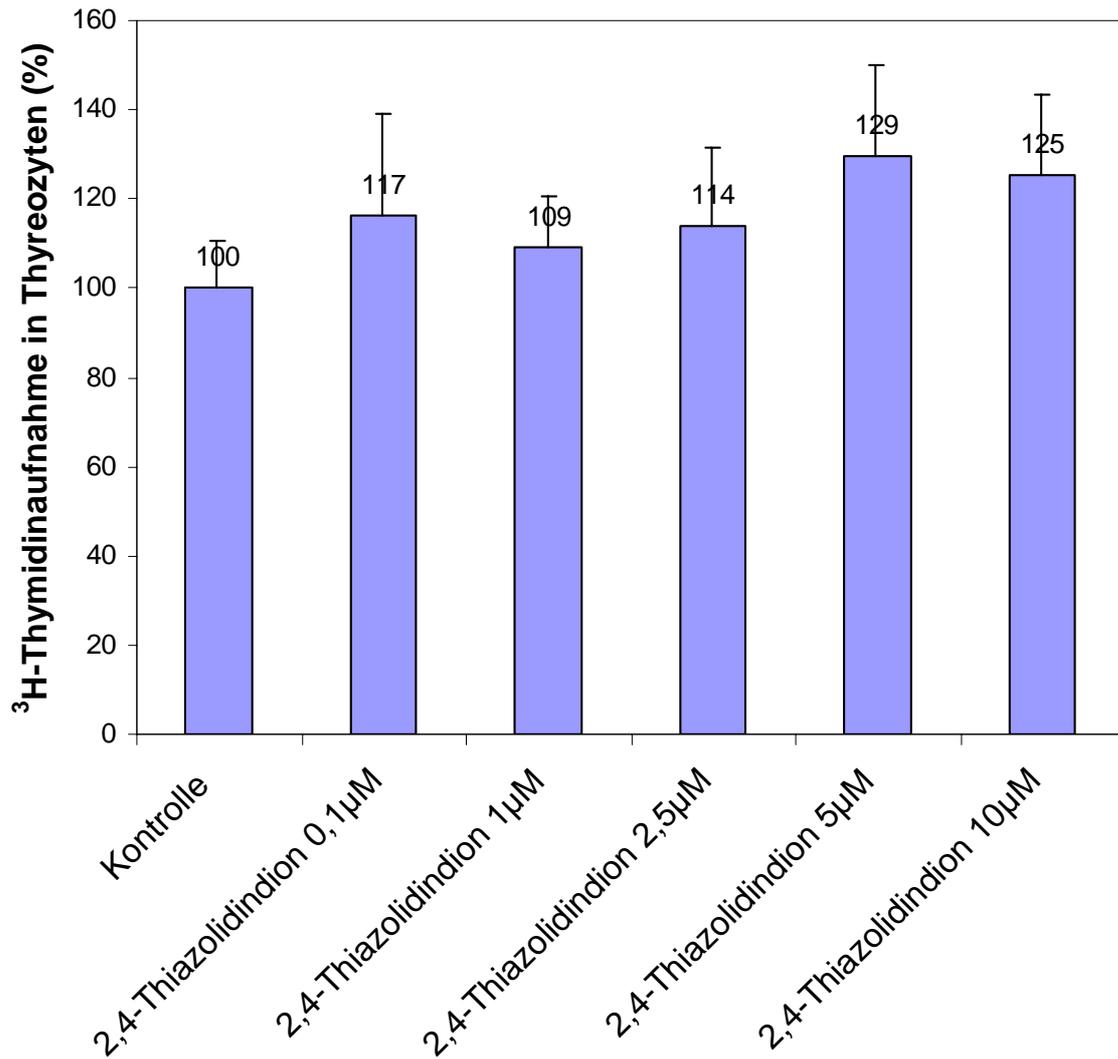
**Abb. 21a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 21 normiert auf die Kontrolle.



