

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Polyklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV

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

**Der Einfluss von all- trans-Retinol,
13-cis-Retinsäure und Lycopin-Nano-Partikeln
auf den ¹²⁵I- Iodid und ³H-Thymidin-Stoffwechsel
von kultivierten Schweinethyreozyten.**

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der
der Zahnheilkunde**

**Der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
BEATE KRAUS
aus Stuttgart
2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wahl

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. E. Fröhlich

Meiner Mutter und
in ewiger Erinnerung Kim, Oma Barbara und meinem Vater
gewidmet.

.

Danksagung

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

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

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

Für die unschätzbare Hilfe von Frau Inge Fink (geb. Benz) im Isotopenlabor bin ich sehr dankbar.

Ebenfalls möchte ich mich bei Frau PD Dr. Eleonore Fröhlich für die Mithilfe und Beratung zur immunhistochemischen Darstellung des NIS herzlich bedanken.

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

Verzeichnis der Abkürzungen

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

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

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
1. Material	8
1.1 Geräte für die Zellkulturen	8
1.2 Einwegartikel, Kulturgefäße und Filter	8
1.3 Chemikalien + Reagenzien	8
1.4 Radioaktive Chemikalien	10
1.5 Medien + Lösungen	10
1.6 Antikörper und Marker für den Immunoblot	11
1.7 Reagenzien für den Western-Blot	13
2. Methoden	15
2.1 Präparation/ Isolierung von Schilddrüsenzellen	15
Flußdiagramm	17
2.2 Zellzählung	18
2.3 Herstellung der Thyreozytenkulturen	18
2.4 Strukturformeln der Stimulanzien	19
2.5 Kulturbedingungen	20
2.6 Zellernte zur Messung der Iodid- und Thymidinaufnahme in die Thyreozyten	20
2.7 Messung der Iodid- und Thymidinaufnahme in die Thyreozyten	20
2.8 Mycoplasmennachweis	21
2.9 Immunhistochemischer Nachweis von NIS	21
2.10 Vorbereitung für den NIS-Nachweis in Thyreozyten	21
2.11 Statistische Auswertung	25

3. Ergebnisse	26
3.1 ³ H-Thymidin- und ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an all-trans-Retinol und 13-cis-Retinsäure	26
3.2 ³ H-Thymidin- und ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von Lycopin	41
3.3 ³ H-Thymidin- und ¹²⁵ I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit eines Ciprobay®-Zusatzes zum Kulturmedium	60
3.4 Immunhistochemischer Nachweis von NIS in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen an Vitamin A im Kulturmedium	62
4. Diskussion	65
4.1 Methoden	65
4.2 All-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure und Lycopin-Nanopartikel	66
4.3 Radioiodidaufnahme	70
4.4 Thymidinaufnahme	71
4.5 Einfluß von all-trans-Retinol auf die Expression von NIS-Protein	75
4.6 Ciprobay®-Zugabe zum Kulturmedium und seine Auswirkung auf die Iodid- und Thymididnaufnahme	76
5. Zusammenfassung	80
5.1 Zusammenfassung Thymidinaufnahme	80
5.2 Zusammenfassung Iodidaufnahme	81
5.3 Zusammenfassung NIS	82
6. Literatur	83
7. Anhang	93
7.1 Zahlenwerte der Abbildungen im Ergebnis-Teil	93
7.2 Normierte Abbildungen zur Einschätzung der Wirkungsprofile der Substanzen	111

Einleitung

Ca. 200 Millionen Menschen leiden weltweit unter einer Struma (Meng et al. 1992, Hampel et al. 1993). Sie stellt ein Leitsymptom verschiedener Schilddrüsenerkrankungen dar. Die Struma wird am häufigsten durch Iodmangel verursacht. Auch andere Ursachen wie Schilddrüsenmalignome, Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Morbus Basedow oder eine akute Thyreoiditis können mit einer Schilddrüsenvergrößerung einhergehen. Iod gilt als Schlüsselement der Schilddrüse. Es wird über die Nahrung aufgenommen, im Dünndarm als anorganisches Iodid resorbiert und via Blutbahn der Schilddrüse zugeführt. Dort wird es gegen ein Konzentrationsgefälle energieabhängig in die Schilddrüse transportiert. Für die Iodaufnahme in die Schilddrüse ist ein spezielles Membranprotein zuständig. Es wird als Natrium-Iodid-Symporter (NIS) bezeichnet. Dieser Symporter sitzt an der basolateralen Membran der Thyreozyten und wird durch TSH stimuliert. 1996 wurde der Na^+/I^- -Symporter erstmals von Dai et al. aus FRTL-5-Zellen kloniert und sequenziert. Er weist eine ausgeprägte Homologie zu dem 1997 aus einer humanen Schilddrüsen-CDNA-Bibliothek klonierten humanen NIS auf. (Smanik PA et al. 1997).

Der NIS besteht aus 1834 Nukleotiden, welche für ein aus 618 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 70-90 kDa kodieren. Außer in der Schilddrüse wurde der NIS auch in Speicheldrüsen, Tränendrüsen, in der Magenschleimhaut, im Ziliarkörper des Auges, in der Haut, der Placenta, im Plexus choroideus und in der aktiven Milchdrüse nachgewiesen (Carrasco N. et al., 1993). Bei Patienten mit Morbus Basedow zeigt sich eine deutlich erhöhte Anzahl von NIS, womit die erhöhte Iodidaufnahme bei dieser Erkrankung erklärt werden kann. (Caillou et al. 1998, Castro et al. 1999, Saito et al. 1997, Spitzweg, 1999).

Der Nachweis von NIS allein beweist jedoch noch keine gesicherte Iodaufnahme, Sait et al. fanden in papillären Schilddrüsenmalignomen eine gesteigerte NIS-Expression, jedoch keine Radioiodidaufnahme. Über einen Defekt des NIS-Gens wurde erstmals 1997 berichtet (Fujiwara et al., 1997). Auch die

Möglichkeit einer kompetitiven Hemmung des NIS durch verschiedene Anionen, wie zum Beispiel Perchlorat (Lawrence et al. 2000) ist bekannt.

Der tägliche Iodbedarf liegt laut WHO bei ca. 150- 250 µg täglich. Das in Schilddrüsenhormone eingebaute Iod spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum, der Differenzierung und der zellulären Funktion. Iod wird nicht nur in Schilddrüsenhormone eingebaut, sondern auch in Steuersubstanzen, die das Wachstum der Schilddrüse steuern. Zwei Steuersubstanzen werden in der Literatur beschrieben. Es handelt sich dabei um α -Iodoheptadecanal und das δ -Iodolacton. Diese Substanzen hemmen die Wirkung der Wachstumsfaktoren IGF I und EGF, indem sie die Synthese von TGF- β , einem Wachstumsinhibitor, fördern (Gärtner 1993). TGF- β 1 hemmt die Funktion des NIS (Kawagucki, 1997). NIS wird ebenso durch Interferon γ und Interleukin α gehemmt (Pekary 1998, Ajjan 1998, Spitzweg 1999).

Ein Mangel an Iod führt zunächst zu einer Hyperplasie und über einen TSH-Anstieg auch zu einer Hypertrophie der Thyreozyten. Klinisch resultiert ein Kropf. Im Gefolge eines Kropfes können sich dann benigne und maligne Schilddrüsenknoten entwickeln.

In den Schilddrüsenstoffwechsel greift auch Vitamin A (Retinol) ein (Morley et al. 1980; Schreck et al. 1994; Sucov et al. 1995). Vitamin A gehört chemisch zu den Retinoiden. Diese Stoffgruppe umfasst eine Reihe natürlicher und synthetischer Verbindungen mit ähnlicher chemischer Struktur bei teils unterschiedlichen Wirkungen. Natürliche Retinoide kommen nur in tierischen Produkten vor. Pflanzen enthalten dagegen die als Provitamin A bezeichneten Carotinoide, die im menschlichen Körper in Retinol umgewandelt werden. Man unterscheidet Carotinoide mit Vitamin A- Aktivität und solche ohne Vitamin A- Aktivität. Von den ca. 400 bekannten Carotinoiden besitzen 50 eine Vitamin A- Aktivität (Olson, 1994). Die Aufnahme des Retinols und seiner Derivate in die Zelle erfolgt über sogenannte RBP-Rezeptoren (Retinol Binding Protein-Receptors) an der Oberfläche der Zielzellen. Das Zytosol der Zielzellen wiederum enthält Bindungsproteine für Retinol und Retinsäure, CRABP 1+2 für Retinsäure und CRBP I+II für Retinol. Diese Bindungsproteine vermitteln den Transfer der Retinoide zu den nukleären Rezeptoren im Zellkern. (s. Abb. 0.1, S.7)

Diese Rezeptoren (RXR, RAR) sind nicht nur in normalen Schilddrüsengewebe, sondern auch in verschiedenen Schilddrüsenkarzinomzellen nachweisbar (Schmutzler, 1996).

Retinoide regulieren im Körper wichtige Prozesse in der Entwicklung, der Morphogenese, der Organogenese, der Differenzierung, des Wachstums und des Stoffwechsels. Wirkungen von Retinoiden, z.B. im Sehzyklus, können jedoch auch an ausdifferenzierten Geweben nachgewiesen werden (Sucov et al. 1995).

Bereits 1947 behandelte Simkins Schilddrüsenüberfunktionen mit hohen Dosen an Vit. A, doch aufgrund seiner toxischen Nebenwirkungen wurde diese Methode nie in großem Umfang angewendet. Ein ganz analoger Einfluss der Retinoide auf den Schilddrüsenhormonstoffwechsel wurde später von Morley et al. (1978) und Garcin et al. (1983) bei Ratten beschrieben: Bei diesen wurde ein Vitamin A- Mangel mit einer gesteigerten Serumkonzentrationen an Schilddrüsenhormonen assoziiert.

Bei bestimmten Malignomen (vor allem bei der Promyelozytenleukämie, bei Gebärmutterhalskrebs, bei metastatischem und bei squamösem Hautkrebs) zeigen Retinoide einen stark antiproliferativen Effekt (Smith et al. 1992, Weis et al. 1994, Fenaux et al. 1996, Camacho, 2003). Auch an Schilddrüsenzellen wurde ein Einfluss der Retinoide auf die Genregulation der Proliferation nachgewiesen (Schreck et al. 1994; Morley et al. 1980). Retinoide wirken molekularbiologisch als Liganden von nukleären Transkriptionsfaktoren, die nach Bindung an entsprechende DNA-Sequenzen die Transkription von benachbarten Zielgenen beeinflussen (Mangelsdorf et al. 1992). Retinoide können auch eine Apoptose induzieren. (Nagy et al. 1995).

Schilddrüsenmalignomzellen, die nicht mehr zur Aufnahme und Speicherung von Radioiodid in der Lage waren, konnten durch eine Retinoltherapie diese Fähigkeit zurückgewinnen (Simon et al. 1996). Fenretinid, ein synthetisches Retinoid hat antiproliferative Eigenschaften, senkt den Plasmaspiegel von IGF I (Torrise et al. 1993) und ist dabei weniger toxisch als all-trans-Retinsäure. An Zelllinien aus follikulären Schilddrüsenkarzinomen (FRTL-5-Zellen) führte der Zusatz von Retinoiden zu einer verstärkten Iodidaufnahme und teilweise zu

einer Redifferenzierung der Tumorzellen. (Schreck et al. 1994, Schmutzler et al. 1996, Wahl et al. 1996, Fröhlich und Wahl, 1999).

Bei Versuchen an MCF-7 Zellen (humane Mamma-Karzinomzellen) konnte die Iodidaufnahme durch Retinsäure um bis zum 9-fachen gesteigert werden. Dieser Effekt war auf eine erhöhte Expression von NIS- mRNA durch die Retinsäure zurückzuführen ist. (Koagi et al. 2000). Körber et al. behandelten 1998 im Rahmen einer klinischen Pilotstudie 75 Schilddrüsenkarzinompatienten, deren Prognose schlecht war, mit 13-cis-Retinsäure. Bei einem Teil der Patienten konnte eine Verkleinerung der TumorgroÙe, Stagnation des Tumorwachstums oder gar ein völliger Rückgang des Tumors verzeichnet werden. Bei knapp der Hälfte der Patienten wurde eine Steigerung der Radioiodaufnahme festgestellt, wobei die Nebenwirkungen der 13-cis-Retinsäure-Behandlung relativ gut toleriert wurden. Aufgrund der vielen Nebenwirkungen der Retinoide bei Anwendung in hohen Dosen, wird ständig nach Alternativen gesucht.

Die Retinoide weisen mit den Carotinoiden eine Strukturverwandschaft auf. Beide bestehen aus Isopren-Einheiten. Carotinoide sind seit langer Zeit als Antioxidantien bekannt, ebenso ihr protektiver Effekt gegenüber der zellzerstörenden Wirkung von UV-Licht auf licht sensible Zellen (Krinsky, 1979). Von allen Carotinoiden hat Lykopen die höchste Sättigungskonstante für Singulett-Sauerstoff (Di Mascio, 1989). In einer statistischen Untersuchung konnte nachgewiesen werden, dass Tomaten (sie enthalten sehr viel Lykopen, aber kaum andere Carotinoide) zu einer verminderten Inzidenz von Krebs in Mund, Rachen, Speiseröhre, Magen, Dickdarm und Rectum führen (Franceschi, 1994).

Lykopen gehört zu den nicht zyklischen Carotinoiden ohne Provitamin A-Aktivität, da es keine β -Ionon-Ring-Struktur besitzt. Es enthält jedoch elf konjugierte Doppelbindungen. Es liegt in Plasma und Geweben in unveränderter Form vor und kann bei Bedarf schnell in Retinol umgewandelt werden. Lykopen kommt in vielen Früchten vor, vor allem in Hagebutten und Tomaten. Lykopen ist äußerst empfindlich gegen Licht, Hitze und Säuren, und obwohl beim Kochen ein großer Teil des Lykopens zerstört wird, zeigt sich eine höhere

chemopräventive Aktivität bezüglich Prostatakarzinomen und eine höhere Bioverfügbarkeit bei Produkten aus gekochten Tomaten, verglichen mit den rohen Früchten. Die Ursache könnte in einer Umwandlung des Lycopins in einen aktiveren Metaboliten liegen (H. Gerster, 1997). In einer Untersuchung von Snowdown (1996) wurde gezeigt, dass Lycopin im Gegensatz zu anderen Carotinoiden eine wichtige Rolle für die Rüstigkeit von älteren Menschen spielt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Serumkonzentration an Lycopin und einer Alters-Maculadegeneration. Mares-Perlman zeigte 1995 in einer Studie, dass sich die Wahrscheinlichkeit eines Netzhautschadens bei Probanden verdoppelt, wenn deren Serum-Lycopingehalt im unteren Fünftel des Normwertes lag. Auch die Prävention von Herz- und Gefäßkrankheiten durch den Verzehr lycopinhaltiger Nahrung wurde beschrieben (Clinton, 1998). Eine stark antiproliferative Wirkung von Lycopin konnte 1995 von Levy et al. an Krebszellen in vitro beobachtet werden. 2,6-Cyclolykopin-1,5-diol ist ein durch Oxidation entstandenes Stoffwechselprodukt des Lycopins, welches in menschlichen Keratinozyten und T-Zellen die Expression des connexin 43-Gens erhöht und das Wachstum von menschlichen Prostatakarzinomzellen hemmt. 2,6-Cyclolykopin-1,5-diol kommt in Tomatenmark, Blutserum, Muttermilch und in der Retina vor (Traber et al. 1998). Matsushima-Nishawaki et al. stellten 1995 bei Maushepatozyten einen protektiven Effekt des Lycopins bezüglich der Entstehung des Liver-Tumor-Promoter Microcystin LR fest. Dieser Effekt beruht vermutlich auf der Unterdrückung der tumorinduzierten Phosphorylierung von Regulierungsproteinen und nicht auf einer Inaktivierung von Radikalen. Bei verschiedenen Karzinom-Zelllinien (MCF-7, NCI-H226) hemmt Lycopin in einer Konzentration von 5 mmol/ Liter die natürliche und IGF-I-induzierte Zellproliferation (Levy et al. 1995). Auch bei der Promyelozytenleukämie zeigte sich nach Lycopinbehandlung (10^{-5} mol/ Liter) eine 40%-ige Reduktion des Zellwachstums (Countryman et al., 1991), allerdings hatte Lycopin nur bei gleichzeitiger Behandlung mit Retinsäure Einfluss auf die Differenzierung der Zellen (Bankson et al. 1991). Lycopin führte auch zur Unterdrückung der Tumorbildung bei Mäusen mit hoher spontaner Mamma-Karzinom-Inzidenz (Nagasawa, 1995).

Zielsetzung

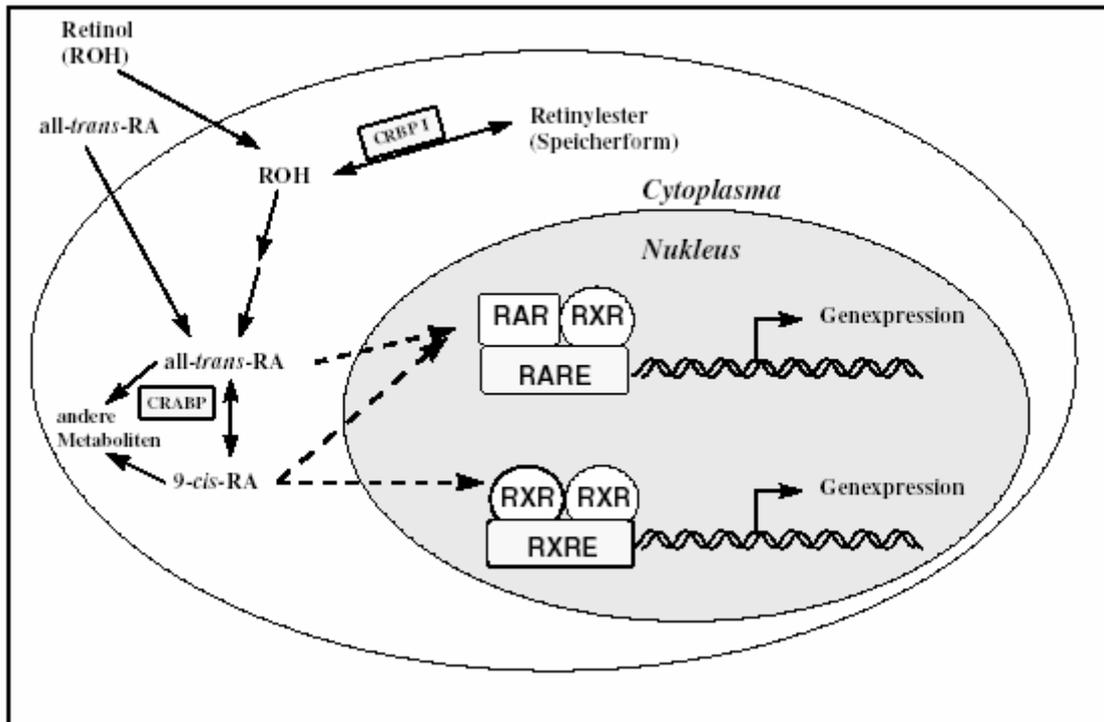
Es ist aus der vergangenen Beschreibung der Effekte des Lycopins naheliegend, die Wirkung von Lycopin auch bei Schilddrüsenmalignomen zu testen. Hierzu sind zunächst Untersuchungen an Zellkulturen notwendig. Da nicht bekannt ist, welchen Effekt Lycopin auf normale, nicht transformierte Schilddrüsenzellen hat, soll in der vorliegenden Arbeit zunächst diese Fragestellung abgeklärt werden, denn bei einer Behandlung von malignem Schilddrüsengewebe ist stets auch benignes Gewebe mitbetroffen. Im Gegensatz zu Retinoiden sind von Lycopin bisher keinerlei Nebenwirkungen bekannt.

Problematisch ist bei den Untersuchungen die schlechte Beständigkeit des Lycopins gegenüber Hitze und Licht, sowie sein Unvermögen, sich in Wasser zu lösen. Es löst sich nur in für Zellkulturen unverträglichen Lösungsmitteln. Es muß daher für Untersuchungen an Zellen in Liposomen eingebaut werden, wobei die Bioverfügbarkeit wesentlich von deren Größe abhängt. Eine weitere und wahrscheinlich optimalere Möglichkeit ist die Verwendung des Lycopins in Form von Nanopartikeln. In dieser Zubereitungsform wird Lycopin daher in den folgenden Versuchen verwendet. In Form von Nanopartikeln, deren Schutzhülle aus Gelatine besteht, wird das Lycopin „wasserlöslich“ gemacht, aber auch vor Auskristallisation geschützt. Aufgrund ihrer geringen Größe sollten die Nanopartikel problemlos in die Schilddrüsenzellen gelangen können und damit optimal bioverfügbar sein.

Konkretes Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Einfluss von Retinol und von 13-cis-Retinsäure mit dem Einfluss von Lycopin auf den Thymidin- und Iodstoffwechsel von normalen Schweinethyreozyten zu vergleichen. In einem weiteren Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Retinol auf die Expression von NIS in nicht transformierten Thyreozyten mittels Immunenzymtechnik untersucht. Außerdem wurde der Einfluss von einem in unserem Kulturmedium enthaltenen Antibiotikum Ciprofloxacin auf den Thymidin- und Iodstoffwechsel untersucht.

Abb. 0.1

Intrazellulärer Metabolismus von Retinol zu seinen aktiven Isomeren, deren Weiterleitung mittels entsprechender Transportproteine, sowie die Wirkung als Liganden an nukleären Transkriptionsfaktoren. (Arnold 2000).



1. Material

Untersuchungsmaterial

Zur Herstellung der Zellkulturen wurden pro Ansatz in Abhängigkeit von der Zahl der Experimente 10 - 26 Schweineschilddrüsen benötigt. Die Schilddrüsen stammten von ca. neun Monate alten Schweinen aus Mastbetrieben in der Umgebung des Schlachthofs Gärtringen / Baden-Württemberg. Die genaue Herkunft der Schweine, sowie die Zusammensetzung der verabreichten Futtermittel lässt sich durch uns nicht zurückverfolgen.

1.1 Geräte für die Zellkulturen

Sterile Werkbank, Ceag Shirp, Typ C 636 H , (Selm, Borg)

Zentrifuge Hettich Roto Silenta/K (Hettich, Tuttlingen)

Zentrifuge Hettich Rotixa /RP (Hettich, Tuttlingen)

Umkehrmikroskop Carl-Zeiss 5100671 (Zeiss, Oberkochen)

Thermo Quest Inkubator (Modell 3111; Forum Scientific Inc. USA),

5%-ige CO₂-Begasung bei 37,0° und Wasserdampfsättigung

Inotech Cell-Harvester, IH 280, Inotech AG, Schweiz

Liquid Scintillation Counter, Pharmacia Wallac 14.10 (Perkin-Elmer-Wallac GmbH; Freiburg)

Gamma Counter, Multi Crystal; LB 2103 und LB 2101 (Berthold; Wildbad)

1.2 Einwegartikel, Kulturgefäße und Filter

Zentrifugenröhrchen, 50 ml, Falcon® 2070 Blue Max, (Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg)

Zentrifugenröhrchen, 5 ml, 12,0 x 75mm, GLKL-Röhrchen 115 101 (Greiner Labortechnik, Nürtingen)

Szintillationsröhrchen, 6ml, 12 x 75mm, Pico-Prias-Vial 6000102 (Packard BioScience B.V., Niederlande)

Gewebekulturflaschen, 25cm² (70ml), Vented Blue Plug Seal Cap 3109, (Becton Dickinson, Heidelberg)

Kulturgefäße, Tissue Culture Cluster Mark II, 6 wells, Costar 3506, (Corning Incorporated, USA)

Kulturgefäße, Tissue Culture Cluster Mark II, 48 wells, Costar 3548, (Corning Incorporated, USA)

Glasfaserfilter 11731, für Cell-Harvester, (Skatron Instruments, Hamburg-Norderstedt)

sterile Einwegfilter, Minisart, 17597 (0,25 µm) und 17998 (0,45 µm), (Sartorius AG, Göttingen)

1.3 Chemikalien + Reagenzien

- Ultroser[®]G; insulinhaltiger Serumersatz, Lyophilisat, 67042, 18 x 10ml, (IBF Biotechnics, Villeneuve-la-Garenne, Frankreich); 20ml/ Liter NCTC-Medium
- Hydrocortison[®]100; 13,67 mg Hydrocortison-21-hydrogensuccinat, Natriumsalz 133,67 mg/ Ampulle, entspr. 100 mg Hydrocortison (Pharmacia & Upjohn GmbH, Heppenheim)
- Ciprobay[®] 200, Ciprofloxacin (Breitbandantibiotikum der Chinolon- Gruppe); (Bayer AG, Leverkusen); 30ml/ Liter NCTC- Medium
- Penicillin-Streptomycin (500x), Penicillin 50.000 U/ ml, Streptomycin 50mg/ ml Lyophilisat, (Boehringer, Mannheim);
50.000 U Penicillin, 0,05 g Streptomycin, aufgelöst in 20 ml Aqua dest.
Konzentration pro Liter NCTC-Medium: 10.000 U Penicillin und 10 mg Streptomycin
- Amphotericin B, Squibb Pharma München (Durchstechflasche mit 50 mg Amphoericin B+ 41 mg Natriumdesoxycholat als Lösungsvermittler in 10 ml aqua dest. gelöst)
- all-trans-Retinol (Vit.A), approx. 70%, synthetic, All-trans R-7632, 100 mg, (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)
- Natriumbicarbonat, 7,5%, Gibco, Schottland, Lot 3011124

- 13-cis-Retinoic-Acid (Isotretinoin), R-3255 ,100 mg, (Sigma Chemical Co., St. Louis,USA)
- Lycopene-BASF (10 CWD) (BASF, Ludwigshafen)
- Ultima Gold TM , Szintillationscocktail, (Packard BioScience B.V., Niederlande)

1.4 Radioaktive Chemikalien

- ¹²⁵I-Iodid (Sodium Iodide in NaOH solution), IMS 30, 3,9 GBq/ ml, (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, England)
- Thymidin (6-³H-Thymidine), TRK 61; 37MBq/ ml, (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, England)

1.5 Medien + Lösungen

- Erythrosin B; Indikator für Mikroskopie, 10µl in 145µl Spinnerlösung + 45µl Zellsuspension, (Merck, Darmstadt)
- Dispase II (neutral protease) from Bacillus polymyxa, grade II, 5g/ L (Roche, Mannheim)
- NCTC-135-Medium mit Vitamin A; (0,6µM) (Gibco, Paisley, Schottland)
- NCTC-135-Medium ohne Vitamin A ,Lot.No. 3012287 (Spezialanfertigung, Gibco, Paisley, Schottland)
- Earle´s B.S.S. (buffered salt solution), gepufferte Salzlösung nach Earle, ohne NaHCO₃ (Gibco, Paisley, Schottland)
- Ampuwa ^R steriles pyrogenfreies aqua ad injectabilia, 1000 ml, (Boehringer Ingelheim)
- Steriles pyrogenfreies aqua ad injectabilia, 10 ml, (Braun)
- Lösung nach Spinner :
100ml Earle´s B.S.S. + 900ml steriles H₂O + ca.6 ml Natriumbicarbonat 7,5% (pH ca. 7,2).
- Lösung für den Transport der Schilddrüsen vom Schlachthof zum Labor:
Lösung nach Spinner mit Zusatz von Antibiotika und Antimykotica: pro Liter Medium 50 ml Ciprobay[®] 200 + 10 ml Amphotericin B
- Dispase Lösung: 80 ml Lösung nach Spinner, darin 5 g Dispase II (neutral

protease) gelöst und durch 0,45 µm Sterilfilter gepreßt.

1.6 Antikörper und Marker für den Immunoblot

Für die Immunreaktion wurden folgende Antikörper (AK) verwendet:

AK₁ : NIS 5, ein Kaninchenantikörper, Verdünnung 1:2000 zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. B. Czarnocka, Warschau.

Dieser Antikörper ist gegen die Aminosäuren 629-643 des carboxyterminalen Endes des menschlichen NIS- Proteins gerichtet.

AK₂ : anti rabbit goat IgG biotinyliert, 1:500, Dianova, Hamburg

Alle Antikörper in TBS (Tris buffer saline) gelagert.

Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurde der Antikörperverdünnungslösung Serum von der Ziege (normal goat serum, Dianova, Hamburg) beige-mischt.

Marker: low molecular weight markers der Fa. Pharmacia (14400-94000 Da), zur Identifizierung der Proteine

SD Schwein: Von Frau Inge Benz (Isotopenlabor, Med. Klinik Tübingen) zur Verfügung gestellte Schweineschilddrüsenzellen früherer Kulturen, um feststellen zu können, ob sich die Reaktionen der aktuellen Zellen von denen früherer Zellen unterscheiden.

Streptavidin- Biotin, alkalische Phosphatase gekoppelt, Dako, Dänemark

Farbstoff: p- Nitroblautrazoliumchlorid (NBT), 1:140 verdünnt

Reagenzien für die Elektrophorese:

Laufpuffer nach Lämmli (10-fach Konzentrat)

Tris ¹⁾	MG 121,1	0,25M	15g
Glycin	MG 75,07	1,92M	77g
<u>SDS</u>		<u>1%</u>	<u>5g</u>
Aqua bidest.			ad 500ml

Vor Gebrauch: 1:10 mit Aqua bidest weiter verdünnen.

Gel für die diskontinuierliche Elektrophorese:

In der Mini-Elektrophoresekammer von Biorad können gleichzeitig zwei Gele laufen, daher werden im folgenden die Zutaten für 2 Trenngele aufgelistet.

Trenngel :

= untere Phase des Gels, dient der Auftrennung des Proteingemisches nach dem Molekulargewicht. Notwendige Reagenzien nach Vorschrift von Serva, Heidelberg für 12,5%- iges Gel:

Acrylamid-bis-solution 40% ¹⁾	4,695 ml
Separating buffer 4x	3,75 ml
Water demin.	6,405 ml
SDS 10%-ig ¹⁾	0,15 ml
TEMED ¹⁾	0,0225 ml
APS 10%-ig ¹⁾	0,045 ml

Trenngelpuffer (= Separating buffer), 4-fach konzentriert (1,5M Tris/ HCl, pH 8,8)

18,2 g Tris ¹⁾ in 50 ml aqua bidest. lösen + ca.2,8 ml HCl 32% auf pH 8,8 einstellen, dann mit aqua bidest auf 100ml auffüllen

Sammelgel :

= obere Phase, dient der Startverkürzung

Notwendige Reagenzien nach Vorschrift von Serva, Heidelberg für 5%-iges Gel:

Acrylamid-bis-solution 40 % ¹⁾	0,625 ml
Stackinggel buffer, 4x	1,25 ml
Water demin.	3,075 ml
SDS 10%-ig ¹⁾	0,05 ml
TEMED ¹⁾	0,0075 ml
APS 10%-ig ¹⁾	0,015 ml

Sammelgelpuffer (= Stacking-Gel buffer), 4-fach konzentriert

(0,5M Tris/ HCl, pH 6,8)

6,1g Tris ¹⁾ in 50 ml aqua bidest. lösen + 4,4ml HCl 32% (pH auf 6,8 einstellen).

Mit aqua bidest. auf 100ml auffüllen.

Probenpuffer, 2-fach konzentriert

Sammelgelpuffer 4x	2,5 ml
SDS 10% ¹⁾	4,0 ml
Glycerol ¹⁾	2,3 ml
2- Mercaptoethanol ¹⁾	0,5 ml
Bromphenolblau ¹⁾	1,0 mg
aqua bidest.	0,7 ml

1) = von der Firma Serva Elektrophoresis GmbH, 69115 Heidelberg bezogen. Die Reagenzien haben die Katalog Nr.:

Acrylamid-bis-solution 12,5%:	Kat. # 10680
SDS 10%-ig	# 20763
SDS für Laufpuffer	# 20760
Tris	# 37190
Glycerin	# 23175
Glycerin für Laufpuffer	# 23390
2-Mercaptoethanol	# 28625
Bromphenolblau	# 15375
TEMED	# 35925
APS 10%-ig	# 13375
Trizma Base	# 37190
Coomassie ® brilliant blue, 0,1 % (Imperial Industries PLC, USA)	

1.7 Reagenzien für den Westernblot:

Benötigte Lösungen:

- **Blotting Puffer nach Towbin**, pH 8,5; Temp.: 4°C

TrizmaBase ¹⁾	MG 121,1	25mM	3,03g
Glycin	MG 75,07	192mM	28,82g
Methanol		20%	200ml

Aqua dest.	ad 1000ml
------------	-----------
- **Methanol** (damit PVDF-Folien equilibrieren)

Für die Sandwichtechnik:

2 Schwämme

2 Lagen Gel- Blotting Papier (Schleicher und Schüll)

1 PVDF Membran (PVDF= polyvinylidene fluoride)

Ponceau S solution 0,2%

Kassette in Sandwichtechnik packen:

- luftblasenfrei arbeiten, Luftblasen verhindern den Proteintransfer
- Kassetten aufklappen und in folgender Reihenfolge auf die klare Seite packen
- 1. Schwamm, 2. Filterpapier, 3. Membran, 4. Gel, 5. Filterpapier, 6. Schwamm
- Sandwich zusammenklappen und mit Klammer sichern.

Blot -Tank :

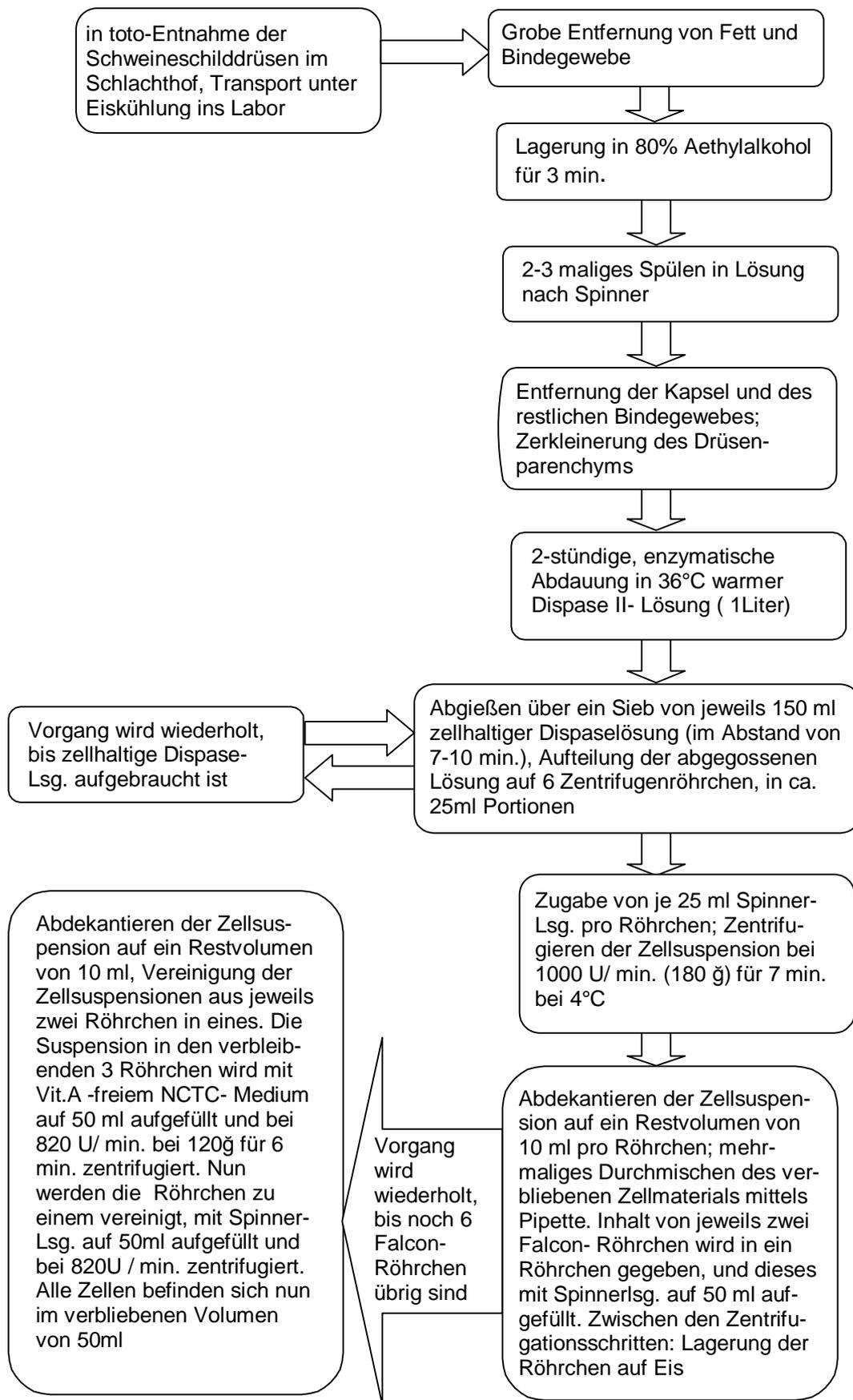
- bestückte Kassette in Kammerführung stecken (schwarz-schwarz, weiß-rot)
- Kammer mit ca. 450 ml Blotting Puffer, 4°C, füllen, Rührfisch in Kammer geben
- komplette Kammer auf Magnetrührer stellen, mittelstarkes Rühren auf einem Magnetrührer
- Bloten bei 4° C , 30 mV, im Kühlschrank über Nacht

2. Methoden

2.1 Präparation/ Isolierung von Schilddrüsenzellen

Die Entnahme der Schilddrüsen mit umgebendem Fett- und Bindegewebe erfolgt weitgehend aseptisch im Schlachthof aus dem Halseingeweide-Lungen-Präparat. Die entnommenen Schilddrüsen werden in eisgekühlter, antibiotika-haltiger Spinnerlösung gelagert und unter möglichst sterilen Bedingungen ins Labor transportiert. Im Labor erfolgt die weitere Verarbeitung der Schilddrüsen unter einer sterilen Reinraumwerkbank mit horizontaler Luftströmung. Zunächst werden angeschnittene Schilddrüsen aussortiert und verworfen. Die zu verarbeitenden Schilddrüsen werden aus dem umgebenden Binde- und Fettgewebe mittels steriler Pinzette und Schere herausgelöst. Um die Bindegewebskapsel von den Schilddrüsen besser entfernen zu können, werden sie für 3 min. in 80%-igem Ethanol belassen und zwei- bis dreimal mit Spinnerlösung nachgespült. Die leicht anfixierte Kapsel und das septale Bindegewebe können nun mit 2 sterilen Pinzetten besser entfernt werden. Im folgenden Schritt wurden die Schilddrüsen nacheinander mit einem sterilen Skalpell in 2 - 3 mm große Stücke geschnitten. Um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden, werden die präparierten Gewebstücke während der Arbeitsschritte in eisgekühlter Spinnerlösung aufbewahrt. Die so verarbeiteten Zellen sowie die zuvor in 80 ml warmer Lösung nach Spinner aufgelöste Dispase II (über 0,45 µm Minisart Einwegfilter steril filtriert), werden dann in ein steriles Trypsiniergefäß (V= 1l) gegeben und dieses mit Lösung nach Spinner auf 1 Liter aufgefüllt. Die enzymatische Abdauung des Parenchyms erfolgt in diesem Glaskolben im Wasserbad, welches auf eine konstante Temperatur von 36°C eingestellt ist. Ein Magnetrührgerät unter dem Wasserbad sorgt für eine Durchmischung der Gewebstücke zur besseren Abdauung. Der abgedeckte Glaskolben wird während des zweistündigen Rührvorgangs unter der Reinraumwerkbank belassen. Die durch abgelöste Zellen eingetrübte enzymhaltige Lösung wird nun nach und nach in einem zeitlichen Abstand von ca. 7 - 10 min, in Volumina von ca. 150 ml durch zwei sterile Teesiebe in ein steriles Becherglas abgegossen.

Durch die Siebe werden gröbere Gewebsbestandteile zurückzuhalten. Die jeweils abgegossenen 150 ml Zelllösung werden auf sechs Zentrifugenröhrchen (Falcon, 50 ml) zu je 25 ml verteilt und diese mit Spinnerlösung jeweils auf 50 ml aufgefüllt. Die Röhrchen werden dann bei 1000 U/ min, dies entspricht 180 g, 7 min. bei 4°C zentrifugiert. Der Inhalt der Zentrifugenröhrchen wird dann bis auf ca. 10 ml Restvolumen abdekantiert und das zurückgebliebene Pellet mehrfach in eine Pipette aufgezogen und ausgeblasen. Hierdurch wird das Zellmaterial durchmischt und anschließend auf nur drei Zentrifugenröhrchen umverteilt. Diese werden erneut mit Lösung nach Spinner auf 50 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Wieder werden die Zentrifugenröhrchen abdekantiert, die Präzipitate resuspendiert und ihr Inhalt nun in einem Röhrchen vereint. Dieses wird mit Vitamin A- freiem NCTC-Medium auf 50 ml aufgefüllt. Die angesammelten Zellen werden dann bei nur 820U/ min (das entspricht 120 g) 6 min. abzentrifugiert. Dieser Präparationsvorgang wiederholt sich so lange, bis die gesamte Zellsuspension aufgebraucht und bis auf drei Zentrifugenröhrchen reduziert ist. Während der einzelnen Arbeitsschritte werden die zellhaltigen Zentrifugenröhrchen auf Eis gelegt. Im letzten Arbeitsschritt werden alle bislang gesammelten Zellen in einem Röhrchen vereinigt, dieses mit Spinnerlösung auf 50 ml aufgefüllt und bei 820 U/ min 6 min. zentrifugiert. Die Zellen dieses Röhrchens werden so oft mit Lösung nach Spinner gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abdekantiert, bis makroskopisch kein Erythrozytensaum mehr erkennbar ist. Zum Schluß wird das gewaschene Thyreozyten- Präzipitat in das endgültige Kulturmedium (NCTC-135 ohne Vitamin A) aufgenommen und das Volumen auf 50 ml eingestellt. Der gesamte Präparationsvorgang wird in Abb.1 auf der folgenden Seite in einem Fluss-Schema dargestellt.



2.2 Zellzählung

Die Auszählung der nun isolierten Schilddrüsenzellen erfolgt in einer Neubauer-Zählkammer. Um die Anzahl der toten Zellen von vornherein erfassen zu können, wird eine Ausschlußfärbung durchgeführt. Dabei werden nur devitale Zellen mit 1%-igem Erythrosin B (145 µl Spinnerlösung + 45 µl Zellsuspension + 10 µl Erythrosin B) angefärbt, nicht dagegen die vitalen Zellen.

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

2.3 Herstellung der Thyreozytenkulturen

Als Nährmedium wird, wenn nicht anders angegeben, NCTC-135-Medium ohne Vitamin A verwendet. Sofern Vitamin A- haltiges NCTC-Medium verwendet wurde, wurde eine 0,6 µM „physiologische“ Vitamin A- Konzentration eingesetzt. Dem Medium zugegeben werden ferner Ultrosor[®]G (3%) als Serumersatz, sowie Hydrocortison[®] 100 (1µg/ ml), Penicillin-Streptomycin (4%), Ciprobay[®] (3%).

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

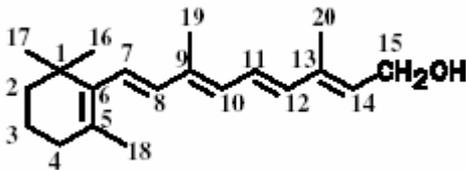
Die Zahl der vitalen Thyreozyten wurde im komplettierten Medium auf ca. 1300000/ ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden jeweils 200µl mit ca. 133000 Thyreozyten in die 48 Kulturlöcher der Costar[®]-Platten ausgesät. Jedem Kulturloch wurde wahlweise 4 kBq Na¹²⁵I oder 12kBq ³H-Thymidin und verschiedene Testsubstanzen zugeführt. In die 6 Loch-Kulturgefäße von Costar wurden jeweils 4,5 ml des zellhaltigen Mediums (ca. 3000000 Thyreozyten) einpipettiert (der Zellgehalt wurde in diesen Ansätzen auf 0,5 Mio. Zellen / 0,75 ml Medium eingestellt) und mit den Test-

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

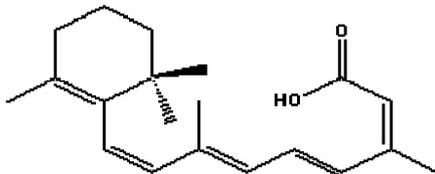
- All-trans-Retinol:
2,6 nmol / 200µl entsprechend einer 13 µM Endkonzentration im Medium
- 13-cis-Retinsäure:
2,6 nmol / 200 µl entsprechend einer 13 µM Endkonzentration im Medium
- Lykopen Nanopartikel BASF:
2,6 nmol / 200 µl entsprechend einer 13 µM Endkonzentration im Medium

2.4. Strukturformeln der Stimulanzen:

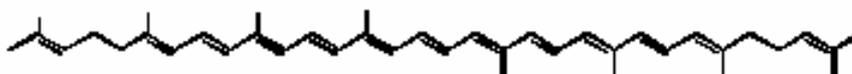
All-trans-Retinol: $C_{20}H_{29}OH$



13-cis-Retinsäure: $C_{20}H_{28}O_3$



Lykopen: $C_{40}H_{56}$



Retinol und seine Derivate wurden, damit sie in Lösung gehen, in reinem Methanol gelöst. Um eine Zersetzung von Retinol oder seiner Derivate durch Licht zu umgehen, wurden die Versuche im abgedunkelten Raum durchgeführt.

2.5 Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden unter Lichtabschluß in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37° C mit 95% Luft und 5% CO₂ begast und unterschiedlich lange (zwischen 18 und 72 h), aber mindestens 18 h lang inkubiert. Vitale Zellen haben sich mit zunehmender Inkubationsdauer am Plattenboden verankert.

2.6 Zellernte zur Messung der Iodid- und Thymidinaufnahme in die Thyreozyten

Zur Messung der Iodid- und Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurden dem Medium Na ¹²⁵I-Iodid und ³H-Thymidin zupipettiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zellernte mittels eines Zellharvesters (Inotech AG Typ CH 5605) auf Glasfiltermatten. Die geernteten Zellen wurden zweimal mit Aqua demineralisata nachgespült. Die Filtermatten mit den an ihnen haftenden Zellen wurden in Meßröhrchen überführt und die darin enthaltene Radioaktivität gemessen. Diese entspricht dann der aufgenommenen Aktivität von Na ¹²⁵I oder ³H-Thymidin.

2.7 Messung der Iodid- und Thymidinaufnahme in die Thyreozyten

Nach Einbringen der ausgestanzten und mit Zellen beladenen Filterpapiere in 6 ml- Szintillationsgefäße wurde zusätzlich noch 5 ml Ultima Gold[®] (handelsüblicher Szintilationscocktail) in die Gefäße einpipettiert und diese der Messung von ¹²⁵I-Iodid und ³H-Thymidin im Flüssigkeits-Szintillationszähler (pharmacia wallac 1410, Wallac GmbH Freiburg) mit entsprechender Spektrumseinstellung zugeführt. In einigen Versuchen wurde die Iodidaufnahme zusätzlich noch im Gamma-Counter (berthold Typ multi-crystal- LB 2101) gemessen. Hierzu wurden die Filtermatten vor der Messung im β-Counter in Meßröhrchen (PS-Röhrchen GLKL 5 ml, Greiner Labortechnik) eingebracht und ohne Zusatz von Szintillationsflüssigkeit die Radioaktivität gemessen.

2.8 Mycoplasmennachweis

In unseren Versuchen wurden Primärkulturen verwendet. Die hierfür verarbeiteten Schweineschilddrüsen stammen aus dem Schlachthof, daher ist eine Kontamination mit Mycoplasmen denkbar, welche die Meßergebnisse der Thymidinaufnahme verfälschen könnten. Aufgrund der geringen Größe der Mycoplasmen mit einem Durchmesser von ca. 0,8 µm kann davon ausgegangen werden, daß sie die Poren der Glasfiltermatten mit einer Porengröße von 1,5 µm im Durchmesser ungehindert passieren konnten und somit dem Meßvorgang entzogen sind. Die Mycoplasmenfreiheit der Proben wurde dennoch mittels Mycoplasma Detection Kitt (1296744, Encyme Immunoassay; Roche AG) überprüft.

2.9 Immunhistochemischer Nachweis von NIS

Der immunhistochemische Nachweis von NIS in den präparierten und inkubierten Schweineschilddrüsenzellen wurde im Anatomischen Institut/ Tübingen mittels Westernblotting durchgeführt. Bei dieser Technik werden die Proteine aus Schilddrüsenzellhomogenaten ihrer Größe nach in einer denaturierenden Elektrophorese aufgetrennt und das immunoreaktive Protein nach Überführung auf eine Folie mit einem spezifischen Antikörper grob quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgt über einen Vergleich der nach Anfärbung erhaltenen „Banden“ mit einer Kontrolle. Sinn der Immunreaktion war es, festzustellen, ob in der Zellkultur NIS, welcher für die Iodidaufnahme in Thyreozyten zuständig ist, unter verschiedenen Versuchsbedingungen exprimiert wird.

2.10 Vorbereitung für den NIS- Nachweis in Thyreozyten

Um bei einem Ansatz eine Immunreaktion durchführen zu können, waren mindestens 18 Mio. Zellen notwendig. Hierfür wurden Zellen, die 3 Tage bei

37° C und 5% CO₂ inkubiert wurden, aus mehreren Kulturlöchern mittels Schaber abgelöst und gepoolt. Um Fremdsalze, welche die spätere Elektrophorese behindern könnten, auszuspülen, wurde die erhaltene Zellsuspension noch weitere 3x in Homogenisierungspuffer gegeben, für je drei min. bei 612g zentrifugiert und das Volumen der Zellsuspension auf 200 µl eingestellt. Von diesen 200 µl wurden 20 µl zur Proteinbestimmung nach Bradford entnommen, die restlichen 180 µl wurden mechanisch mit einem Spatel homogenisiert, mit der gleichen Menge an Probenpuffer versetzt und jeweils 20µl in vorbereitete, beschriftete Eppendorf-Röhrchen hineingegeben. Die Eppendorf-Röhrchen wurden für 5 min. mit geöffnetem Deckel bei 95° C gekocht und anschließend mit geschlossenem Deckel in den Gefrierschrank gestellt. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit Jodacetamid (15%) im Verhältnis 5:1 weiterverdünnt. (5 Teile Proteinprobe, 1 Teil Jodacetamid). Jodacetamid diente der Alkylierung der SH-Gruppen. Dadurch wurde verhindert, dass die SH- Gruppen während der Präparation wieder oxidiert wurden und somit uneinheitliche Aggregate entstehen könnten. Die Proben waren damit zur Gel-Elektrophorese bereit. Das Kochen der Zellen diente der Denaturierung der Proteine, damit diese eine einheitliche Form annehmen. Durch die zusätzliche Bindung an SDS, welches im Probenpuffer enthalten war, bekamen die Proteine zusätzlich noch eine einheitliche Ladung. Somit war allein die Größe der Proteine für die Auftrennung bei der Elektrophorese entscheidend und nicht eventuell unterschiedliche Tertiärstrukturen oder Oberflächenladungen.

Ablauf:

Nach Stimulation mit den unten aufgeführten Substanzen und dreitägiger Bebrütung im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen zunächst für eine diskontinuierliche Gel-Elektrophorese (bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel) vorbereitet. Durch Vorschalten des weitmaschigeren Sammelgels vor das engmaschigere Trenngel wurde ein Molekularsiebeffekt erzielt und durch die zusätzliche Gegenwart des Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) erfolgte nun die Proteinauftrennung ausschließlich nach deren Molekulargröße, da die Anlagerung von SDS an die Proteine etwaige Ladungsunterschiede auf-

hob. Es blieben daher zuerst die großen Moleküle im Elektrophorese-Gel hängen. Ein bei der Elektrophorese mitlaufender Marker, welcher Proteine mit definierten Molekulargewichten enthält (low molecular weight marker; 14400-94000 Da; Fa. Pharmacia), ermöglichte anschließend die Identifizierung der getrennten Proteine aus den Proben. Um bei allen Laufproben die gleiche Proteinmenge einzusetzen und die maximale Proteinmenge von 150 µg pro Geltasche nicht zu überschreiten, wurde vor dem Beschicken des Elektrophorese-Gels eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Hierzu wurden von jeder Probe 10 µl abgenommen (bei einem Ansatz ausnahmsweise nur 5µl Proteinlösung), mit 900 µl Bradford-Lösung vermennt und im Photometer (Spectrophotometer 600) bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Als Kontrollwert diente eine Mischung aus 10µl aqua dest. +900 µl Bradford-Lösung. Entsprechend dieser Messung wurden nun folgende Volumina der Proben in die Geltaschen pipettiert:

Inkubation in Vit. A- freiem Medium:			Inkubation in Vit.A- haltigem Medium		
Retinol (-)		14,00 µl	Retinol (-)		14,00 µl
Retinol 13 µM		14,00 µl	Retinol 13µM		14,00 µl
Retinol 26 µM		16,50 µl	Retinol 26µM		14,00 µl
Retinol 65 µM		30,00 µl	Retinol 65µM		14,00 µl

Die Elektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen gestartet:

Stromstärke:	2 Ampere
Sammlung der Proteine für	20 min. bei 80V
Auftrennung der Proteine für	50 min. bei 200V
Gesamtdauer:	70 min.