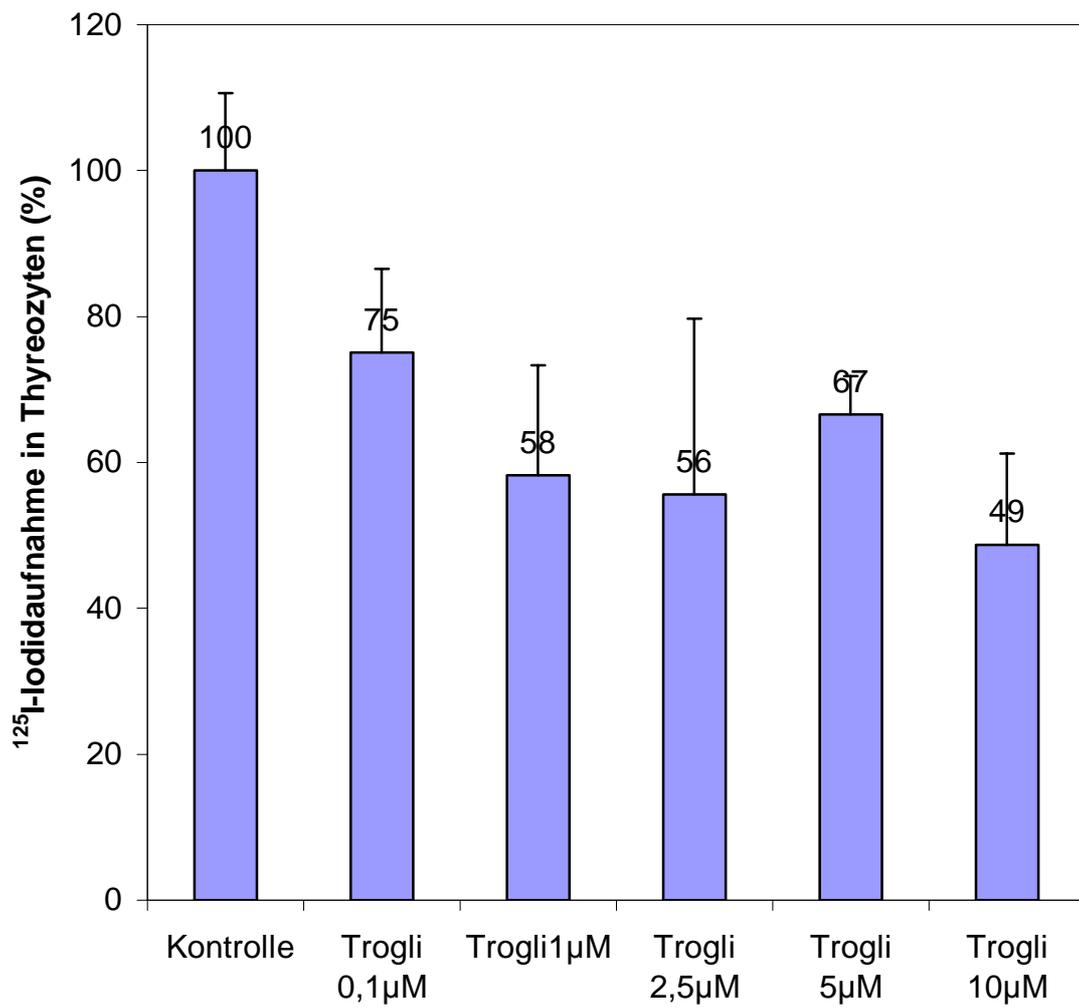
**Abb. 22a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 22 normiert auf die Kontrolle.