Die Proteine befanden sich nun auf dem Elektrophorese-Gel, welches allerdings für die anschließende Immunreaktion ungeeignet war, da die Proteine aus dem Gel wieder herausdiffundieren können. Daher wurden die aufgetrennten Proteine mittels Westernblot auf eine geeignete Membran übertragen, an welche sie fest gebunden werden. Hierzu wurden die Elektrophorese-Gele vorsichtig aus den Gel-Trägern (= Spacer) gelöst, zur späteren Unterscheidung

an einer Ecke markiert und dann in eine mit Blottingpuffer gefüllte Petrischale gegeben und für 15 min. auf dem Schüttler eingeweicht. Dieser Vorgang (Equilibrierung) wurde durchgeführt, um alle vom SDS herrührenden Salze herauszuwaschen. Auch die für den Westernblot notwendigen Membran und das Filterpapier wurden im Blottingpuffer getränkt. Die Blot-Membranen wurden aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften zunächst in Methanol getränkt. Jetzt wurden die sogenannten „Blotting-Sandwiches“ gepackt und der Blot gestartet bei: Spannung: 100V; Stromstärke: 0,19 Ampere. Die Laufzeit betrug 1-1,5 h. Anschließend wurden die Membranen / Gele entnommen und die Gele mit Coomassie blue® (0,1%) , die Membranen mit Ponceaurot® (0,2%) gefärbt. Die Gelfärbung mit Coomassie blue® bewirkte die Denaturierung und Fixierung der Proteine auf dem Gel und diente dem Sichtbarmachen der auf dem Gel zurückgebliebenen Proteine. Die Färbung der Membranen mit Ponceaurot® ist aufgrund der Wasserlöslichkeit von Ponceaurot® reversibel und ermöglichte daher im Anschluss eine ungehinderte Antikörperreaktion.

Antikörperreaktion:

Die in Methanol getränkte und getrocknete PVDF-Folie wurde über Nacht in Milchpulver (5% in TBS) gelagert, um unspezifische Antigene zu binden. Anschließend wurde 3x 5 min. mit TBS/ 0,1% Tween gespült. Die Spülung setzte die Oberflächenspannung der Membranen herab und verhinderte ebenfalls unspezifische Bindungen bei der folgenden Antikörperreaktion:

die Membranen wurden hierzu für 2 h mit dem 1. Antikörper (NIS 5, Antikörper von Kaninchen; 1:2000) inkubiert.

Die Antikörperlösung enthielt 1µl AK +50µl NGS+ 0,984 ml TBS/ 0,1% Tween.

Als Kontrolle diente die gleiche Lösung jedoch ohne Zusatz des AK. Nach Ablauf der zweistündigen Inkubationszeit wurden die Membranen wiederum 3x 5 min. in TBS/ 0,1% Tween gewaschen und dann für 1 Stunde mit dem 2. AK (anti rabbit biotin 1:1500) inkubiert. Dieser biotinylierte Zweitantikörper bindet an den Erstantikörper. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde die Membran erneut 3x 5 min mit TBS/ 0,1% Tween gewaschen und dann für eine Stunde mit Streptavidin-Biotin AP (1:2000) inkubiert. Die an das Streptavidin gekoppelte alkalische Phosphatase (AP) katalysierte im Anschluß die Farbreaktion mit

dem Farbstoff NBT (p-Nitroblautetrazoliumchlorid). Nach einstündiger Inkubation mit Streptavidin wurden die Membranen für 3 x 5 min. gründlich gewaschen und für die Farbreaktion vorbereitet. Diese musste aufgrund der Lichtempfindlichkeit des Farbstoffes NBT im Dunkeln statt finden. Die Farbstofflösung wurde in einer Verdünnung 1(NBT):140 (aqua dest.) verwendet. Die Membranen mussten mindestens 15 min. in dieser Lösung verweilen. Wurde NIS in den Kulturen produziert, kam es nun über die Markierung mit den Antikörpern und Streptavidin zu einer Blaufärbung auf den Membranen.

2.10 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit dem Dunnett`-Test. Mit diesem Test konnten innerhalb jedes Zeitpunktes alle Kombinationen aus Substanz und Konzentration mit dem jeweiligen Kontrollwert verglichen werden. Die Wahrscheinlichkeit einer fehlerhaften Interpretation liegt bei diesem Verfahren unter 5%. Signifikante Ergebnisse beziehen sich auf ein Gesamtsignifikanzniveau von $\alpha = 5\%$. Ergebnisse gelten im Dunnett` Test als signifikant, wenn $p < 5\%$ ist und die Werte positiv sind. Für die Durchführung wurde das Statistikprogramm JMP5 von SAS installiert. Für die statistische Beratung und Betreuung danke ich Herrn Priv. Doz. Dr. Eichner, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

Die Statistik ist im Anhang (Kap.7) aufgeführt. Es finden sich dort zusätzlich Abbildungen (Kap. 7.2), in denen die über alle Inkubationszeiten gemessenen Aufnahmeraten von ^{125}I -Iodid und ^3H -Thymidin gemittelt und auf die Kontrolle normiert wurden. Diese Abbildungen wurden bei der Diskussion berücksichtigt. Dadurch ergibt sich zusätzlich zum augenblicklichen Effekt auch ein Gesamteindruck vom Wirkungsprofil der Substanzen.

3. Ergebnisse

3.1 ^3H -Thymidin- und ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweine-thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Konzentrationen an all- trans- Retinol und 13-cis-Retinsäure

Für die Kulturen wurde retinoidfreies NCTC-Medium verwendet, das mit variablen Retinoidkonzentrationen ergänzt werden konnte. Die Thyreozyten wurden zunächst in Medium mit niedriger Retinoidkonzentration für 3 Tage vorinkubiert. (Ansätze I-III) Danach wurde das Medium gewechselt und die Retinoide in pharmakologischen Konzentrationen eingesetzt. Die zugesetzte Menge an Retinoiden pro Kultur mit 200 μl Medium betrug für die Vorinkubation 0; 0,098 nmol und 0,196 nmol. Die Konzentrationen waren dementsprechend 0; 0,49 μM und 0,98 μM . Nach dem Mediumwechsel wurden pro Kultur mit 200 μl Medium (Vitamin A- Gehalt 0,6 μM) 2,6 nmol an Retinoiden eingesetzt. Die Retinoidkonzentration war dementsprechend 13 μM . Die eingesetzte Zellzahl pro 200 μl Kulturmedium betrug 130 000 Zellen. Ab dem Ansatz IV wurden die Substanzen den Kulturen direkt bei der Aussaat (ohne Vorinkubation) zugefügt. Als Parameter für ein potentielles Wachstum wurde den Kulturen beim Mediumwechsel 12 kBq ^3H -Thymidin zugefügt und die Thymidinaufnahmeraten in die Thyreozyten danach zwischen 2 und 65 h gemessen. Um die spezifische Stoffwechselfunktion der Iodidspeicherung der Thyreozyten zu erfassen, wurde Zellen der gleichen Präparation nach dem Mediumwechsel ^{125}I -Iodid (4 kBq / Kultur) zugegeben und die Radioiodidaufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 65 h verfolgt. Die Ergebnisse der Thymidin- und Radioiodidaufnahme sind in Abhängigkeit von den verschiedenen Vorinkubationsbedingungen in den Abb. 2 - 34 dargestellt. Als Kontrolle diente jeweils eine Kultur, die nach dem Mediumwechsel ohne Retinoidstimulation blieb. Als Retinoide wurden all-trans-Retinol und 13-cis-Retinsäure eingesetzt. Die Ergebnisse der Versuche wurden als signifikant bewertet, wenn bei der statistischen Auswertung $p < 0,05$ war. Die Radioiodid- und Thymidinaufnahme in kultivierte Thyreozyten verläuft phasenförmig. Für die Beurteilung der Iodid- und Thymidinaufnahme ist es

wichtig zu wissen, bei welcher Zeit man mit messbaren Effekten rechnen kann. Um das Wirkungsprofil von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure, Lycopin und Ciprobay insgesamt beurteilen zu können, sind im Anhang weitere Diagramme abgebildet in denen die Aufnahmeraten von Radioiodid, bzw. Thymidin in Prozent und normiert auf die Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation) dargestellt sind.

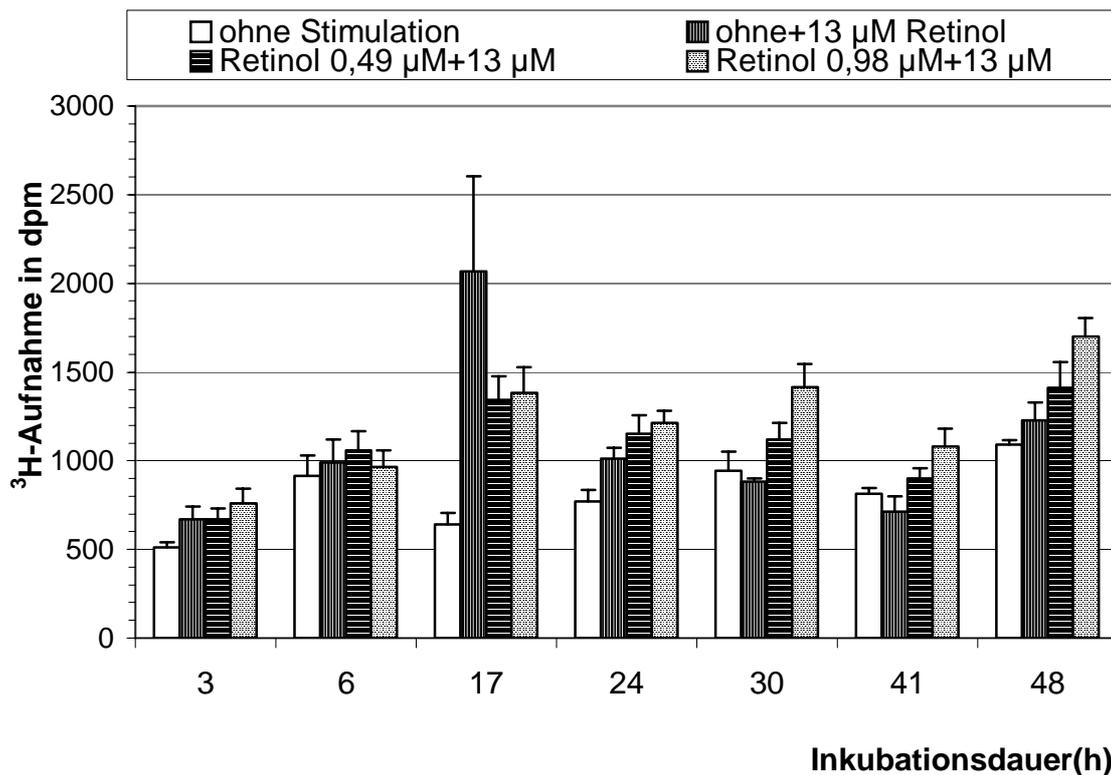


Abb.2a. Retinol (Ansatz I)

Abb.2. Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Retinol (2a) und 13-cis-Retinsäure (2b) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozyten mit je 13 μM Retinol oder 13-cis-Retinsäure nach jeweiliger Vorinkubation über 3 Tage mit dem entsprechenden Retinoid in 0; 0,49 oder 0,98 μM Konzentration. Das ^3H -Thymidin wurde beim Mediumwechsel den Kulturen zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 3 und 48 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch mit 200 μl : 130000, ^3H -Zugabe: 12 kBq ^3H -Thymidin. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 0.1 im Anhang.

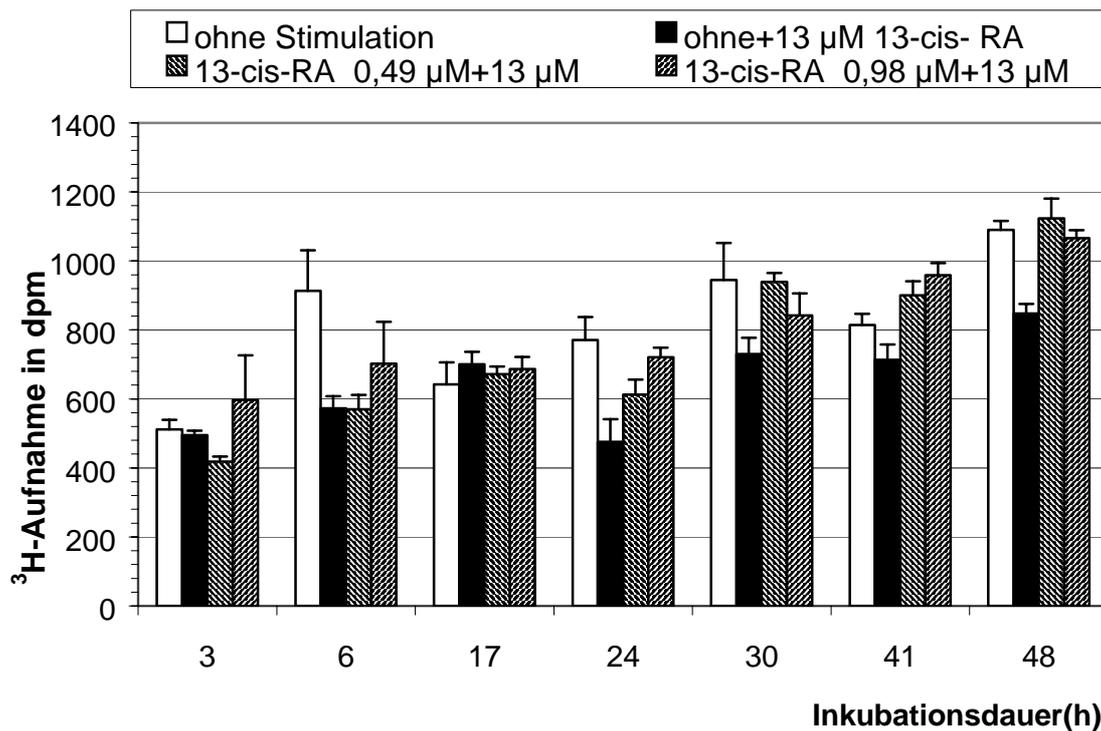


Abb.2b. 13-cis-Retinsäure (Ansatz I)

Wie Abb.2. zeigt, hatte die Zugabe von 13 µM Retinol, im Ansatz ohne Vorinkubation mit Retinol, über den gesamten Inkubationszeitraum einen verstärkenden Effekt auf die ³H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten. Zum Zeitpunkt t = 17h war die Thymidinaufnahme gegenüber der Kontrollgruppe um das 3,2-fache erhöht. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war signifikant (p<0,05). Anschließend kam es zu einem Abfall der ³H-Thymidinaufnahme und einem leichten Wiederanstieg nach 48 h. Der Kulturansatz mit 13 µM Retinol und Vorinkubation mit 0,49 µM Retinol bewirkte nach 17 h, 24 h und 48 h eine signifikant erhöhte ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten, während der Ansatz mit 13 µM Retinol nach Vorinkubation mit 0,98 µM Retinol zu allen Zeitpunkten eine signifikante Erhöhung gegenüber der Kontrolle bis zum 1,5-fachen hervorrief. Das Maximum der Thymidinaufnahme wurde dabei nach 48 h erreicht. Die Zugabe von 13-cis-Retinsäure bewirkte keine signifikanten Erhöhungen, sondern führte je nach Konzentration oder Zeitpunkt sogar zu einer verminderten Aufnahmerate. Retinol bewirkt im Gegensatz zu Retinsäure eine signifikant gesteigerte ³H-Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten.

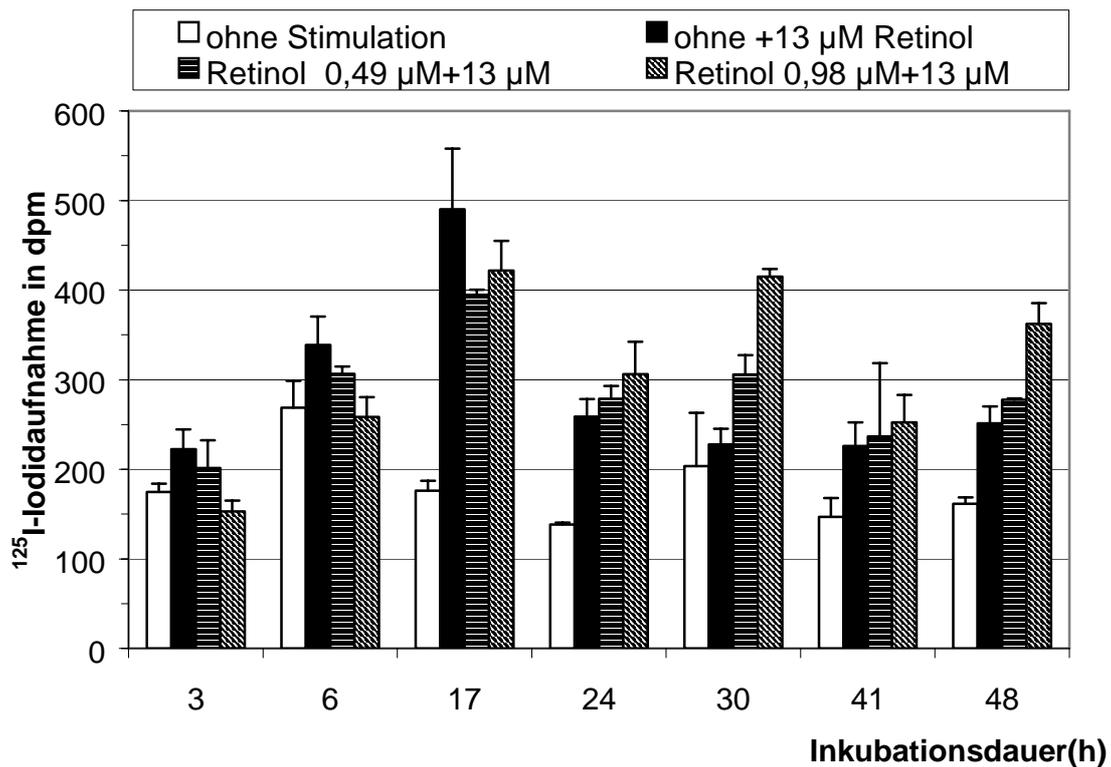


Abb.3a. Retinol (Ansatz I)

Abb.3. Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Retinol und 13-cis-Retinsäure auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten.

Stimulation der Thyreozyten mit je 13 μM Retinol oder 13-cis-Retinsäure nach jeweiliger Vorinkubation über 3 Tage mit dem entsprechenden Retinoid in 0; 0,49 oder 0,98 μM Konzentration. Das ^{125}I -Iodid wurde beim Mediumwechsel den Kulturen zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 3 und 48 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130000, ^{125}I -Zugabe: 4kBq ^{125}I -Radioiodid. (Messung im Betazähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 0.2 im Anhang.

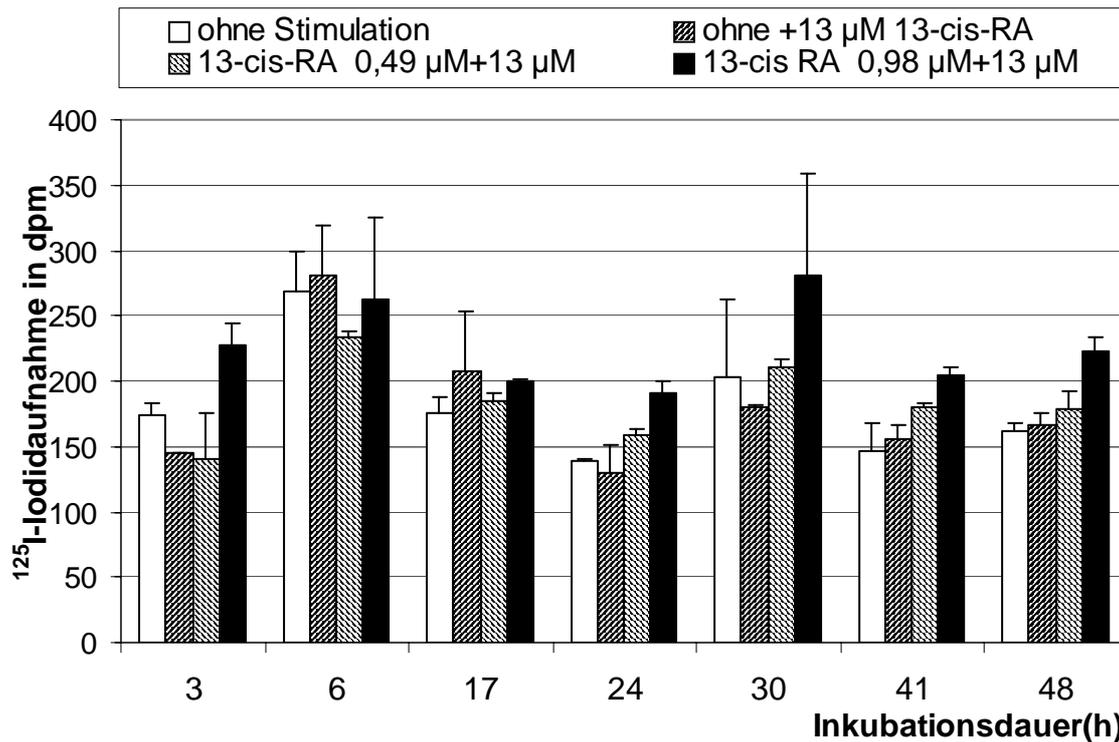


Abb.3b. 13-cis-Retinsäure (Ansatz I)

Wie die Abbildungen 3 zeigen, hatte Retinol nach $t = 17$ h, 24 h, 41 h und 48 h konzentrationsunabhängig einen signifikant verstärkenden Effekt auf die Iodidaufnahme in Schilddrüsenzellen gegenüber der nicht mit Retinol stimulierten Kontrolle. Retinol in einer Konzentration von $13 \mu\text{M}$ verstärkte nach Vorinkubation der Thyreozyten mit $0,98 \mu\text{M}$ Retinol erst nach einer Inkubationsdauer von $t = 30$ h die Radioiodaufnahme signifikant, zu früheren Zeitpunkten ($t = 3$ h und 6 h) war die Radioiodaufnahme sogar leicht vermindert. Unter 13-cis-Retinsäure konnte nach einer Vorinkubation mit $0,98 \mu\text{M}$ 13-cis-Retinsäure eine signifikante Erhöhung der Radioiodaufnahme nur nach einer Inkubationsdauer von 3 h, 30 h und 48 h gemessen werden, während nach einer Vorinkubation mit 0 oder $0,49 \mu\text{M}$ 13-cis-Retinsäure die Radioiodidaufnahme nur unwesentlich beeinflusst oder sogar vermindert wurde. (verminderte Radioiodidaufnahme unter 13-cis-Retinsäure im Ansatz ohne Stimulation während der Vorinkubationsphase bei $t = 3, 24, 30$ h; im Ansatz mit $0,49 \mu\text{M}$ Retinol im Vorinkubationsmedium bei $t = 3$ h und 6 h). Unter Retinol ist die Radioiodidaufnahme wesentlich ausgeprägter als unter 13-cis-Retinsäure.

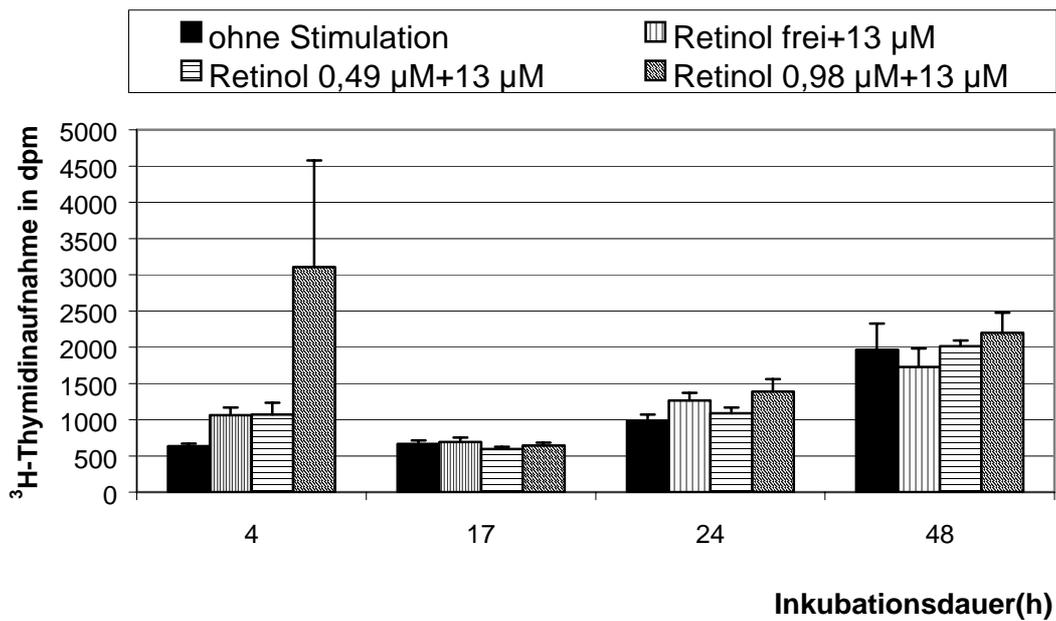


Abb.4a. Retinol (Ansatz II)

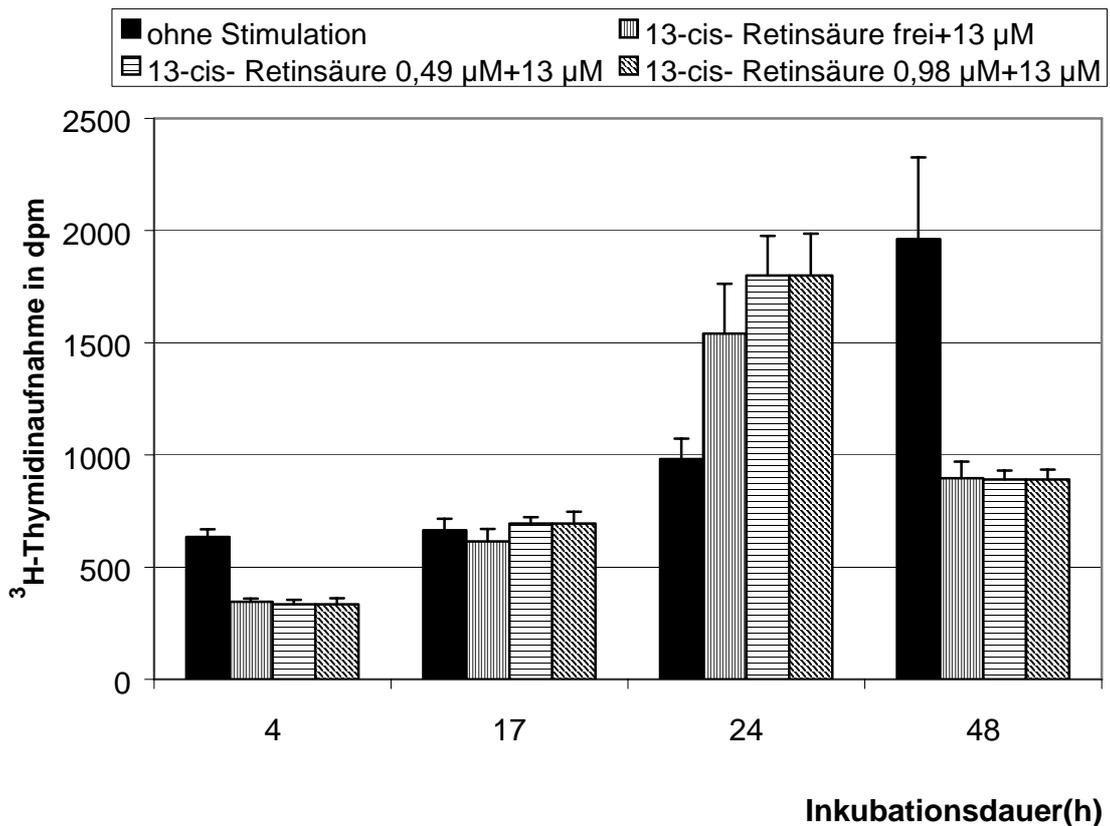


Abb. 4b. 13-cis-Retinsäure (Ansatz II)

Abb. 4. Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Retinol und 13-cis-Retinsäure auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten.

Stimulation der Thyreozyten mit jeweils 13 μM Retinol oder 13-cis-Retinsäure nach jeweiliger Vorinkubation über 3 Tage mit dem entsprechenden Retinoid in 0; 0,49 oder 0,98 μM Konzentration. Das ^3H -Thymidin wurde beim Mediumwechsel den Kulturen zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 3 und 48 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12 kBq ^3H -Thymidin. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 1.1 im Anhang.

Wie die Abbildungen 4 zeigen, bewirkte Retinol nach einer Inkubationszeit von 4 h in allen Konzentrationen eine signifikante Erhöhung der ^3H -Thymidinaufnahmerate, nach Vorinkubation mit 0,98 μM Retinol sogar um das 4,8-fache, verglichen mit der nicht stimulierten Kontrollgruppe. Danach zeigten alle mit Retinol stimulierten Zellen ähnliche Aufnahmeraten wie die nicht stimulierte Kontrolle. 13-cis-Retinsäure führte zu einer verminderten Thymidinaufnahme zum Zeitpunkt $t=4$ h. Nach 17 h zeigen sich in allen mit 13-cis-Retinsäure stimulierten Gruppen und der Kontrolle annähernd gleiche Aufnahmeraten, während sich die ^3H -Aufnahme nach 24 h in die mit 13-cis-Retinsäure stimulierten Thyreozyten signifikant erhöhte und nach 48 h wieder unter den Wert der nicht stimulierten Kontrolle abfiel.

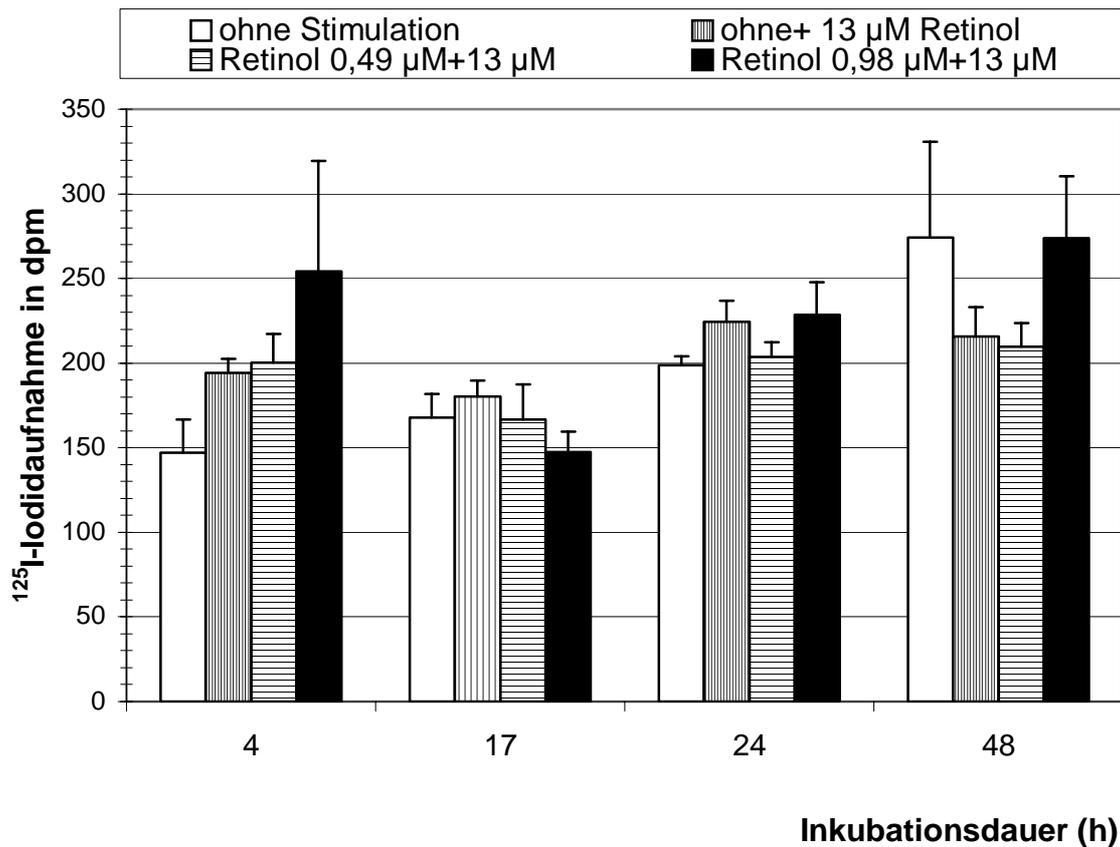


Abb.5a. Retinol (Ansatz II)

Abb.5. Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Retinol und 13-cis-Retinsäure auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozyten mit jeweils 13 μM Retinol oder 13-cis-Retinsäure nach jeweiliger Vorinkubation über 3 Tage mit dem entsprechenden Retinoid in 0; 0,49 oder 0,98 μM Konzentration. Das ^{125}I -Iodid wurde beim Mediumwechsel den Kulturen zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 4 und 48 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Zugabe: 4kBq ^{125}I -Iodid. (Messung im Betazähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 1.2 im Anhang.

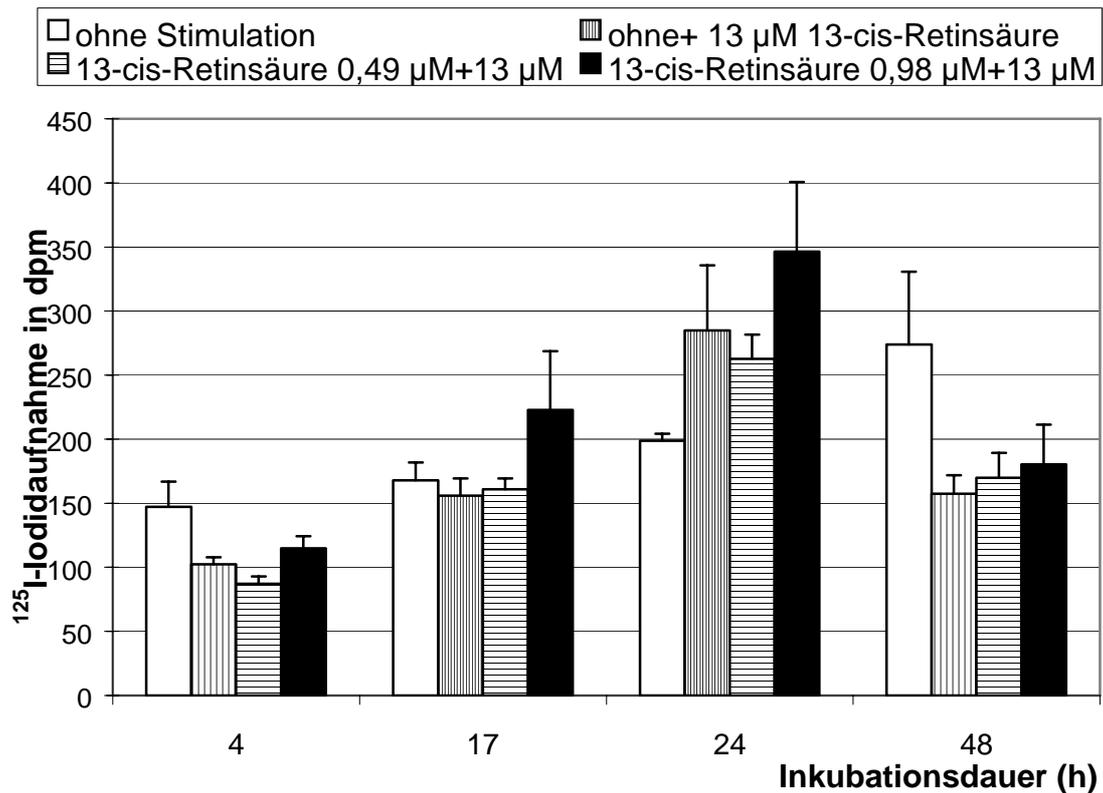


Abb.5b. 13-cis-Retinsäure (Ansatz II)

Wie die Abbildungen 5 zeigen, war bei den mit Retinol stimulierten Kulturen die Iodidaufnahmerate nach 4 h signifikant erhöht. Der Anstieg gegenüber der Kontrolle betrug das 1,7-fache, wenn die Zellen mit 0,98 µM Retinol vorinkubiert wurden. Die mit 13-cis-Retinsäure inkubierten Zellen wiesen nach 4 h eine deutlich verminderte Aufnahmerate auf. Nach 17 Stunden wichen weder die Aufnahmeraten unter 13-cis-Retinsäure noch unter Retinol sicher von jener der Kontrollkultur ohne Stimulation ab. Lediglich die Thyreozyten die mit 0,98 µM 13-cis-Retinsäure vorinkubiert wurden, zeigten hier nach erneuter Stimulation mit 13 µM 13-cis-Retinsäure eine signifikant erhöhte Iodidaufnahme um das 1,3-fache. Die Aufnahmeraten unter 13-cis-Retinsäure waren nach 24 h, verglichen mit der unstimulierten Kontrolle, alle, zum Teil signifikant um das 1,7-fache erhöht. In der Retinolgruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Nach 48 h sank die Iodidaufnahmerate in den stimulierten Thyreozyten unabhängig vom zugesetzten Retinoid wieder auf bzw. unter den Wert der nicht stimulierten Zellen der Kontrollgruppe.

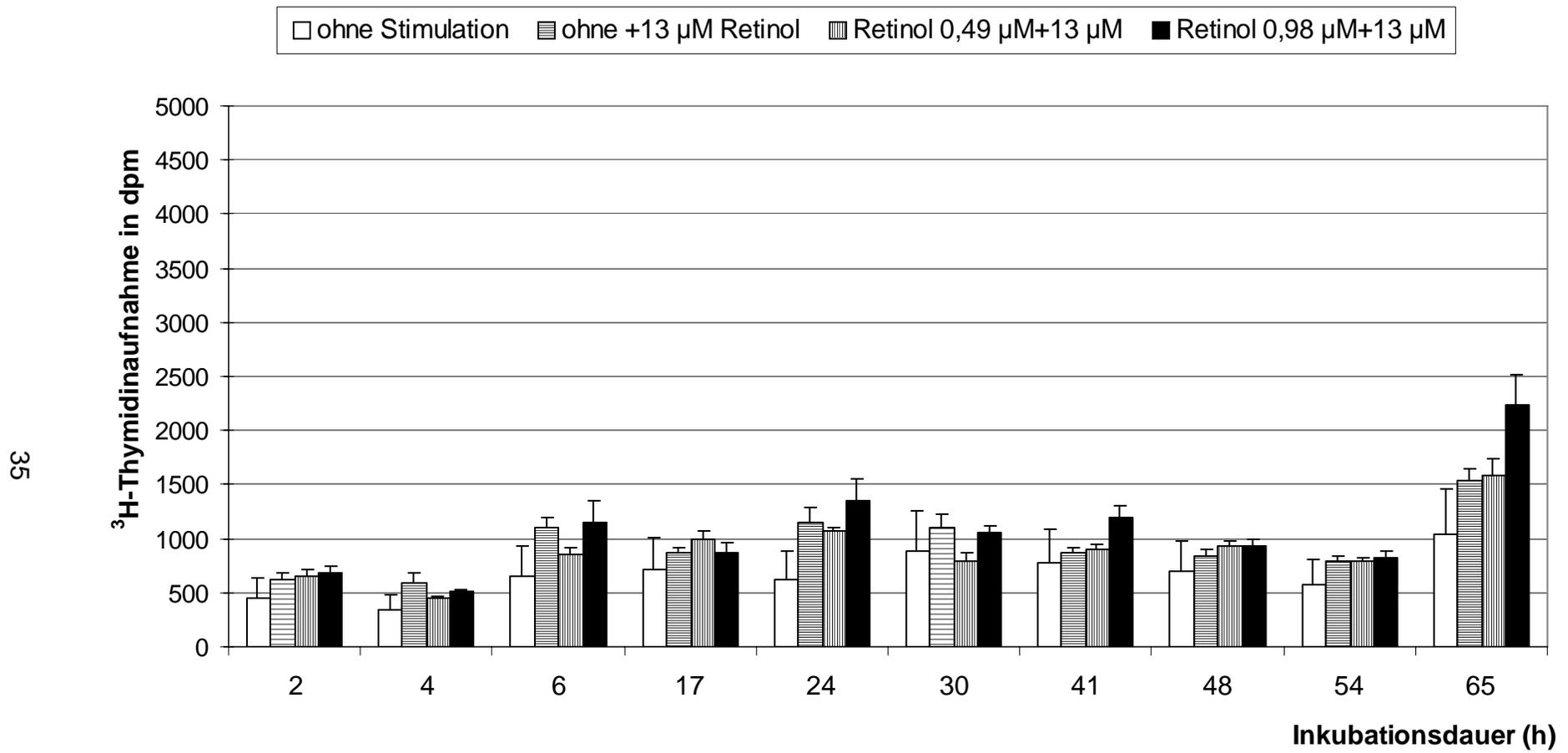


Abb.6a. Retinol (Ansatz III)

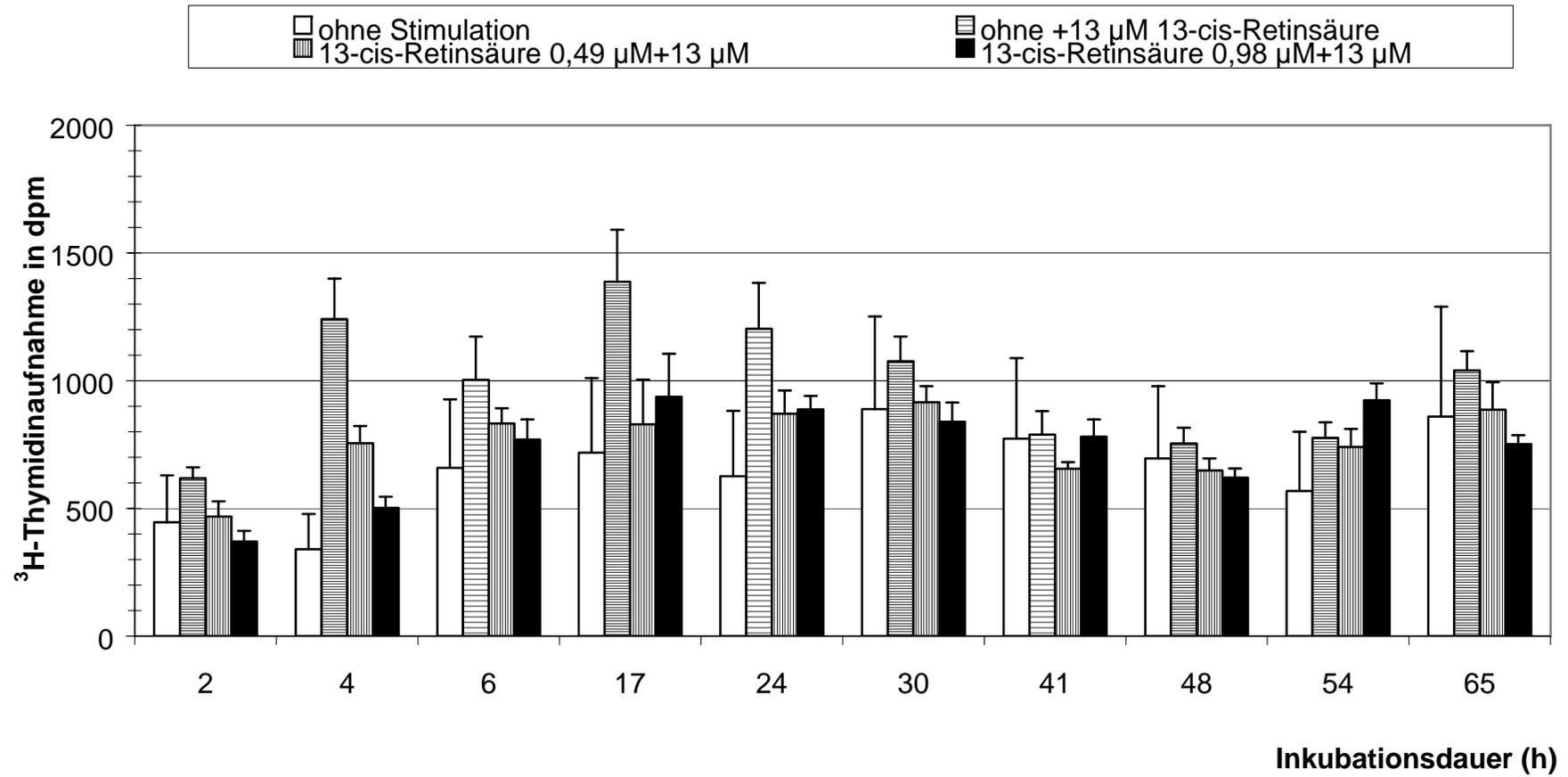


Abb.6b. 13-cis-Retinsäure (AnsatzIII)

Abb.6. Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Retinol und 13-cis-Retinsäure auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozyten mit 13 µM Retinol oder 13 µM 13-cis-Retinsäure nach jeweiliger Vorinkubation über 3 Tage mit dem entsprechenden Retinoid in 0; 0,49 oder 0,98 µM Konzentration. Das ³H-Thymidin wurde beim Wechsel des Mediums den Kulturen zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 65 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. n= 6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ³H-Zugabe: 12kBq ³H-Thymidin. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 2.1 im Anhang.

Wie Abb.6 zeigt, wiesen die mit Retinol stimulierten Kulturen insgesamt eine leichte Erhöhung der ³H-Thymidinaufnahme auf, signifikant waren diese Steigerungen jedoch nur nach 24 Stunden (Gruppe mit Vorinkubation 0,98µM). Der Anstieg betrug das ca. 2-fache gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle. Mit fortschreitender Inkubationsdauer kam es zu einem weiteren Ansteigen der Thymidinaufnahme, die nach 65 h in einem Maximum endete. Bei den mit 13-cis-Retinsäure stimulierten Thyreozyten war die ³H-Thymidinaufnahme nach 4 und 17 Stunden bei den Kulturen ohne Vorinkubation signifikant erhöht. Während die Aufnahme nach 4 und 17 h um das durchschnittlich 2- bis 3-fache anstieg, ergab die Messung nach 54 h einen deutlichen Anstieg gegenüber der nicht stimulierten Kontrollkultur. Aufgrund der großen Standardabweichungen bei den Messergebnissen der nicht stimulierten Zellen während des gesamten Inkubationszeitraumes, ist davon auszugehen, dass hier einige Messwerte sogenannte „Ausreißer“ sind.

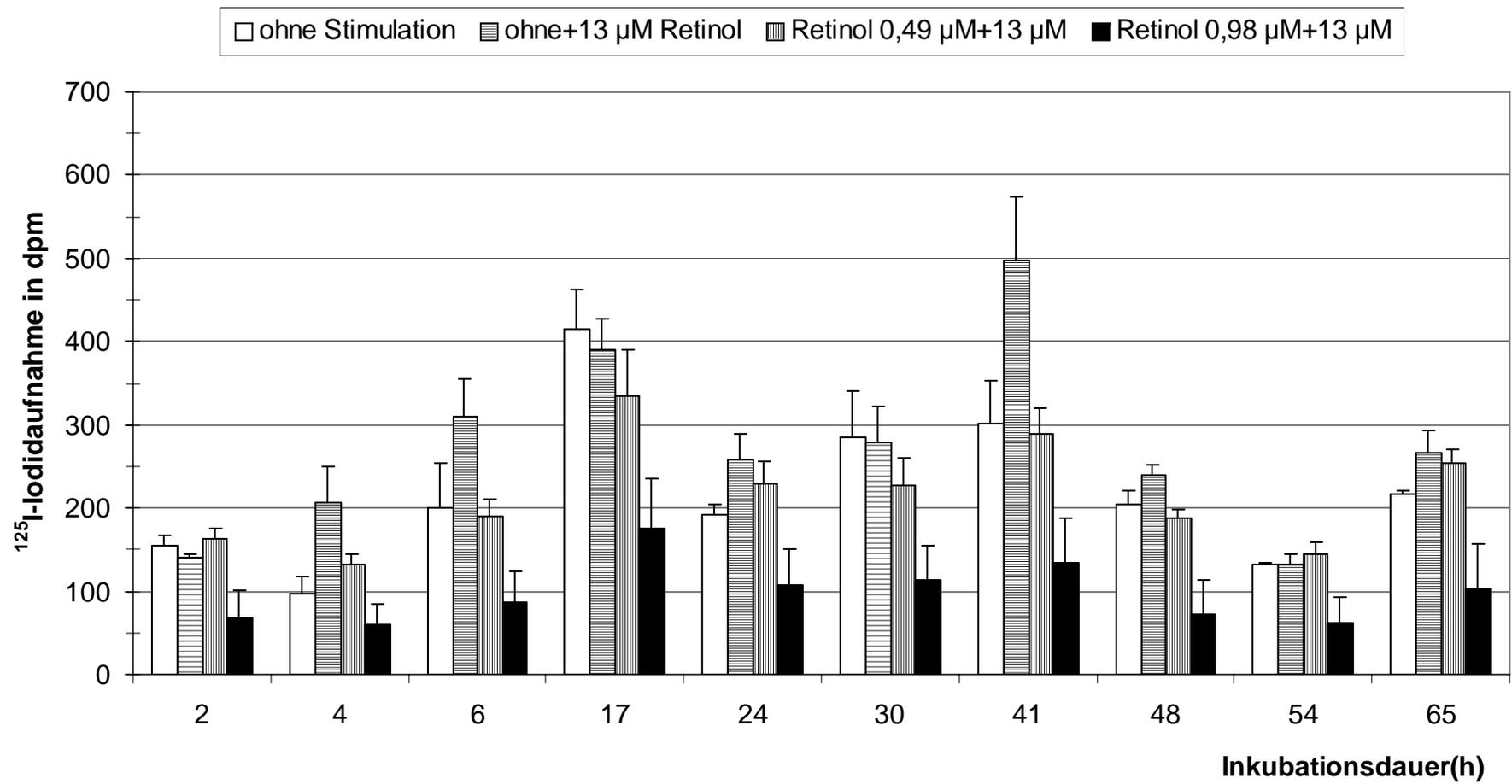


Abb.7a. Retinol (Ansatz III)

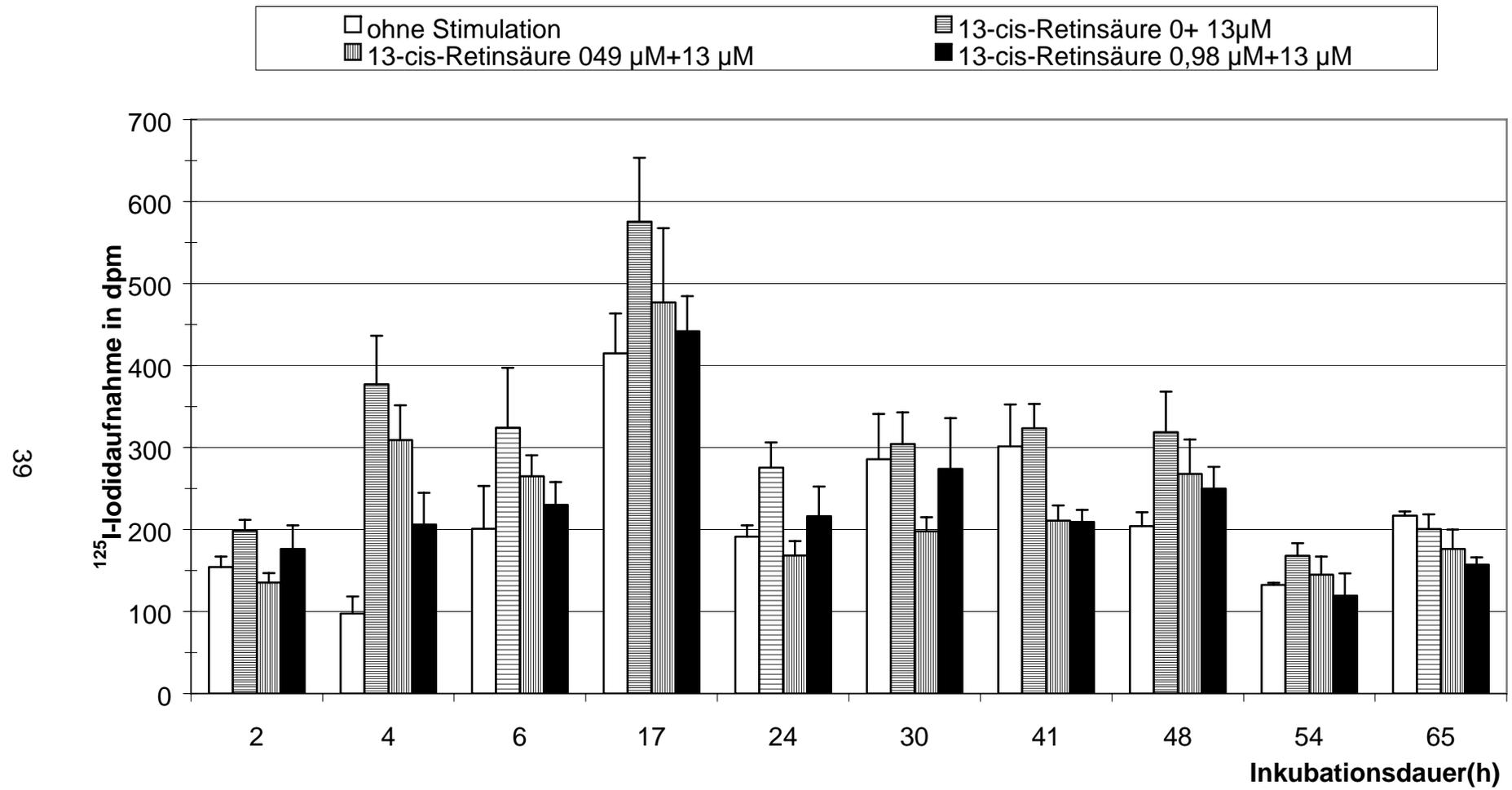


Abb. 7b. 13-cis-Retinsäure (Ansatz III)

Abb.7. Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von Retinol und 13-cis-Retinsäure auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Stimulation der Thyreozyten mit 13 µM Retinol oder 13 µM 13-cis-Retinsäure nach jeweiliger Vorinkubation über 3 Tage mit dem entsprechenden Retinoid in 0; 0,49 oder 0,98 µM Konzentration. Das Radioiodid wurde beim Mediumwechsel den Kulturen zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 65 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. n= 6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ¹²⁵I-Zugabe: 4kBq ¹²⁵ I-Iodid. (Messung im Betazähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 2.2 im Anhang.