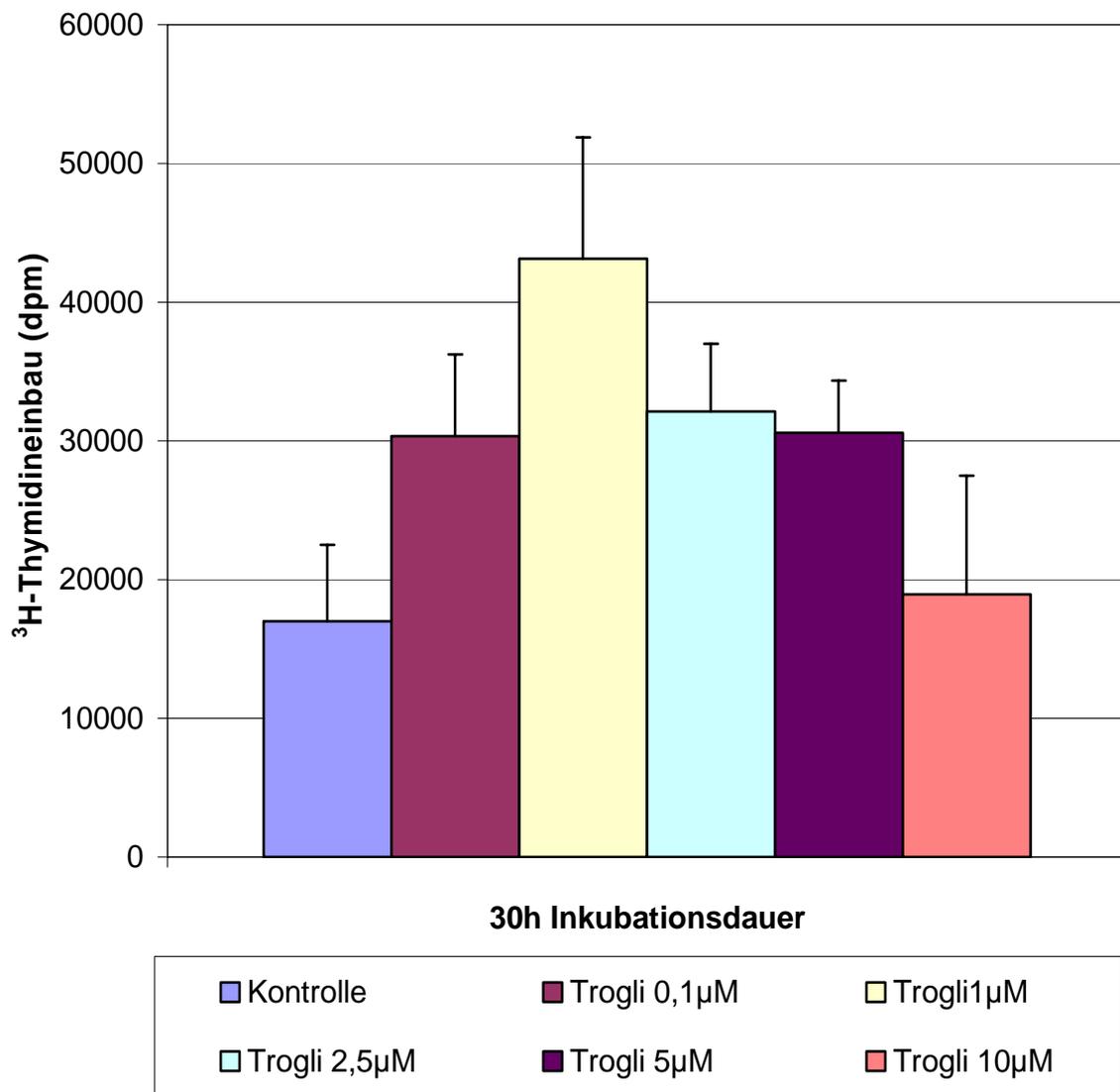
**Abb. 23a** Mittelwerte und SEM der Ergebnisse aus Abb. 23 normiert auf die Kontrolle.



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



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



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

## **Danksagung**

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

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Machicao und Frau Rettig für die Hilfe bei der PPAR $\gamma$ -Quantifizierung und bei Herrn Nencioni für seine Hilfe bei der FACS-Analyse bedanken.

Auch Herrn Dr. Eichner vom Institut für Medizinische Biometrie gebührt mein Dank für die statistische Beratung.

Weiterhin möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Innere Medizin IV/ Isotopenlabor für ihre Hilfsbereitschaft und kollegiale Zusammenarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Jens Reuther und meiner Schwester Silke Fischer für das stets gewährte Verständnis während der Zeit der praktischen Versuche und für die kritische Korrektur der schriftlichen Arbeit.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern Erika und Herbert Fischer sowie bei meiner Großtante Hedwig Geisert für die Unterstützung während meines Studiums herzlich bedanken.

## **Lebenslauf**

### **Simone Manea Fischer**

Geb. am: 08.02.1979

Geburtsort: Stuttgart

### **Schulbildung**

1985-1989 Breitwiesengrundschule Gerlingen

1989-1998 Gymnasium Gerlingen

Juni 1998 Abschluss mit dem Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife

### **Hochschulbildung**

1998-2004 Studium der Zahnmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

26. 5. 2004 Staatsexamen

### **Berufstätigkeit**

Seit 12/2004 Assistentenstelle