Wie Abb. 7. zeigt, hatte die Zugabe von jeweils 13 µM Retinol oder 13-cis-Retinsäure einen verstärkenden Effekt auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten, verglichen mit der nicht stimulierten Kontrollgruppe. Eine signifikante Steigerung ergab sich nach 4 h, 41 h und 48 h. Die maximale Steigerung der Iodidaufnahme gegenüber der Kontrolle fand sich bei den mit 13-cis-Retinsäure stimulierten Zellen nach 4 h Inkubationszeit. Die Iodidaufnahme war hier um das 3,8-fache angestiegen. Die maximale ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde unter Retinol erst nach 41 h erreicht. Bei den mit 13-cis-Retinsäure stimulierten Zellen waren die höchsten Aufnahmeraten dann zu verzeichnen, wenn die Zellen nicht vorstimuliert wurden. Unter 13-cis-Retinsäure mündete die Iodidaufnahmerate gleich zu Beginn der Inkubationsphase (t= 4 h, 6 h) in ein Maximum, nach 17 h war hier die Aufnahmerate bereits wieder rückläufig, im Gegensatz zur nicht stimulierten Kontrolle.

3.2 ³H-Thymidin- und ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von Lycopin und dem Vitamin A-Gehalt des Mediums

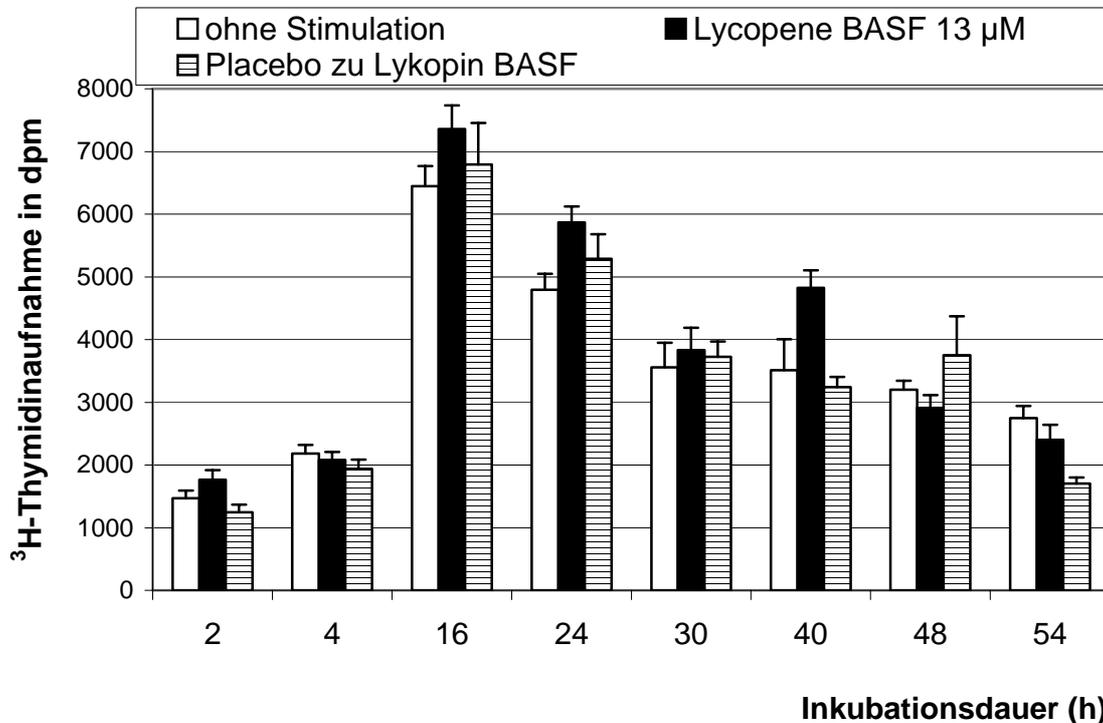


Abb. 8. Einfluss von Lycopin- Nanopartikeln auf die ³H-Thymidin-Aufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von 13 µM Lycopin oder Placebo sowie von ³H-Thymidin zu Beginn der Kultur. Die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. n= 6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ³H-Zugabe:12 kBq ³H- Thymidin. Kommerzielles Vit. A- haltiges (0,6 µM) NCTC-Medium. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 3.1 im Anhang. (Ansatz IV)

Wie Abb.8. zeigt, konnte nach 2 Stunden Inkubationsdauer ein leichter Anstieg der ³H-Thymidinaufnahme bei den mit Lycopin stimulierten Kulturen nachgewiesen werden, ebenso nach 16 h, 24 h und 30h. Eine signifikante Steigerung (um das 1,3-fache) gegenüber der unstimulierten Kontrolle war nur nach 40 h zu verzeichnen, während nach 48 h und 54 h sogar ein leichter Rückgang der ³H-Thymidinaufnahmerate festgestellt wurde. Die ³H-Thymidinaufnahme er-

reichte bei $t = 16$ h ein Maximum und nahm dann stimulationsunabhängig stetig ab. Auffällig ist die gesteigerte ^3H -Thymidinaufnahme in der mit Placebo „stimulierten“ Kultur bei $t = 48$ h.

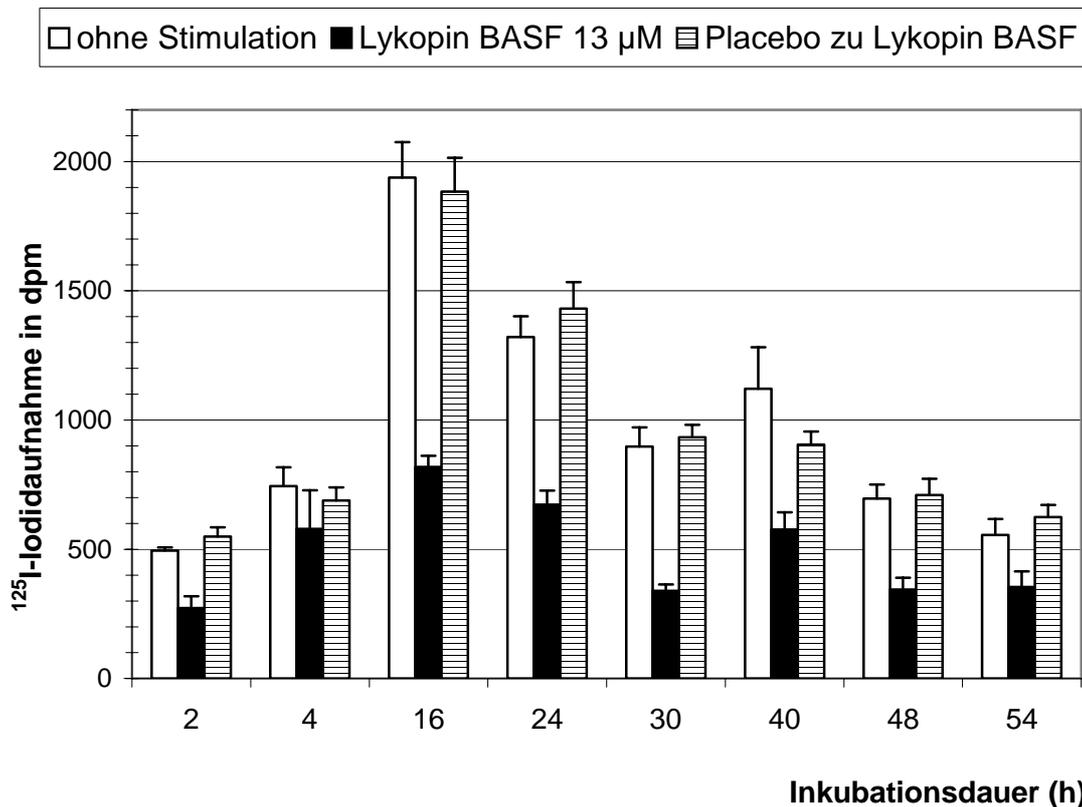


Abb.9. Einfluss von Lykopin- Nanopartikeln auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lykopin oder Placebo sowie von ^{125}I -Iodid zu Beginn der Kultur. Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n = 6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Zugabe: 4 kBq ^{125}I -Iodid. Kommerzielles Vit. A- haltiges ($0,6\ \mu\text{M}$) NCTC-Medium. (Messung im Beta-zähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 3.2 im Anhang.

Wie Abb. 9. zeigt, verringerte sich die ^{125}I -Iodid -Aufnahmerate durch Zugabe von Lykopin- Nanopartikeln zu jedem Zeitpunkt. Alle Kulturen, welche mit Placebo stimuliert wurden, zeigten annähernd die gleichen Aufnahmeraten wie die nicht stimulierten Kontrollen.

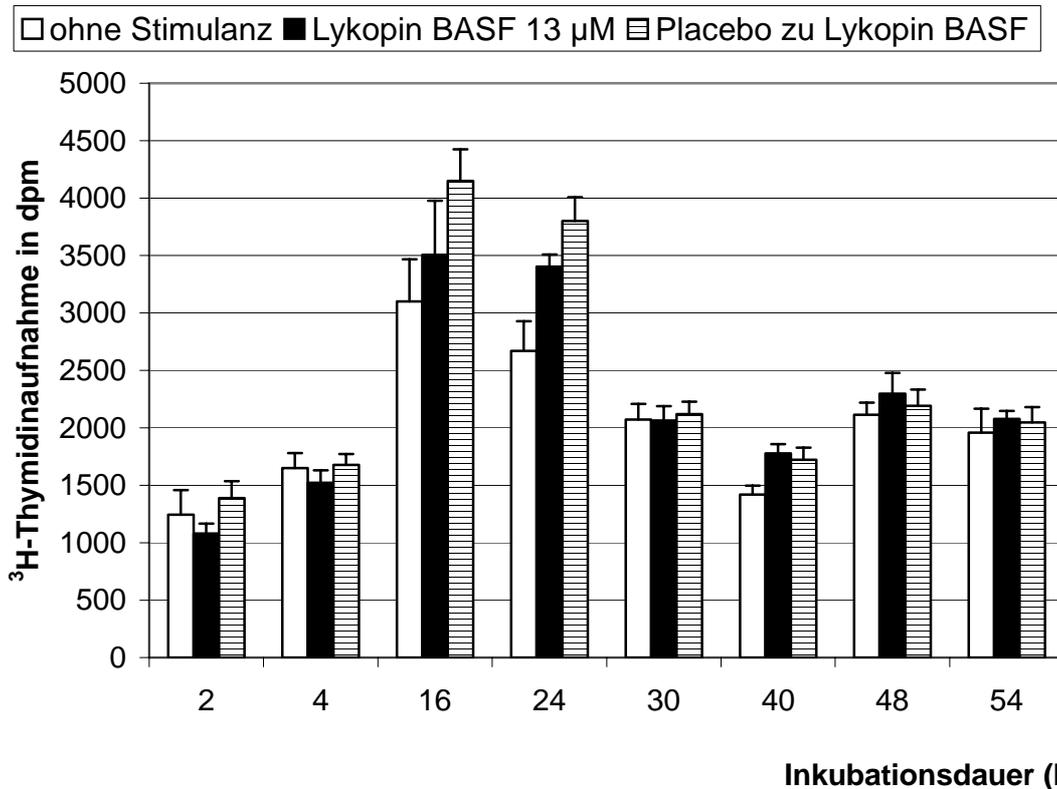


Abb. 10. Einfluss von Lykopen-Nanopartikeln auf die ^3H -Thymidin-Aufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lykopen oder Placebo sowie von ^3H -Thymidin zu Beginn der Kultur. Die ^3H -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: $12\ \text{kBq } ^3\text{H}$ -Thymidin. Kommerzielles Vit. A- haltiges ($0,6\ \mu\text{M}$) NCTC- Medium. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 4.1 im Anhang. (Ansatz V)

Wie Abb. 10. zeigt, hemmte die Zugabe von Lykopen-Nanopartikeln die ^3H -Thymidinaufnahmerate nach 2 und 4 h - verglichen mit der Kontrollgruppe. Eine leicht gesteigerte nicht signifikante Aufnahme von Thymidin, verglichen mit den nicht stimulierten Zellen, war zu den Zeitpunkten $t=16\ \text{h}$, $24\ \text{h}$, $40\ \text{h}$, $48\ \text{h}$ und $54\ \text{h}$ feststellbar. Nach 30 h waren die ^3H -Aufnahmeraten in der mit Lykopen behandelten und in der nicht stimulierten Gruppe annähernd gleich. Die mit Placebo behandelten Kulturen zeigten, zu den Zeitpunkten $t=16\ \text{h}$, $24\ \text{h}$ und

40 h, jeweils deutlich höhere Aufnahmeraten gegenüber der Kontrolle, nach 16 und 24 h wies die Placebo-Gruppe auch gegenüber den mit Lykopen stimulierten Zellen höhere Impulsraten auf. Die Unterschiede zur Kontrolle waren allerdings nicht signifikant.

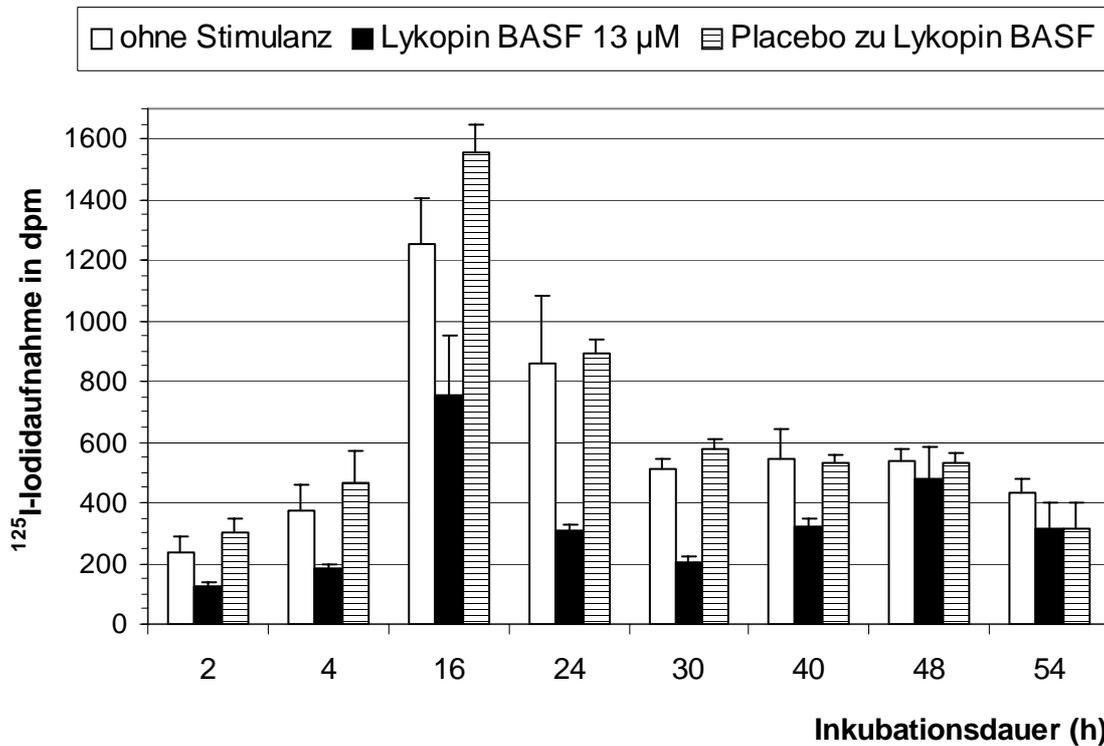


Abb.11. Einfluss von Lykopen- Nanopartikeln auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lykopen oder Placebo sowie von ^{125}I -Iodid zu Beginn der Kultur. Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Zugabe: 4 kBq ^{125}I -Iodid. Kommerzielles Vit. A- haltiges ($0,6\ \mu\text{M}$) NCTC- Medium. (Messung im Beta-zähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 4.2 im Anhang. (Ansatz V)

Wie die Abb.11. zeigt, hemmte die Zugabe von Lykopen- Nanopartikeln die ^{125}I -Iodidaufnahmerate zu jedem Zeitpunkt. Alle mit Placebo inkubierten Kulturen zeigten, außer zum Zeitpunkt $t=54\ \text{h}$, jeweils ähnliche Aufnahmeraten wie die Kontrollgruppe. Nach 54 h jedoch war die Iodidaufnahmerate auch in der Placebogruppe vermindert.

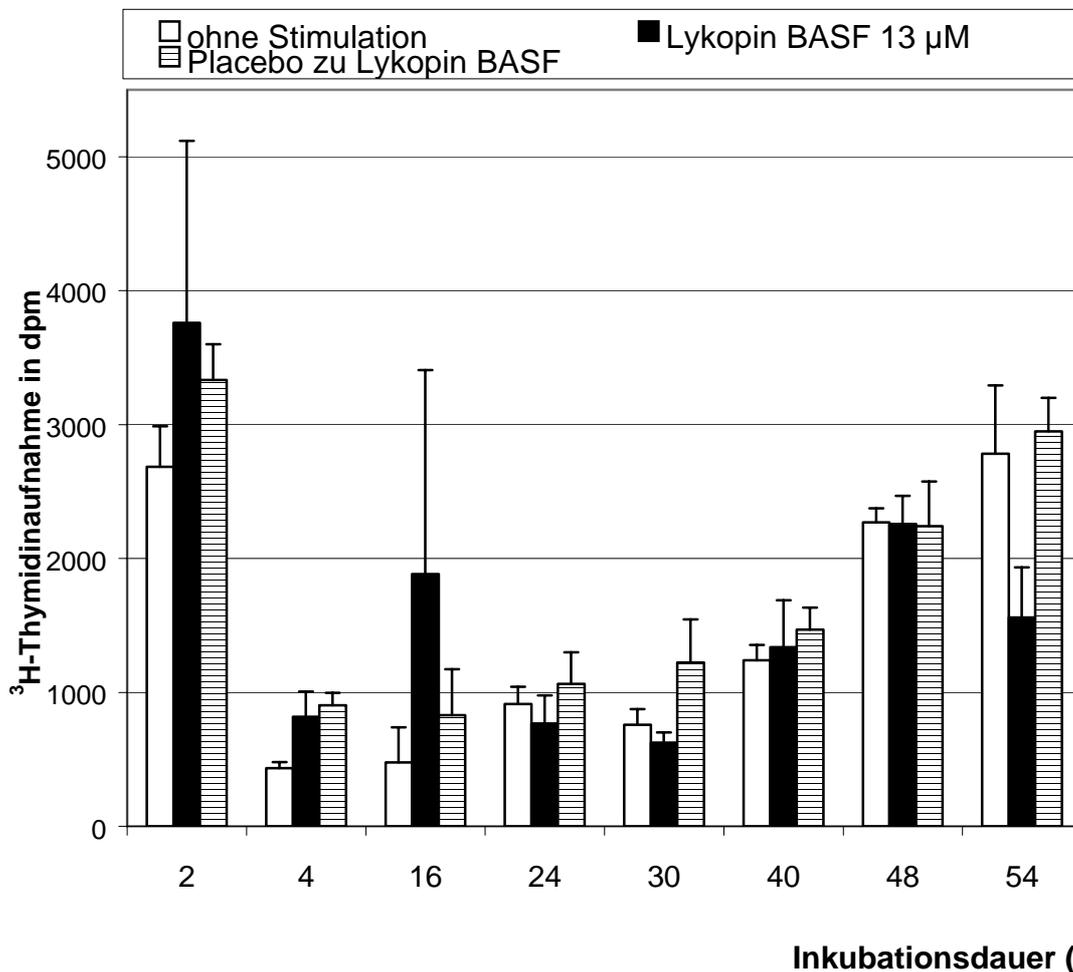


Abb.12. Einfluss von Lycopin-Nanopartikeln auf die ^3H -Thymidin-Aufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lycopin oder Placebo sowie von ^3H -Thymidin zu Beginn der Kultur. Die ^3H -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=4$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^3H -Zugabe: 12 kBq ^3H -Thymidin. Spezielles Vit. A- freies NCTC- Medium. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 5.1 im Anhang. (Ansatz VI)

Wie Abb. 12. zeigt, war die ^3H -Thymidinaufnahmerate bei den mit Lycopin stimulierten Zellen bis zum Zeitpunkt $t=16\ \text{h}$ gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle leicht erhöht. Zwischen 24 h und 48 h zeigten sich ähnliche Thymidinaufnahmeraten wie bei der nicht stimulierten Kontrolle. Nach 54 h war die

Thymidininkorporation bei den mit Lykopin stimulierten Zellen deutlich vermindert, verglichen mit der Kontrolle. Da bei diesem Versuch die Anzahl der Stichproben zu gering war, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob es sich um signifikante Einflüsse handelt.

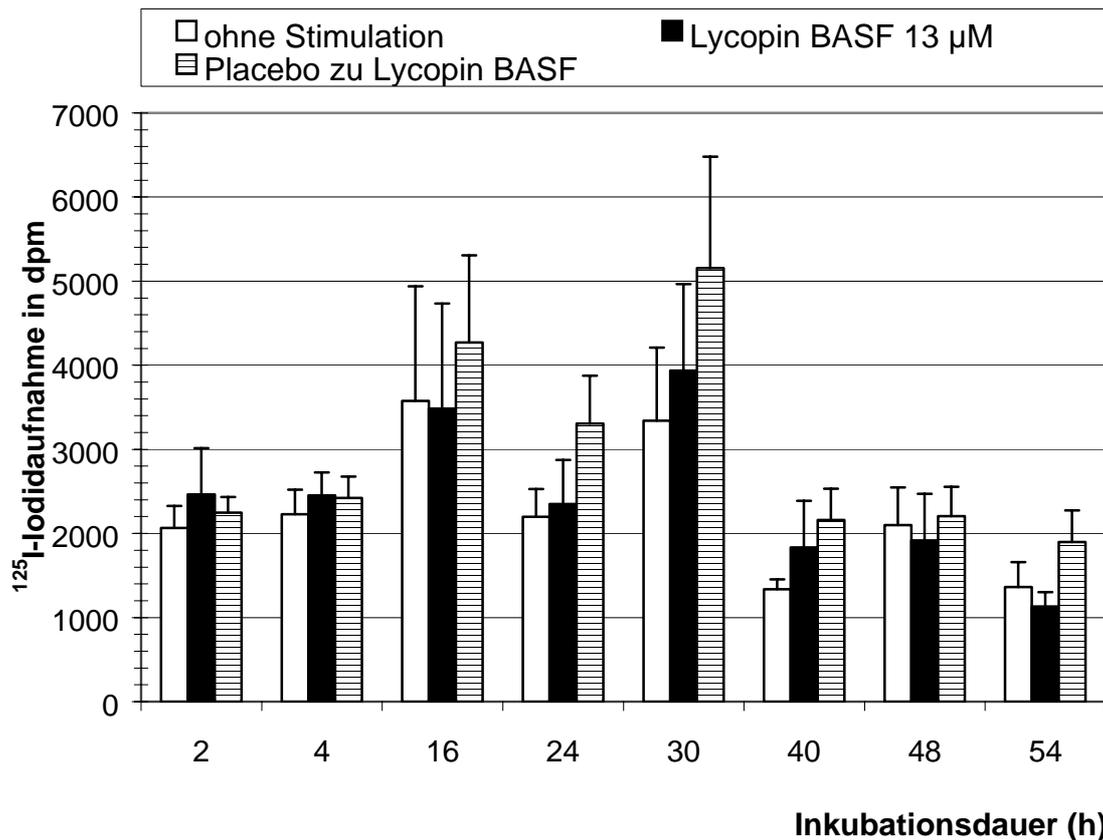


Abb. 13. Einfluss von Lykopin- Nanopartikeln auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lykopin oder Placebo sowie von ^{125}I -Iodid zu Beginn der Kultur. Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Spezielles Vit. A- freies NCTC- Medium. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=4$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch : 130 000, ^{125}I - Zugabe: 4 kBq ^{125}I -Iodid. (Messung im Betazähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 5.2 im Anhang. (Ansatz VI)

Wie Abb. 13. zeigt, war die ^{125}I -Iodidaufnahmerate bei den mit Lykopin- Nanopartikeln stimulierten Zellen gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle annähr-

end gleich, nach 30 h und 40 h war die Iodidaufnahme gegenüber der Kontrolle gering erhöht. Zu den Zeitpunkten $t= 16$ h, 48 h und 54 h war die Iodidinkorporation etwas vermindert. Aufgrund einer zu geringen Stichprobenanzahl war der Versuch statistisch nicht auswertbar. Es fällt auf, dass auch in diesem Ansatz die mit Placebo inkubierten Kulturen meist geringfügig höhere Aufnahmezeiten als die Kontrollkultur aufwiesen.

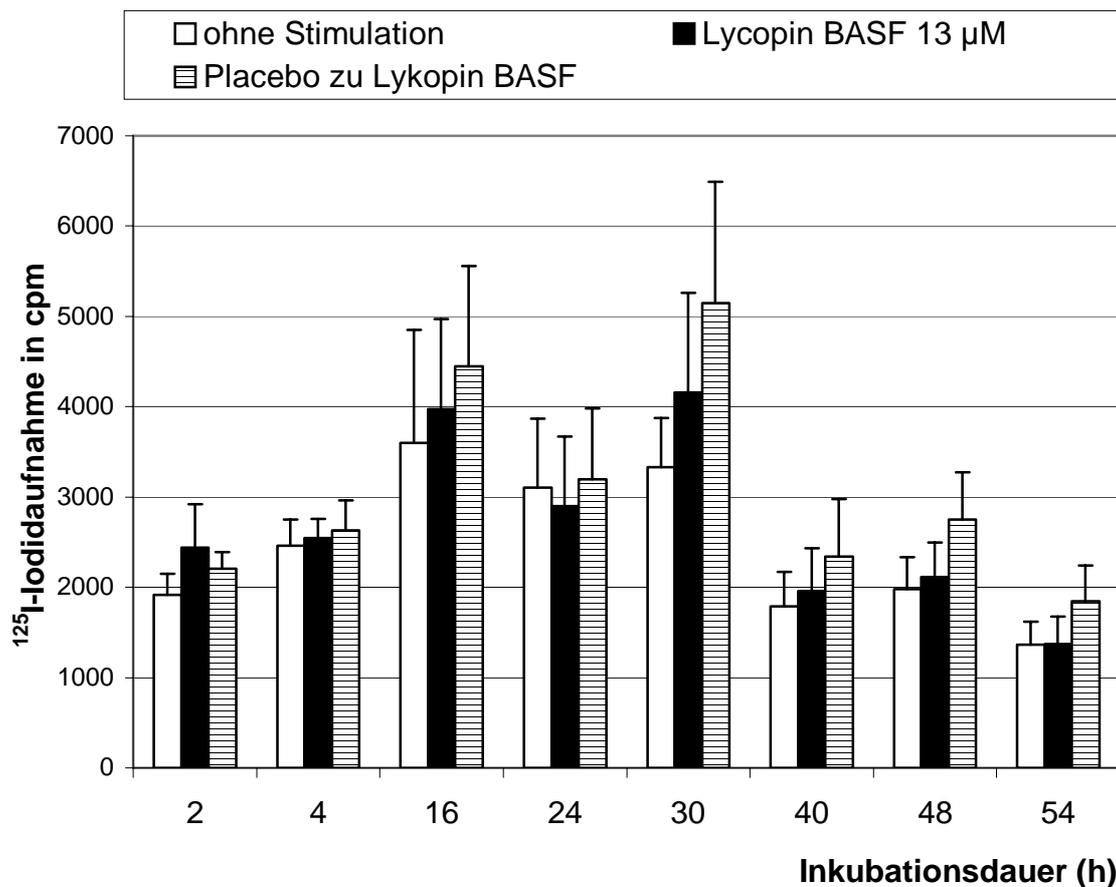


Abb. 14. Einfluss von Lykopen- Nanopartikeln auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lykopen oder Placebo sowie von ^{125}I -Iodid zu Beginn der Kultur. Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Spezielles Vit. A- freies NCTC- Medium. Dargestellt sind Mittelwert und SEM $n= 4$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Zugabe: 4 kBq ^{125}I -Iodid. (Die Messung erfolgte hier im Gammazähler, bei den vorangehenden Ansätzen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme im Betazähler gemessen). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 5.3 im Anhang. (Ansatz VI)

Wie Abb.14. zeigt, ergab die Messung der Iodidaufnahmerate im Gammazähler ein ähnliches Ergebnis wie die Messung im Betazähler.

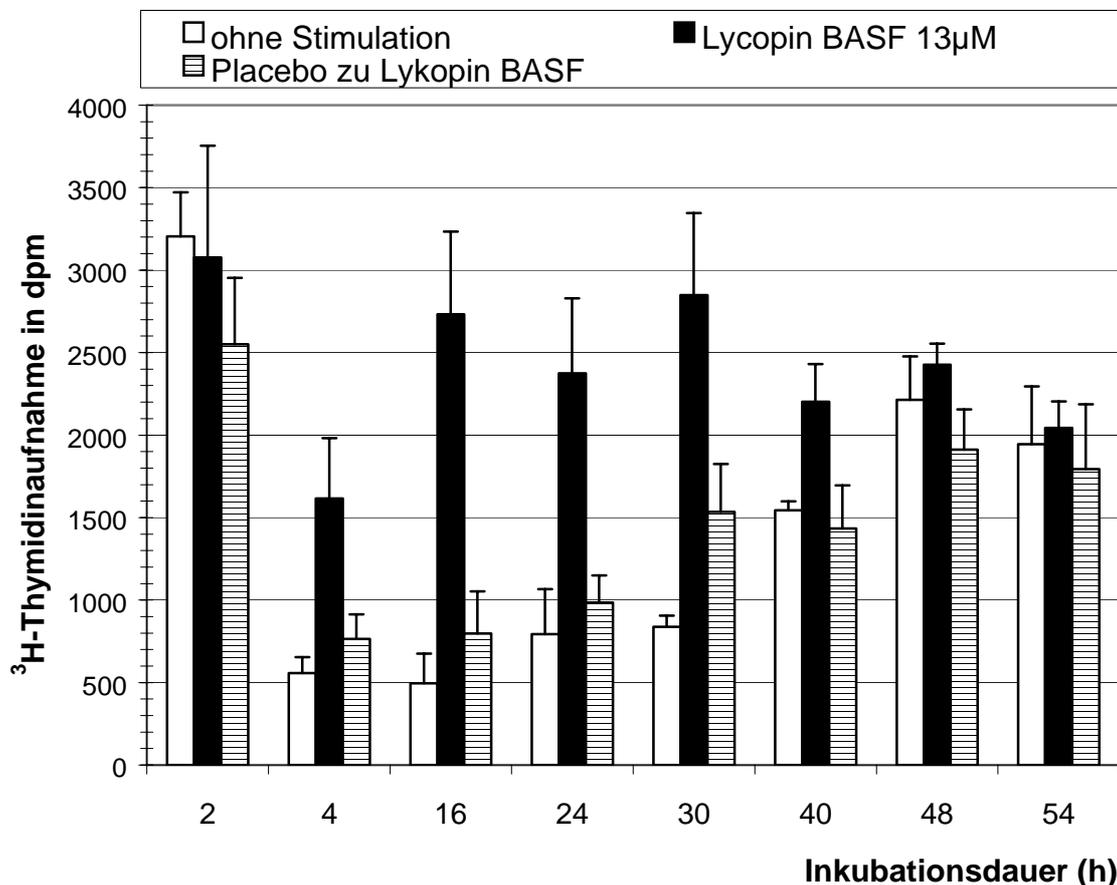


Abb.15. Einfluss von Lycopin- Nanopartikeln auf die ³H-Thymidin- Aufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von 13 µM Lycopin oder Placebo sowie von ³H-Thymidin zu Beginn der Kultur. Die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. n= 4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ³H-Zugabe:12 kBq ³H-Thymidin. Kommerzielles Vit. A- haltiges (0,6 µM) NCTC- Medium. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab 6.1 im Anhang. (Ansatz VI)

Wie Abb.15. zeigt, bewirkte die Zugabe von 13 µM Lycopin BASF ab einer Inkubationszeit von 4 h eine deutlich stärkere ³H-Thymidinaufnahmerate als bei der nicht stimulierten Kontrollgruppe. Die Aufnahmeraten waren verglichen mit der

Kontrolle bis zum 5- fachen erhöht. Aufgrund zu geringer Stichprobenanzahl darf jedoch nicht von einer Signifikanz ausgegangen werden. Die Aufnahme-
raten der Placebogruppe verhielten sich ähnlich wie die der Kontrollgruppe.

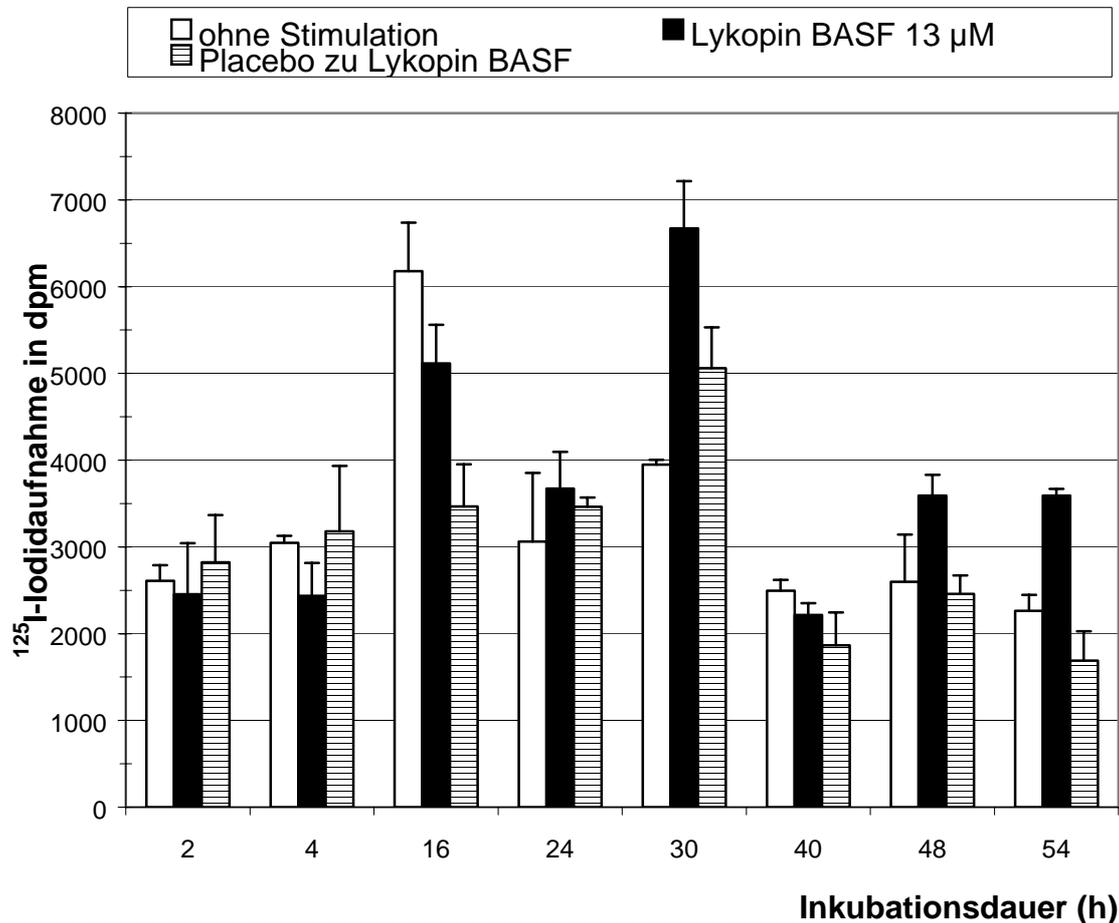


Abb. 16. Einfluss von Lycopin- Nanopartikeln auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lycopin oder Placebo sowie von ^{125}I -Iodid zu Beginn der Kultur. Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. $n=4$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Zugabe: 4 kBq ^{125}I -Iodid. Kommerzielles Vit. A- haltiges ($0,6\ \mu\text{M}$) NCTC-Medium. (Messung im Beta-
zähler). Zugehörige Zahlenwerte in Tab 6.2 im Anhang. (Ansatz VI)

Wie Abb. 16. zeigt, hatte die Zugabe von $13\ \mu\text{M}$ Lycopin BASF keine einheitlichen Auswirkungen auf die Radioiodidaufnahme. Während zu Beginn der In-

kubation (bis zu 16 h) und dann wieder nach 40 h die Iodidaufnahmerate in die mit Lykopin stimulierten Thyreozyten gegenüber den Kontrollzellen vermindert war, wurden nach 24 h, 30 h, 48 h und 54 h erhöhte Aufnahme­raten gemessen. Nach 30 h war dieser Unterschied (1,5-fache Erhöhung gegenüber der Kontrolle) besonders deutlich. Aufgrund der zu geringen Stichprobenzahl darf jedoch nicht von einer statistischen Signifikanz ausgegangen werden. Die mit Placebo behandelten Zellen zeigten ähnliche Aufnahme­raten wie die Kontrolle, wiesen jedoch nach t= 16 h eine verminderte Radioiodidaufnahme auf.

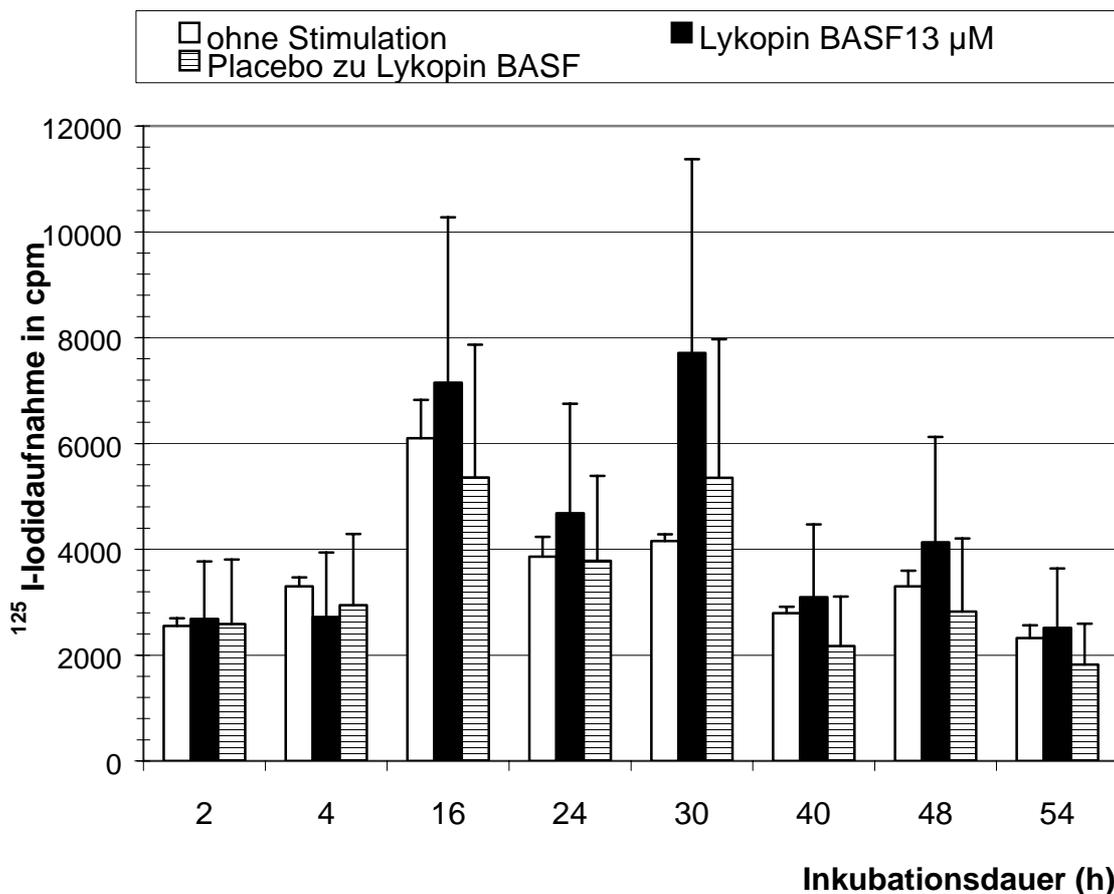


Abb. 17. Einfluss von Lykopin- Nanopartikeln auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten. Zugabe von 13 µM Lykopin oder Placebo sowie von ¹²⁵I-Iodid zu Beginn der Kultur. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurde zwischen 2 und 54 h verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. n= 4. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ¹²⁵I-Zugabe: 4 kBq ¹²⁵I-Iodid. Kommerzielles Vit. A- haltiges (0,6 µM) NCTC- Medium. (Messung im Gamma­zähler). Zugehörige Zahlenwerte in Tab. 6.3 im Anhang. (Ansatz VI)

Wie Abb. 17. zeigt, unterschieden sich die Messergebnisse des Gammazählers teilweise von den Messergebnissen der gleichen Zellen im Betazähler (Abb. 16., s.S.49). Bei den mit Lykopen stimulierten Kulturen zeigten sich ab $t= 16$ h im Mittel geringfügig erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahmeraten in die Zellkulturen mit einem Maximum nach 16h und 30h. Die mit Placebo behandelten Zellen unterschieden sich nicht sicher von der Kontrolle.

Abb. 18. zeigt die Darstellung der Daten aus den Diagrammen 12 und 15 (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 5.1 und 6.1). Die Abbildung veranschaulicht den Einfluss von Lykopen-Nanopartikeln auf die ^3H -Thymidinaufnahme in Abhängigkeit von Vitamin A im Medium.

Wie Abb. 18. zeigt, induziert das Vit. A- haltige Medium eine deutliche Steigerung der ^3H -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten unter Lykopen nach 4 h, 16 h, 24 h, 30h und 40 h zur Folge. Bei Verwendung von Vitamin A- freiem Medium war dies nicht der Fall. Nach 48h ließen die unterschiedlichen Medien keine Unterschiede bezüglich der Thymidinaufnahme mehr erkennen. Nach 54 Stunden Inkubationszeit zeigte sich bei den beiden Kontrollen in Vit. A- freiem Medium allerdings eine etwas höhere Thymidininkorporation.

Abb. 19. (S. 55) zeigt die Darstellung der Daten aus den Diagrammen 13 und 16 (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 5.2 und 6.2). Die Abbildung veranschaulicht den Einfluss von Lykopen- Nanopartikeln auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in Thyreozyten in Abhängigkeit vom Vitamin A- Gehalt im Medium.

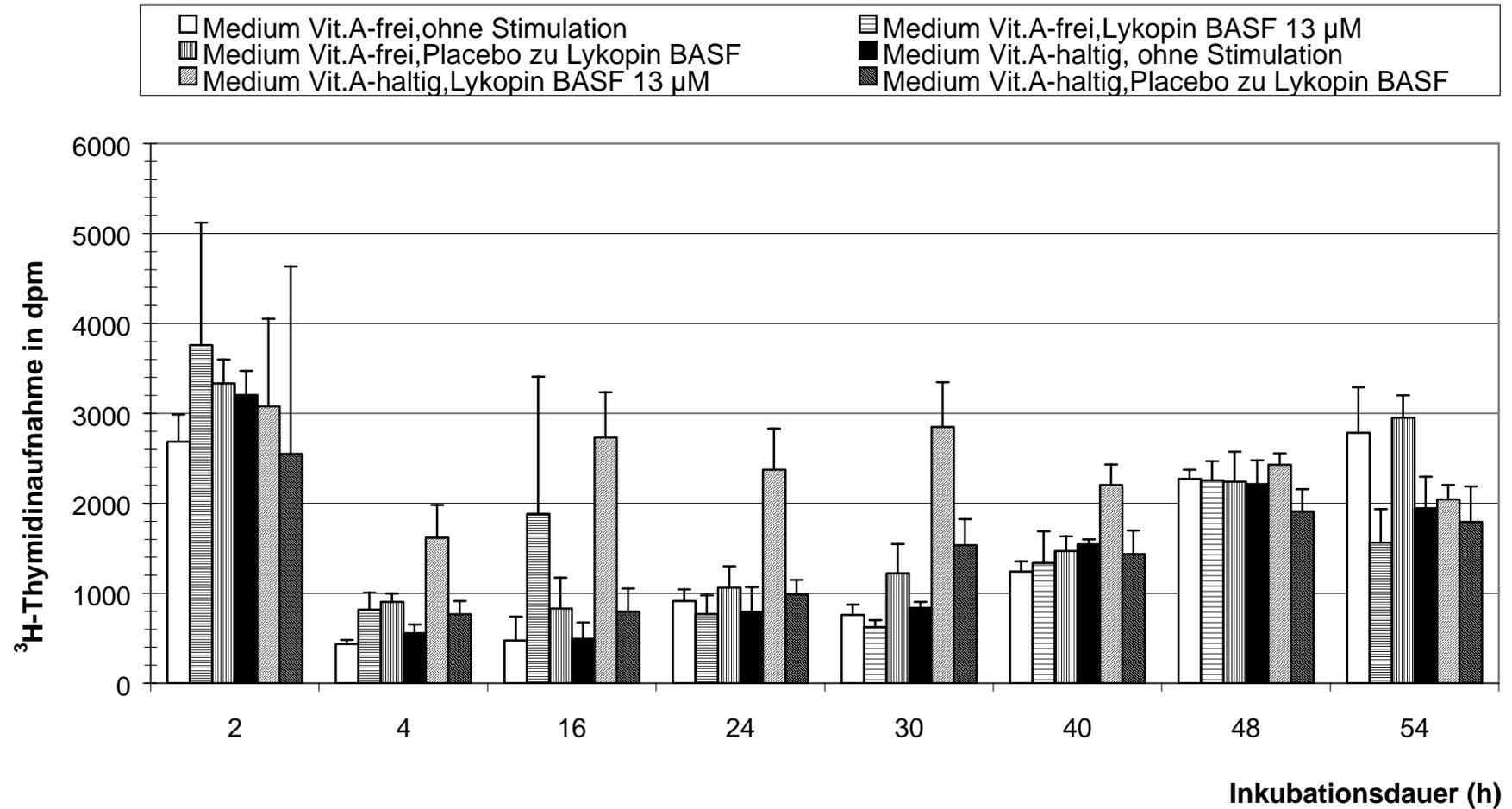


Abb.18.

Wie Abb. 19. zeigt, wiesen die nicht stimulierten Zellkulturen in Vit. A-haltigem Medium zu jedem Zeitpunkt etwas höhere ¹²⁵I-Iodidaufnahmeraten auf als die entsprechenden Kulturen in Vit. A- freiem Medium. Maxima fanden sich dabei nach t= 16 h und 30 h. Die mit Lycopin inkubierten Kulturen wiesen unabhängig vom Vit.-A-Gehalt des Mediums in den ersten 4 h gleiche Aufnahmeraten auf. Nach 16 h zeigten sich Unterschiede. Die Kulturen in Vit. A- haltigem Medium wiesen unter Lycopin höhere Aufnahmeraten auf als entsprechende Kulturen in Vit. A- freiem Medium. Dieser Effekt war auch nach 54 h nachweisbar. Ein die Iodidaufnahme stimulierender Effekt des Vit. A- haltigen Mediums zeigte sich auch bei den mit dem Placebo behandelten Kulturen.

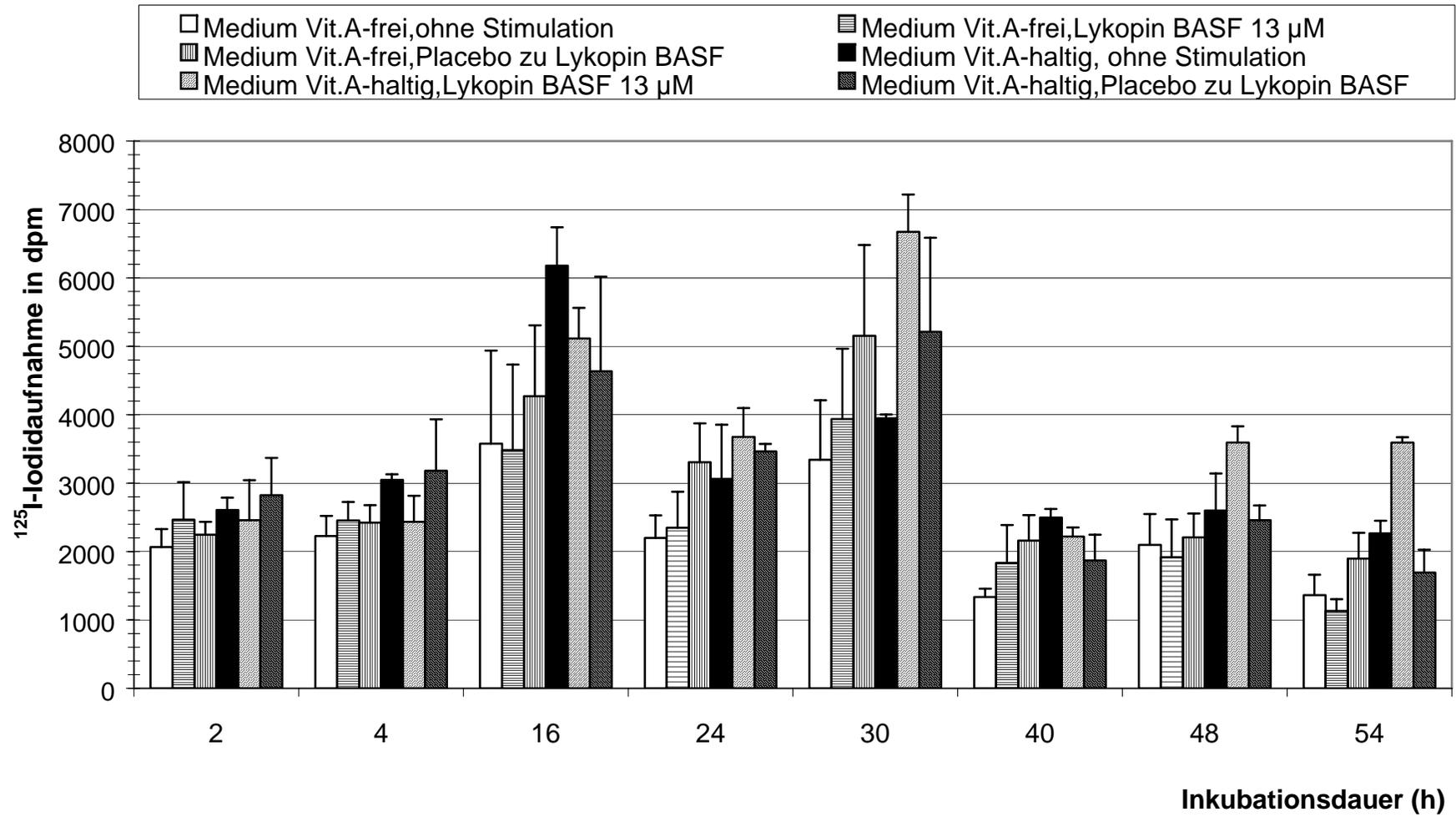


Abb. 19.

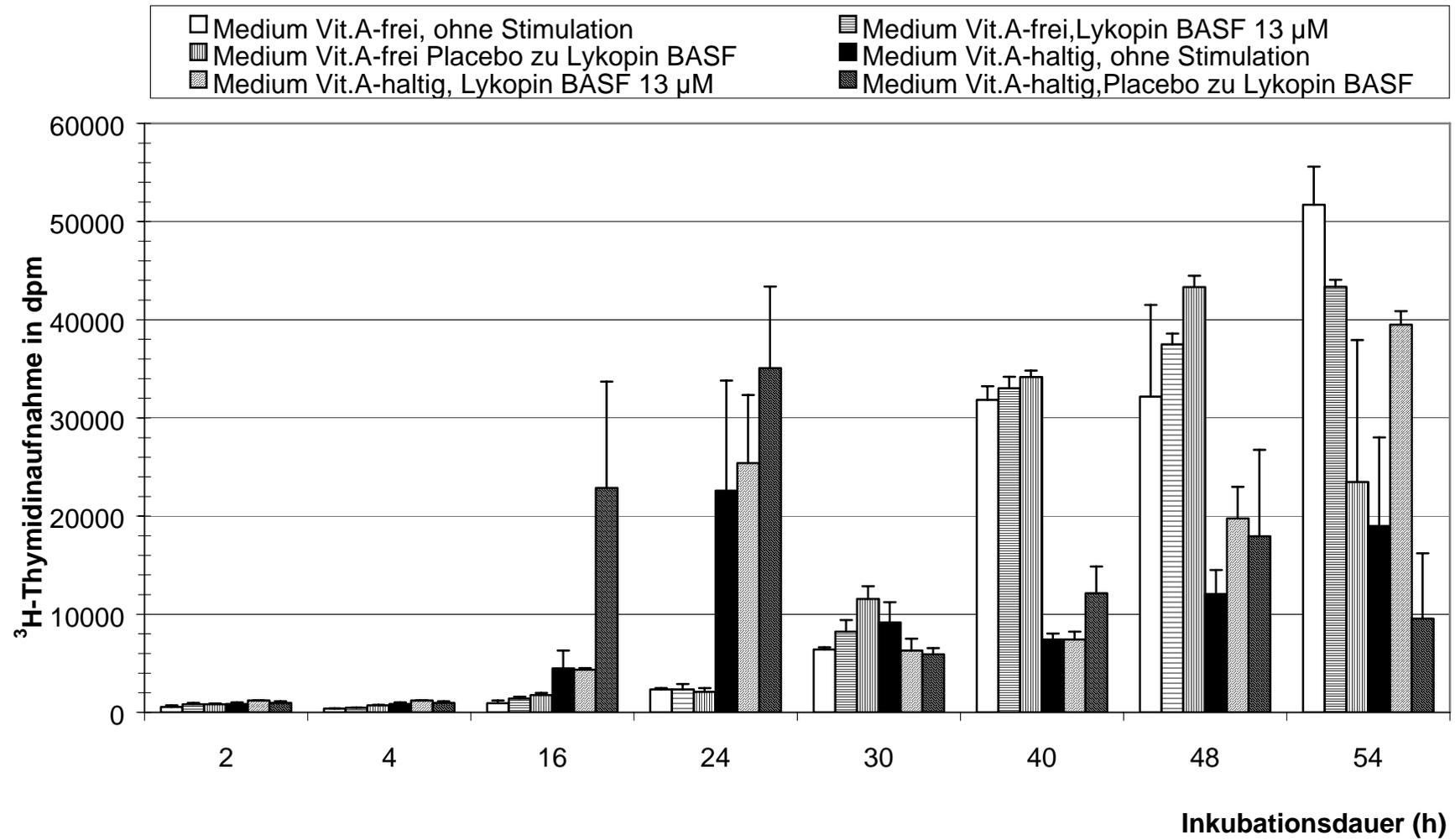


Abb.20.

Abb.20. Einfluss von Lycopin- Nanopartikeln auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, die in Vit. A- haltigem oder Vit. A- freiem Medium kultiviert wurden. Stimulation der Thyreozyten mit 13 µM Lycopin oder mit Placebo. ³H-Thymidin wurde den Kulturen bei der Aussaat zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 54 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. n= 4 (Kontrollgruppe ohne Stimulation mit Lycopin oder Placebo) oder n= 5 (Kulturen, denen Lycopin BASF oder Placebo BASF zugesetzt wurden). Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch:130 000, ³H-Zugabe: 12 kBq ³H-Thymidin. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7.1 im Anhang. (Ansatz VIII)

Abb.20. zeigt nach 16 und 24 h eine deutliche Verstärkung der ³H-Thymidinaufnahme in Thyreozyten, die in Vit. A- haltigem Medium kultiviert wurden. Nach 40 h und 48 h war die Aufnahmerate in die Thyreozyten die im Vit. A- freien Medium kultiviert wurden deutlich höher als bei jenen in Vit. A- haltigem Medium. Nach 48 h unterschieden sich die Thymidinaufnahmeraten in die mit Lycopin stimulierten Kulturen, die in Vit. A- haltigem Medium kultiviert wurden, signifikant von den entsprechenden Kulturen in Vit. A- freiem Medium. Nach 54 h wies die Kontrollkultur in Vit. A- freiem Medium die höchste im Ansatz erreichte Aufnahmerate auf. Ein sicherer Effekt, der dem Lycopin zuzuschreiben wäre ist nicht zu erkennen.

Abb. 21. Einfluss von Lycopin-Nanopartikeln auf die ¹²⁵I-Iodid- Aufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, die in Vit. A- haltigem oder Vit. A- freiem Medium kultiviert wurden. Stimulation der Thyreozyten mit 13 µM Lycopin oder mit Placebo. ¹²⁵I-Iodid wurde den Kulturen bei der Aussaat zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 54 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM n= 4 bei der Gruppe ohne Stimulation mit Lycopin oder Placebo und n= 5 bei den Kulturen, denen Lycopin BASF oder Placebo BASF zugesetzt wurden. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch:130 000, ¹²⁵I- Zugabe: 4 kBq ¹²⁵I-Iodid. (Messung im Betazähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7.2 im Anhang. (Ansatz VIII)

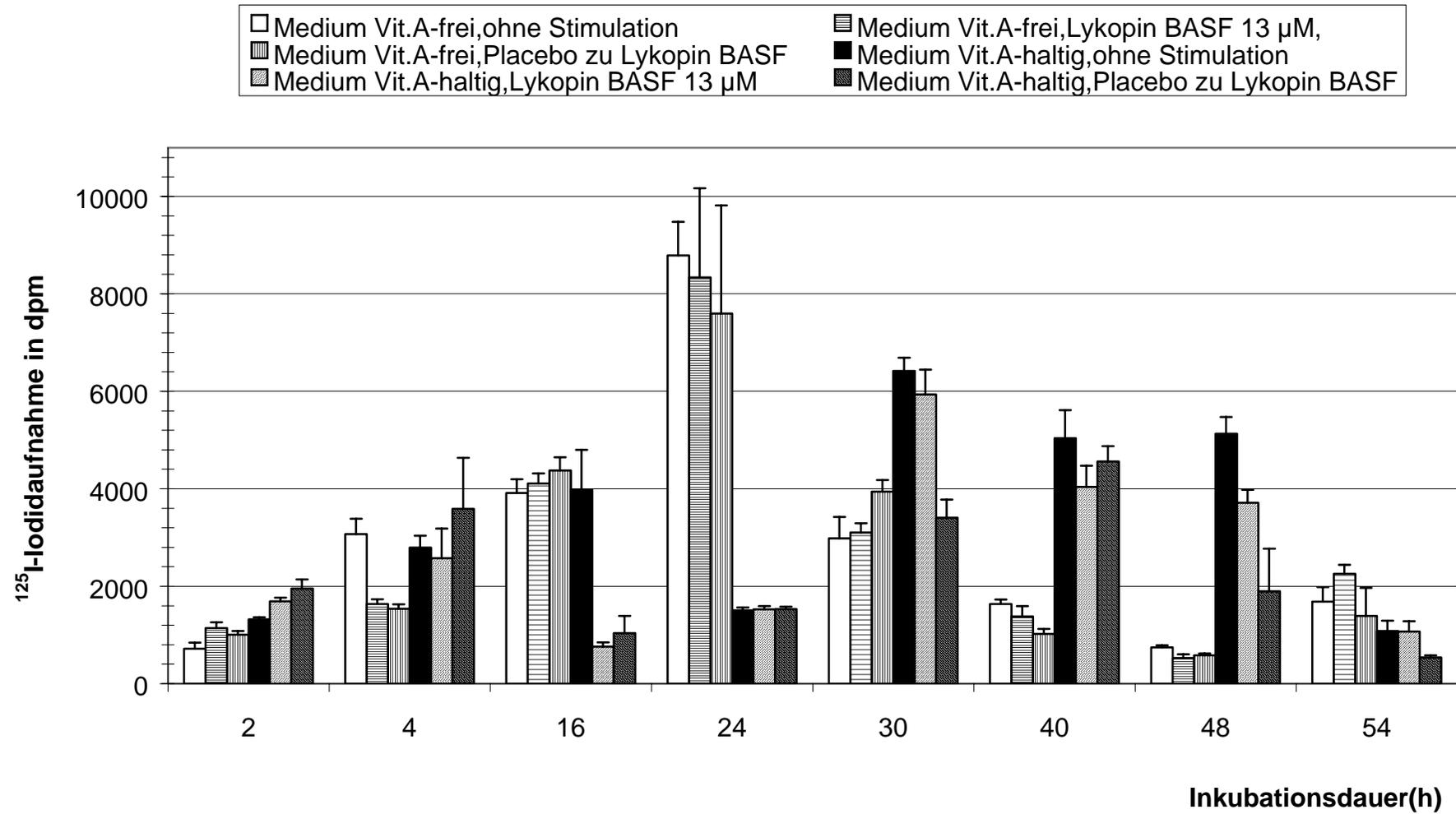


Abb.21.

In Abb. 21. zeigen Zellkulturen in Vit. A- freiem Medium unter Stimulation mit Lykopin BASF entweder nur eine geringe Verstärkung der Iodidaufnahmerate oder nach t= 4 h, 24 h, 40 h und 48 h sogar eine verminderte Aufnahmerate, verglichen mit der nicht stimulierten Kontrolle. Bei der Placebo-Gruppe ohne Vit. A verhielt sich die Iodidaufnahmerate tendenziell gleich. Das Maximum der Iodidaufnahme bei den Kulturen in Vit. A- freiem Medium fand sich bei t= 24 h. In Vit. A- haltigem Medium zeigten die mit Lykopin stimulierten Thyreozyten nur nach t = 2 h eine Radioiodaufnahme, die gering über der Kontrolle lag. Zu den übrigen Zeiten lag die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten eher unter jener der Kontrolle. Die maximale Iodidaufnahme in Thyreozyten, die in Vitamin A- haltigem Medium kultiviert wurden, wurde nach 30 h erreicht, im Vitamin A- freien bereits nach 24 h. Nach 24 h unterschieden sich die Aufnahmeraten zwischen den Ansätzen in Vit. A- haltigem und Vit. A- freiem Medium am ausgeprägtesten.

Abb. 22. Einfluss von Lykopin-Nanopartikeln auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten, die in Vit. A- haltigem oder Vit. A- freiem Medium kultiviert wurden. Stimulation der Thyreozyten mit 13 µM Lykopin oder mit Placebo. ¹²⁵I-Iodid wurde den Kulturen bei der Aussaat zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 54 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt sind Mittelwert und SEM. n= 4 bei der Gruppe ohne Stimulation mit Lykopin oder Placebo und n= 5 bei den Kulturen, denen Lykopin BASF oder Placebo BASF zugesetzt wurden. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ¹²⁵I- Zugabe: 4 kBq ¹²⁵I-Iodid. (Messung im Gammazähler). Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7.3 im Anhang. (Ansatz VIII)

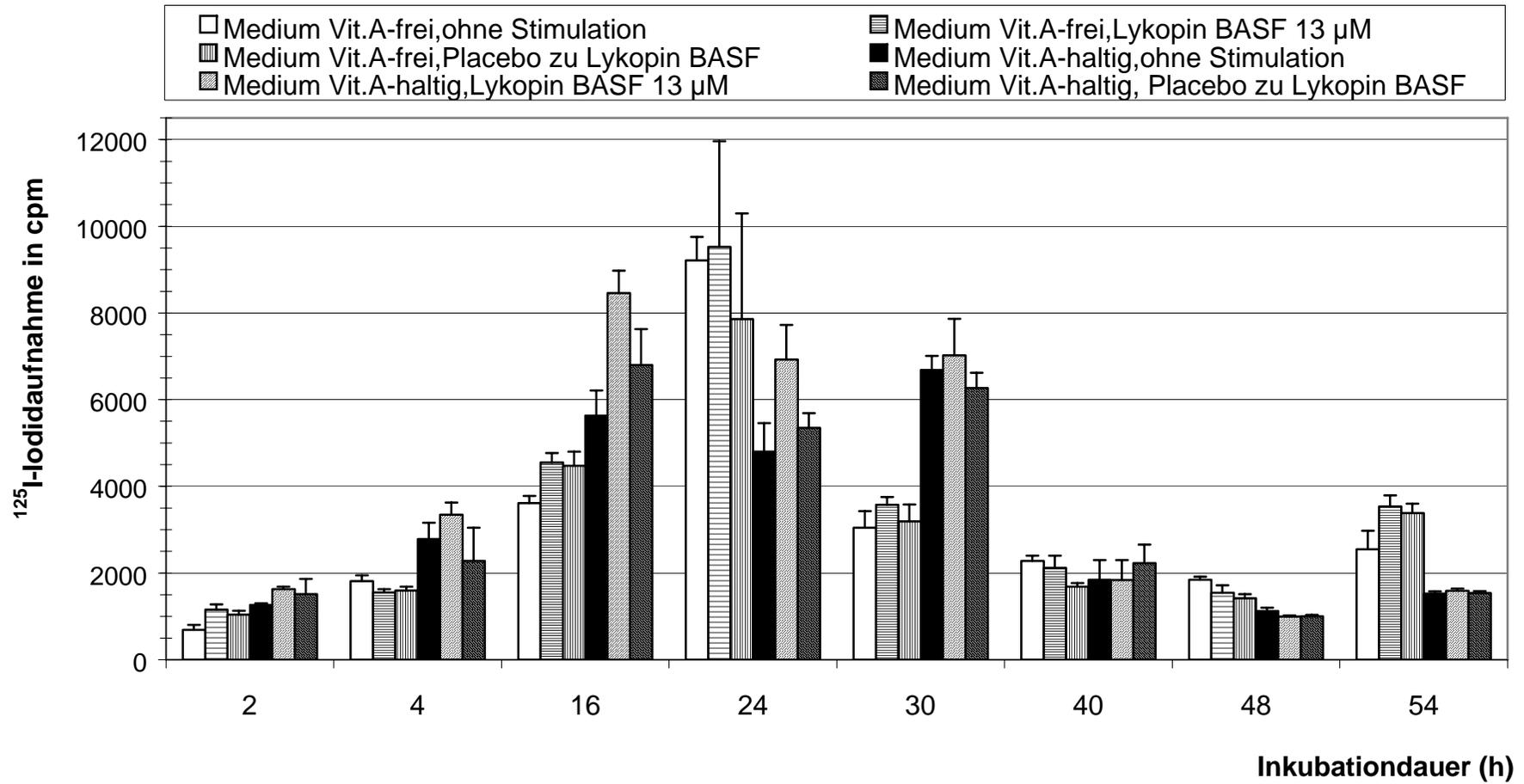


Abb.22.

Wie Abb.22. zeigt, stimmt die gemessene ^{125}I -Iodidaufnahme mittels Gamma-zähler weitgehend mit der Messung der Radioiodidaufnahme derselben Kulturen im Betazähler (s. Abb. 21) überein. Die maximale Aufnahme fand sich in einem Zeitraum zwischen 16 h und 30 h. Nach 40 h und 48 h zeigte sich jedoch bei der Messung im Betazähler eine deutlich verstärkte Aufnahme in den mit Vit. A- haltigem Medium angesetzten Kulturen, während die Messung im Gammazähler hier eine Abnahme zeigt.

3.3 ^3H -Thymidin-und ^{125}I -Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten in Abhängigkeit eines Ciprobay®-Zusatzes zum Kulturmedium

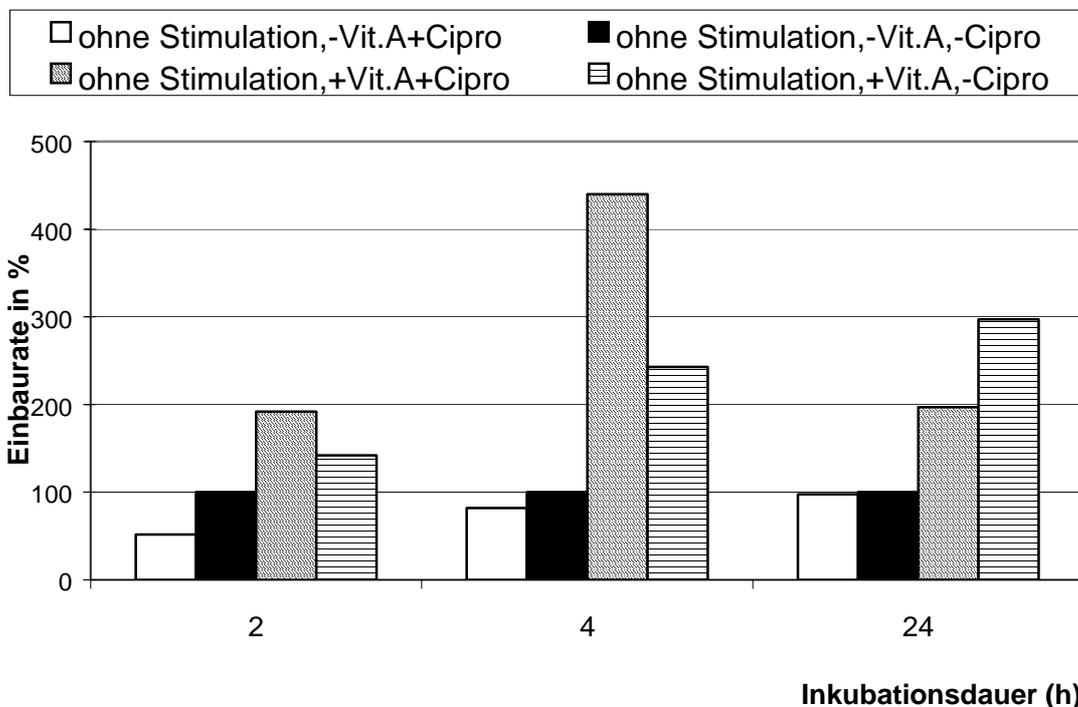


Abb. 23. zeigt die Auswirkungen einer Ciprobay®- Zugabe zum Kulturmedium auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten unter verschiedenen Kulturbedingungen. Die Ciprobay®- Zugabe zum Medium erfolgte in 3%-iger Konzentration zu Beginn der Kultur. Das Medium war wahlweise Vitamin A- frei oder enthielt Vitamin A in „physiologischer“ Konzentration. ^3H -Thymidin wurde den Kulturen bei der Aussaat zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 24 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt ist, aufgrund starker Schwankungen von Ansatz zu Ansatz, die prozentuale Norm-

ierung aller durchgeführten Ansätze bezogen auf die Kontrolle. Die Kontrolle wurde = 100 % gesetzt. Die Stichprobenanzahl n ist variabel. Die Ergebnisse können nicht als statistisch signifikant gewertet werden.

Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ³H-Zugabe: 12 kBq ³H-Thymidin. Zugehörige Zahlenwerte in Tab. 8.1 im Anhang.(Ansatz VIII)

Abb. 23. zeigt, daß die Zugabe von Ciprobay® eher einen hemmenden Effekt auf die Thymidinaufnahmerate der Thyreozyten hatte, wenn diese in Vitamin A-freiem Medium inkubiert wurden. In keinem Fall zeigt es einen fördernden Einfluss. Im Medium mit Vitamin A war die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten generell höher als bei Verwendung von Vitamin A-freiem. In Vitamin A-haltigem Medium kann Ciprobay® bei einer kurzen Inkubation der Zellen von 4 h die Thymidinaufnahme offensichtlich vorübergehend fördern. Nach 24 h ist dies bereits nicht mehr der Fall.

In Abb. 24. zeigt sich, dass sich Ciprobay® auf die Iodidaufnahmerate der Thyreozyten, die in Vit. A-freiem Medium inkubiert wurden, zu Beginn des Inkubationszeitraumes (2- 4 h) hemmend auswirken kann. Nach 18 h gleicht sich bei diesen Thyreozyten die Aufnahmerate der Kontrolle an. Bei Thyreozyten, die in Vit. A-haltigem Medium inkubiert wurden, zeigt Ciprobay® während der gesamten Inkubationszeit einen hemmenden Effekt auf die Iodidaufnahme, sie war bei diesen Zellen nach 4 h um 50% gegenüber der Kontrolle reduziert. Die Iodidaufnahme in Thyreozyten könnte somit durch Ciprobay beeinflusst werden. (s.auch Abb. 24 b im Kap. 7.1)

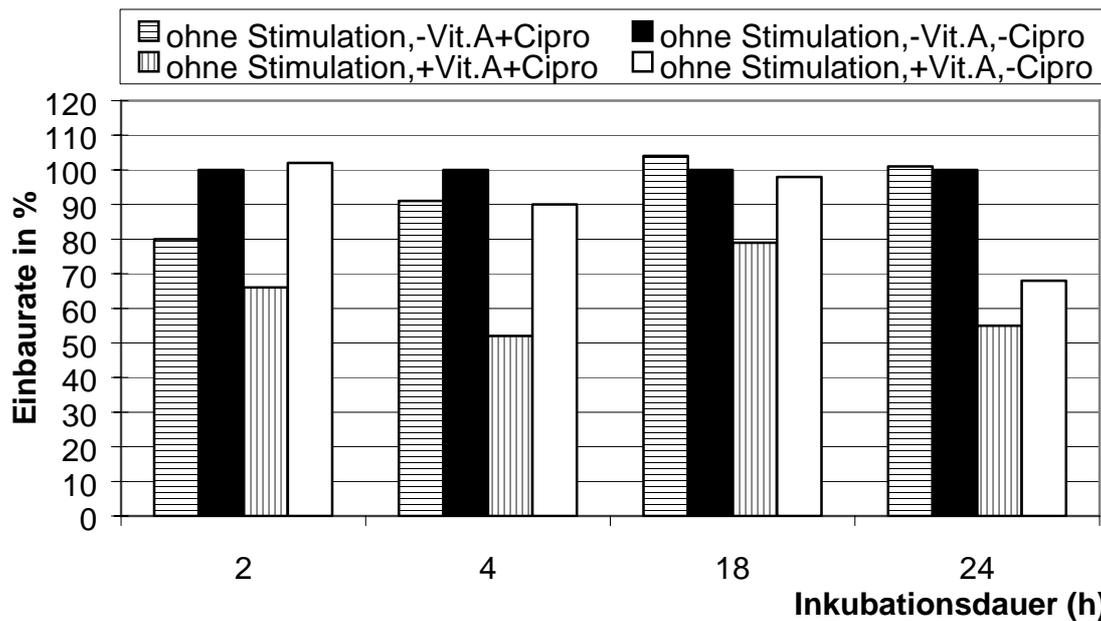


Abb. 24. Auswirkungen einer Ciprobay®- Zugabe zum Kulturmedium auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten unter verschiedenen Kulturbedingungen. Die Ciprobay®- Zugabe zum Medium erfolgte in 3 %- iger Konzentration zu Beginn der Kultur. Das Medium war wahlweise Vit.A- frei oder enthielt Vitamin A in „ physiologischer “ Konzentration. ¹²⁵I-Iodid wurde den Kulturen bei der Aussaat zugefügt und seine Aufnahme in die Thyreozyten zwischen 2 und 24 h Inkubationsdauer verfolgt. Dargestellt ist, aufgrund starker Schwankungen von Ansatz zu Ansatz, die prozentuale Normierung aller durchgeführten Ansätze bezogen auf die Kontrolle. Die Kontrolle wurde = 100 % gesetzt. Die Stichprobenanzahl n ist variabel. Die Ergebnisse können nicht als statistisch signifikant gewertet werden. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ¹²⁵I-Zugabe: 4 kBq ¹²⁵I-Iodid. Zugehörige Zahlenwerte in Tab. 8.2 im Anhang. (Ansatz VIII)

3.4 Immunhistochemischer Nachweis von NIS in Abhängigkeit unterschiedlicher Konzentrationen an Vitamin A im Kulturmedium

In Abb. 25. ist die Western-Blot-Analyse zum NIS-Nachweis in Schweinethyreozyten dargestellt. Die Thyreozyten wurden zunächst in retinoidhaltigem (0,6µM) oder retinoidfreiem Medium kultiviert. Zu 750 µl Medium wurden bei der

Aussaat 10 nmol, 30 nmol oder 50 nmol Retinol hinzugefügt. Anschließend die Zellen 3 Tage lang bei 37°C bebrütet und dann die Elektrophorese und der Western-Blot durchgeführt.

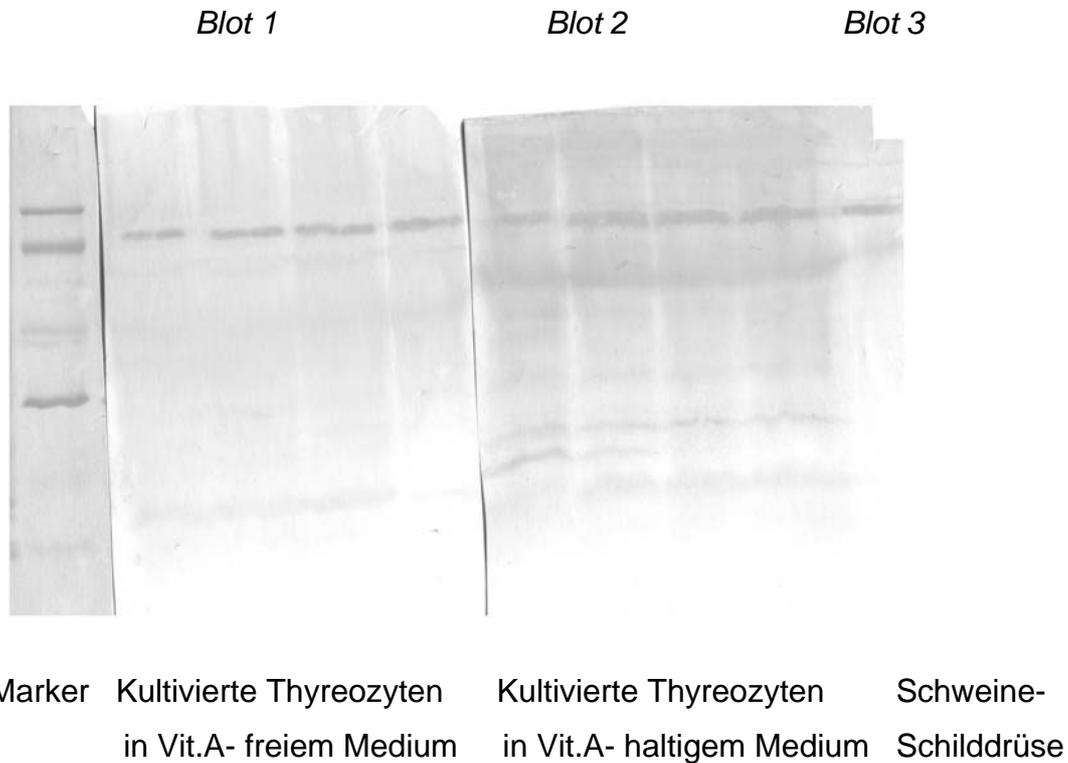


Abb. 25. Western-Blot zum NIS-Nachweis in Schweinethyreozyten.

Blot 1: Zellen in Vit.A- freiem Medium. Blot 2: Zellen in Vit.A- haltigem Medium.

Blot 3: Homogenat zur Kontrolle.

Ganz links sind die Marker aufgetragen. Ihren Banden lassen sich - von oben nach unten- folgenden Molekulargewichten zuordnen:

a) 94 kDa b) 67 kDa c) 43,3 kDa d) 30 kDa e) 21,1 kDa f) 14,4 kDa.

Beim Blot der Zellen entspricht die oberste Bande dem NIS mit einem MG zwischen 70- 90 kDa

Innerhalb von Blot 1 und 2 sind von links nach rechts aufgetragen:

Zellen ohne Stimulation, mit 10 nmol, 30 nmol oder 50 nmol Retinol stimuliert.

Das Ergebnis zeigt, dass es bei den mit Retinol behandelten Proben keine Unterschiede in der Menge der exprimierten NIS-Proteine gibt. Die Vorinkubation der Thyreozyten mit Vitamin A in physiologischer Konzentration oder ohne Vitamin A hat allenfalls einen marginalen Effekt auf die NIS-Expression. Möglicherweise ist die NIS-Menge bei den Thyreozyten, die in Vitamin A freiem Medium kultiviert wurden, geringgradig höher.

4. Diskussion

4.1 Methoden

Unsere Untersuchungen wurden an Primärkulturen vom Schwein durchgeführt. Primärkulturen haben den Vorteil, daß sie noch sämtliche in-vivo-Merkmale besitzen. Im Gegensatz zu den mit TSH stimulierten Thyreozyten, die follikelartige Strukturen bilden, bilden die nicht mit TSH stimulierten Thyreozyten in Kultur sogenannte Monolayer. Die Primärkulturen können Iodid aufnehmen und speichern. Der Nachteil von Primärkulturen liegt darin, dass für jede neue Untersuchungsreihe eine neue Zellkultur angelegt werden muss. Die Voraussetzungen von Kultur zu Kultur sind nicht völlig identisch, da die Zellen von verschiedenen Schweinen stammen. Diese können anderen Aufzuchtbedingungen unterliegen. So hat die unterschiedliche Nahrung der Schweine Einfluss auf den Schilddrüsenstoffwechsel. Hier seien besonders strumige Nahrungsmittel, wie zum Beispiel Raps oder Manjok erwähnt, deren Inhaltsstoffe die Iodidaufnahme in die Schilddrüse durch kompetitive Hemmung des NIS vermindern. Gleiches gilt für eine Beeinflussung durch Medikamentengaben während der Aufzucht. Solche Einflüsse lassen sich bei unseren Untersuchungen nicht ausschließen, da sich die Herkunft der Schweine für uns nicht zurückverfolgen lässt. Auch äußerliche Einflüsse haben Auswirkungen auf die Schweinethyreozyten. Hennemann et al. (1955) fanden eine Abhängigkeit des Schilddrüsenstoffwechsels von der Jahreszeit. Wahl (1991) beschreibt einen signifikanten Unterschied in der cAMP-Bildung in kultivierten Schweinethyreozyten in Abhängigkeit von der Jahreszeit (Frühjahr-Herbst). Da auch ein altersabhängiger Unterschied im Schilddrüsenstoffwechsel besteht, wurden nur Schilddrüsen von Schweinen im gleichen Alter verwendet. Diese Unterschiede manifestieren sich in der Höhe der Iodidaufnahme, nicht jedoch in der generellen Reaktionsfähigkeit auf einen Stimulus, sind also quantitativer und nicht qualitativer Art.

Ein weiteres Problem bei Primärkulturen ist die Gefahr der Kontamination. Diesem Problem wurde durch sterile Arbeitsweise und durch den Zusatz von

Antibiotika und Antimykotika zum Kulturmedium Rechnung getragen. Bei der Messung der Thymidinaufnahmeraten sei hier speziell auf das Problem der Kontamination durch Mykoplasmen hingewiesen. Mykoplasmen sind in der Lage, Thymidin aufzunehmen und somit das Ergebnis der Thymidininkorporation zu verfälschen. Eine solche Kontamination wurde zum einen mittels Testung auf Mykoplasmenkontamination ausgeschlossen, zum anderen werden Mykoplasmen aufgrund ihres geringen Durchmessers von nur ca. 0,8 µm nicht von den Glasfiltermatten des Zellharvesters mit einer Porengröße von 1,5 µm zurückgehalten. Sie werden damit dem Messvorgang entzogen.

Handelsübliches NCTC-135 - Medium enthält normalerweise 0,6 µM Vitamin A. Um den Retinoidzusatz zum Medium variabel halten zu können, wurde Vitamin A- freies NCTC-135 - Medium als Sonderanfertigung verwendet.

Das von uns verwendete Lykopin wurde in Form von Nanopartikeln verwendet. Diese Form läßt eine höhere Bioverfügbarkeit erwarten, da Nanopartikel aufgrund ihrer extem geringen Größe (100- 300 nm) sehr einfach in das Zellinnere gelangen können. Das wasserunlösliche Lykopin wird hierbei von einer Hülle aus Schutzkolloid (Gelatine) umgeben. Dadurch liegt das Lykopin zum einen in einer wasserlöslichen Form vor, zum anderen ist es vor Biodegradation geschützt. (Frauenhofer Institut Stuttgart, 2002, Internetmitteilung).

4.2 All-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure und Lykopin-Nanopartikel

Vitamin A und seine Derivate, die Retinoide, modulieren Wachstum und Differenzierung einer Vielzahl von Zellen (Hanck, 1991). Ihre Wirkung wird über spezielle Kernrezeptoren, die Retinoat- Rezeptoren RAR und RXR, vermittelt. Diese Rezeptoren regeln die Genexpression und sind damit verantwortlich für Wachstum und Differenzierung der Zellen (Jetten et al. 1979; Pemrick et al. 1994). Im aktiven Zustand liegen die Kernrezeptoren als Homodimere oder Heterodimere (Heterodimerbildung zum Beispiel mit RAR-, Vit. D3-, Thyroidhormon-Rezeptor) vor. Bei humanen follikulären Schilddrüsenkarzinomen können diese Rezeptoren in das Zytosol verlagert sein und verlieren damit ihre genregulierende Funktion. (Takiyama et al., 2004).

Retinoide wurden bereits Ende der vierziger Jahre des letzten Jahrhunderts von Simkins zur Strumatherapie eingesetzt (Simkins 1947). Die Erfolge dieser Therapie lassen sich zum Einen durch die verstärkte intrathyreoidale Iodidanreicherung, andererseits durch eine Induktion der Apoptose erklären. (Wahl et al. 1996; Fröhlich und Wahl 1999; Brtko und Thalhammer, 2003). Aufgrund gravierender toxischer Nebenwirkungen der Retinoide infolge einer zu hoch gewählten Dosis, ist diese Therapieform heute jedoch obsolet.

Um follikuläre Schilddrüsenmalignome, die meist kein Iodid mehr speichern, einer Radioiodtherapie zugänglich zu machen, werden diese häufig mit all-trans-Retinsäure behandelt (Schmutzler et al. 2002). Bei diesen Malignomen besteht ein Defekt des Iodidtransportes am basolateralen Zellpol. (Gerad et al. 2003). Als Ursache beschreiben Kroll et al. (2000) eine chromosomale Dislokation, verursacht durch die Fusion des DNA- bindenden Segments des PAX 8-Gens mit dem PPAR- γ -1-Gen. PAX 8 ist ein Transkriptionsfaktor der Schilddrüse und PPAR- γ -1 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Zelldifferenzierung stimuliert und das Wachstum hemmt. Das durch Fusion entstandene neue Gen (PPFP) blockiert die Wirkung von PPAR- γ -1 und könnte so die Zelldifferenzierung hemmen und das Wachstum stimulieren. Man erhofft sich daher neue Therapieansätze durch PPAR- γ -Agonisten bzw. weitere Co-Faktoren wie z.B. RXR (Mc Iver et al. 2004). Eine chromosomale Dislokation zeigt sich auch bei der akuten Promyelozytenleukämie (APL). Bei der APL werden Teile von Proteinen vom natürlichen Wirkort durch das Fusionsprotein PML-RAR α verlegt. (Fenaux, 1996; Parmar et al. 2003). Die davon betroffenen Krebszellen werden unter Retinsäurebehandlung zur Redifferenzierung angeregt, wobei die verlegten Proteine vollständig relokalisiert werden (Weis, 1994). Grenzen dieser Behandlung ergeben sich durch die Neurotoxizität und Teratogenität der all-trans-Retinsäure. Die Sensibilität der Malignome auf Retinoide hängt jedoch auch vom Vorhandensein entsprechender Rezeptoren und Proteinen ab, über welche die Retinoide erst ihre Wirksamkeit entfalten können. Schmutzler et al. (1998) stellten bei Untersuchungen verschiedener Karzinomzelllinien (FTC-133 und FTC-238 aus follikulären Schilddrüsenkarzinomen) eine unterschiedlich

ausgeprägte Expression von RAR- und RXR-Rezeptoren fest. Eine Reduktion der Anzahl der Tumorzellen durch Behandlung mit all-trans-Retinsäure konnte sowohl an FTC-133-Zellen, als auch an FTC-238-Zellen nachgewiesen werden. An FTC-238-Zellen war der Effekt geringer, denn FTC-238-Zellen zeigen eine geringere Expression von RAR β -mRNA. (Schmutzler et al. 2004).

Auf der Suche nach Retinsäure- ähnlichen Wirkstoffen mit weniger Nebenwirkungen, bot es sich an, das den Retinoiden chemisch ähnliche Carotinoid Lykopen zu untersuchen. Mehrere Studien zu Lykopen zeigten, daß Lykopen das Risiko bestimmter Malignomarten deutlich mindert. So stellte Mannisto et al. (2004) fest, daß Raucher ein geringeres Lungenkrebsrisiko aufweisen, wenn diese häufig carotinoidhaltige Kost zu sich nahmen. Einen Zusammenhang zwischen der Sterblichkeit und dem Plasma-Lykopengehalt bei Patienten mit Oral-, Pharynx-, oder Larynxkarzinomen stellte Mayne et al. (2004) fest. Bei Patienten mit einem Plasma-Lykopengehalt von 70 μg / l war die Sterblichkeitsrate deutlich reduziert. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt auch Erhardt et al. (2003). In einer Studie stellten die Autoren fest, daß Rauchen und ein Plasma-Lykopengehalt von unter 70 μg / l ein deutlich erhöhtes Risiko für das Entstehen von kolorektalen Karzinomen darstellt, während es bei Patienten mit ausgeprägtem Tomatenkonsum, der eine beträchtliche Lykopenzufuhr bedeutet, deutlich seltener zu einer entsprechenden Malignomentstehung aus Darmpolypen kommt. Eine carotinoidhaltige Diät senkt auch das Brustkrebs- und das Prostatakrebsrisiko um 60-70% (Donaldson et al. 2004). In einer Studie mit Prostatakarzinom- Patienten führte bereits eine Lykopen-Supplementierung von 2 x 15 mg / Tag (in Form eines Tomatenkonzentrates) nach drei Wochen zu einer 18%-igen Senkung des PSA, während die nicht supplementierte Kontrollgruppe einen 14%-igen Anstieg dieses PSA-Wertes aufwies. (Kucuk et al. 2001). Eine weitere, an Ratten mit Prostatakarzinomen durchgeführte Studie (Boileau et al. 2004) kam zu ähnlichen Ergebnissen, wenn lykopenreiche Tomatenkonzentrate verwendet wurden. Keine Wirkung zeigte hier reines Lykopen. Batieha et al. (1993) stellten in einer Fallstudie fest, daß kein Zusammenhang zwischen dem Serum-Lykopen-Gehalt und der Entstehung von Cervixkar-

zinomen besteht, allerdings konnte mit Fortschreiten der Krankheit ein Absinken des Serum-Lycopin-Gehaltes festgestellt werden.

In unseren Versuchen zeigte Lycopin unabhängig vom Vitamin A- Gehalt des Mediums keinen signifikanten Einfluss auf den Thymidin- und Iodidstoffwechsel. Riso et al. (2004) beschrieben jedoch einen Synergismus zwischen Vitamin C und Lycopin.

Reines Lycopin wird möglicherweise wegen seiner schlechten Wasserlöslichkeit nicht resorbiert. Bei der Wirkung des Lycopins sind mehrere Faktoren beteiligt. Zum einen sind seine antioxidativen Eigenschaften zu nennen. Lycopin macht die DNA weniger empfindlich auf oxidative Angriffe und moduliert DNA-Reparaturmechanismen. An menschlichen Lymphozyten zeigen sich jedoch bezüglich der Häufigkeit von Einzelstrangbrüchen der DNA keine Effekte.

(Astley et al. 2004). Auf molekularer Ebene bewirkt Lycopin eine Wiederherstellung der gestörten Zell-zu-Zell-Kommunikationen, indem es in Zellen von humanen Mundtumoren, die Transkription und Expression des Connexin 43, ein Schlüsselprotein aus der Familie der gap-junction-proteine, signifikant steigert. Für diesen Erfolg war allerdings eine hohe Konzentration (3-7 μ mol/ l) an Lycopin und eine relativ lange Inkubationsdauer (24 - 48 h) notwendig (Livny et al. 2002). Dies stimmt mit den Ergebnissen unserer Versuche überein. Eine leicht erhöhte, jedoch nicht signifikante ³H-Thymidinaufnahme zeigte sich frühestens nach 16 h, bei der ¹²⁵I-Iodidaufnahme frühestens nach 24 h Inkubationszeit. Die relativ geringen Auswirkungen auf den Thymidin- und Iodstoffwechsel in unseren gesunden Zellen, könnten damit begründet sein, dass Lycopin in entdifferenzierten Geweben seine protektive Wirkung über eine Verminderung der in entdifferenzierten Gewebe erhöhten IGF-I- und IL-6- Ausschüttung vermittelt. Siler et al. (2004), stellten diese Wirkung in einer Untersuchung an Prostatakarzinomgewebe fest. Levy et al. beschrieben 1995 die Hemmung der IGF-I-induzierten Zellproliferation infolge von Lycopin-Zugaben (5 mmol/ l) zu Zelllinien-Kulturen von Mammakarzinomen (MCF-7) und Lungenkarzinomen (NCI-H226). Die Autoren beschrieben ebenfalls die deutlich geringere Hemmung der Zellproliferation an gesunden Fibroblasten. Countryman et al. (1991), stellten eine Potenzierung dieser IGF-I hemmenden Wirkung des

Lykopins durch gleichzeitige Zugabe von Retinsäure zu Kulturen einer humanen Leukämie-Zell-Linie.

4.3 Radioiodaufnahme

Die Auswertung unserer Versuche zur Steigerung der Radioiodidaufnahme in Thyreozyten unter Retinol (Abb. 3a, 5a und 7a) und 13-cis-Retinsäure (Abb. 3b, 5b und 7b) zeigen keine einheitlichen Ergebnisse. So erhöht Retinol in einer Versuchsreihe durchweg die Aufnahme von Radioiodid in die Thyreozyten, während in einer anderen Versuchsreihe nur durch die höchste gewählte Retinolkonzentration (13 μ M) die Radioiodaufnahme gegenüber der nicht stimulierten Kontrolle kontinuierlich erhöht ist. Ähnlich verhält es sich bei den mit 13-cis-Retinsäure stimulierten Zellen. Sie weisen nur zum Teil eine erhöhte Iodidinkorporation, verglichen mit der nicht stimulierten Kontrolle, auf.

Generell zeigen die mit Retinol behandelten Zellen höhere Aufnahmeraten an ^{125}I -Iodid als die mit 13-cis-Retinsäure stimulierten Zellen. Dieses Ergebnis spricht zunächst gegen die Tatsache, daß Retinsäure der aktive Metabolit des Retinols ist. Retinol besitzt eine alkoholische Gruppe. Außerdem ist es, wie Retinsäure auch, in Methanol gelöst. Durch seine alkoholische Eigenschaft kann Retinol die Membranfluidität der Zellen so verändern, daß vermehrt NIS-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert werden. (Fröhlich et al. 2004) Dadurch wird die gesteigerte Iodidaufnahme unter Retinol verglichen mit der Stimulation unter 13-cis-Retinsäure durchaus nachvollziehbar.

Eine Ursache für die uneinheitlichen Versuchsergebnisse könnten unter anderem die unterschiedlichen Aufzuchtbedingungen der für die Versuchsreihen verwendeten Schweine sein, da sich, wie bereits oben erwähnt, unterschiedliche Nahrungsbeschaffenheiten auf den Iodidgehalt der Schilddrüsen auswirken können. Die Iodidaufnahme in die Thyreozyten hängt ihrerseits auch vom vorliegenden intrathyreoidalen Iodgehalt ab. (Pfannenstiel, 1991). Das Wirkprofil von Lykopin auf die Radioiodaufnahme über den gesamten Zeitraum

betrachtet (Abb. 9c, 11c, 13c und 16c) zeigt bei zwei Ansätzen in Vitamin A-haltigem Medium eine deutliche Verminderung der Iodidaufnahme um ca. 50% (Abb. 9c, 11c). Bei einem Ansatz war dies nicht der Fall (Abb. 16c). Im entsprechenden Versuch in Vitamin A-freiem Medium hat Lycopin und das entsprechende Placebo gegenüber der Kontrolle keinen Einfluss.

4.4 Thymidinaufnahme

Bei unseren Versuchen zur ^3H -Thymidinaufnahme (Abb. 2, 4 und 6) in Thyreozyten zeigen sich relativ niedrige Impulszahlen verglichen mit den in der Literatur beschriebenen ^3H -Thymidin-Aufnahmeraten. Grund dafür ist, daß das verwendete NCTC-Medium bereits „kaltes“ Thymidin enthält. Beim Zusatz von radioaktiv markiertem Thymidin zu den Kulturen wird dessen spezifische Radioaktivität verdünnt. Bei nicht transformierten Zellen vom Schwein verläuft die ^3H -Thymidinaufnahme parallel zum Einbau in deren DNS (Wahl, 1991) und kann daher als Wachstumsparameter gewertet werden.

In unseren Versuchen (Abb. 2a, 4a, 6a) zeigt Retinol bereits nach 4 h eine steigernde Wirkung auf die Thymidinaufnahme in die Thyreozyten, verglichen mit den nicht stimulierten Zellen. Dieser anfänglich erhöhte Einbau relativiert sich jedoch mit zunehmender Inkubationszeit und gleicht sich ab ca. 17 h den Einbauraten bei den nicht stimulierten Kontroll-Thyreozyten an. Insgesamt zeigte sich die höchste Thymidinaufnahme bei den Thyreozyten, welche mit $0,98 \mu\text{M}$ Retinol vorinkubiert wurden. Die „physiologische“ Retinolkonzentration im Kulturmedium liegt bei ca. $0,6 \mu\text{M}$. Die Retinolkonzentration von $0,98 \mu\text{M}$ war die höchste für die Vorinkubation gewählte Konzentration. Die sich dem Maximum anschließende, wieder abfallende Thymidinaufnahme (Abb. 2a bei $t=24 \text{ h}$; Abb. 4a, 6a bei $t=17 \text{ h}$) könnte mit der Apoptose induzierenden Wirkung der Retinoide erklärt werden. Fröhlich und Wahl (2004) stellten bei normalen, nicht transformierten Schilddrüsenzellen eine biphasische Wirkung der Retinoide fest. In den ersten 12 h der Inkubation mit $13 \mu\text{M}$ Retinol konnte ein Ansteigen der Iodidaufnahmerate gemessen werden. Ab einer Inkubationsdauer von 30 h und länger kam es dann bei einer Konzentration von $\geq 13 \mu\text{M}$

Retinol zu einer Steigerung der Apoptoserate bei gleichzeitiger Verminderung des Iodideinbaus. Eine Inkubation der Zellen mit 6,5 μM Retinol ergab keinen Hinweis auf eine Steigerung der Apoptose, gemessen an der ^3H -Thymidininaufnahmerate. Bei mit 10 μM Retinol inkubierten Kulturen von Schweine-thyreozyten konnte eine Steigerung der Apoptose auf 66% gemessen werden. (Amann JN, 2002).

Iwata et al. (1992) und Nagy et al. (1995) wiesen diese Wirkung der Retinoide an verschiedenen Tumorzelllinien nach. An der Steuerung der Apoptose sind die Kernrezeptoren RAR und RXR beteiligt. (Szondy et al., 1998). Holmes et al. (2000) zeigten, dass eine Hemmung der RAR-Rezeptoren die Apoptose hemmt, aber nicht völlig ausschaltet. Gianni et al. (2000) beschrieben den apoptoseinduzierenden Effekt der 9-cis-Retinsäure via RXR-Rezeptoren in einem Modell mit Zellen der Akuten Promyelozytenleukämie. Konta et al. (2001) berichten einerseits über die Minderung der Apoptose durch entsprechende Rezeptorantagonisten (AGN 193109 für RAR, HX 531 für RXR), andererseits über die fehlende Apoptosewirkung der all-trans-Retinsäure auf genmutierte RAR-Rezeptoren.

Unter 13-cis-Retinsäure kam es bei unseren Versuchen zu Beginn der Inkubation zunächst zu einem Abfall der ^3H -Aufnahmerate (Abb. 2b, 4b, 6b). Diese glich sich nach 17 h den Messwerten der Kontrolle an. Nach 24 h kam es zu einem verstärkenden Effekt auf die Thymidinaufnahme. Mit fortschreitender Inkubation, fiel die ^3H -Thymidinaufnahme nach 48 h wieder ab. Eine der Ursachen für diese phasenförmige Thymidinaufnahme ist der Zellzyklus. In der Literatur werden unterschiedliche Stoffwechseleffekte unter 13-cis-Retinsäure beschrieben. Sultana et al.(2004) wiesen an einem Modellversuch mit Hautzellen eine karzinompräventive Aktivität der 13-cis-Retinsäure nach. Die Wirkung scheint hier in einer Hemmung der Angriffe durch freie Radikale zu liegen. Dawson et al. (2004) beschreiben all-trans-, 9-cis-, 13-cis-Retinsäure und vier weitere synthetisch hergestellte Retinoide als wirksame Wirkstoffe zur Behandlung von Hyperplasien, wie sie zum Beispiel bei Akne, Psoriasis, T-Zell- Lymphomen, Basalzellkarzinomen oder Promyelozytenleukämie auftreten. Die

Autoren weisen aber darauf hin, daß die Retinsäure-Wirkung vom Vorhandensein entsprechender Rezeptoren vom Typ RXR abhängig ist. Von Bexarotene, dem ersten synthetischen für RXR hochselektiven Retinoid weiß man, dass es, oral verabreicht, die Apoptose von CTCL-Zellen (T-Zell-Lymphom-Zellen) bewirkt (Zhang et al. 2003).

Der Verlust an RAR- β -Rezeptoren in einigen Tumorgeweben ist vermutlich die Folge von Geninaktivierungen und nicht von Genverlegungen. So zeigte 13-cis-Retinsäure bei Patienten mit Lungenkarzinomen oder entsprechenden Präkanzerosen keinerlei Wirkung, während 9-cis-Retin-säure die Anzahl von RAR-Rezeptoren erhöhte. (Khuri et al., 2004). Schmutzler et al., 2004 stellten an FTC-133 und FTC-238 Zelllinien (follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen) ebenfalls eine Abhängigkeit der Wirkung von all-trans-Retinsäure vom Vorhandensein der entsprechenden RAR- oder RXR- Rezeptoren fest. Bei FTC-238-Zellen mit ihrer verringerten Anzahl an RAR- β - Rezeptoren kam es unter all-trans-Retinsäure zu einer sehr viel geringeren Reduktion der Tumorzellen als bei FTC-133-Zellen, die diesen Rezeptor ausreichend aufweisen. RAR-Rezeptoren können bei Malignomen auch inaktiv sein, z.B. durch Methylierung (Vollberg et al., 1992).

Siegel et al.(2004) stellten in einer Studie mit 502 brasilianischen Frauen fest, dass der natürliche Plasmagehalt an Retinsäure und die eventuell auftretende Toxizität unter den verabreichten Retinoiden „lifestyle“- abhängig ist. So beeinflussten Alter, Rasse, Anzahl der Schwangerschaften, Jahreszeit, Ernährung oder die Einnahme oraler Kontrazeptiva die Plasmakonzentration an zirkulierender Retinsäure und damit auch deren Anzahl an Rezeptoren. Dieser Zusammenhang könnte indirekt auch bei unseren Versuchen eine Rolle spielen. Zwar war das Alter der verwendeten Schweine ungefähr gleich, aber die Ernährung, die Verabreichung verschiedener Medikamente, die Einkreuzung verschiedener Rassen und die Jahreszeit stellen Faktoren dar, welche die Ergebnisse durchaus beeinflussen könnten.

In unseren Versuchen zeigte sich eine tendentiell verminderte Thymidinaufnahmerate unter Lykopen-Stimulation (Abb. 8, 10, 12, 15, 18, 20). Nur wenn das Medium Vitamin A enthielt, zeigte sich eine Erhöhung der Thymidinaufnahme.

Ein proliferationshemmender Effekt wurde auch von Ben-Dor et al. (2001) beschrieben. Lykopen verlangsamte den Zellzyklus in humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7). Kim et al. stellten 2003 in einer Studie fest, dass Lykopen (30 mg / Tag) in Prostatakarzinomgeweben die Apoptose stärker erhöhte als in gutartigen Geweben von Prostatahyperplasien. Der Einfluss des Lykopins in erkranktem Gewebe ist also ein anderer, als in Gesunden. Die Ergebnisse unserer Versuche, die an normalen Thyreozyten durchgeführt wurden, lassen sich somit nicht generell auf erkrankte Schilddrüsengewebe übertragen. Herzog et al.(2005) stellten in Versuchen an Ratten fest, dass eine Lykopinsupplementierung von 200 ppm / Tag (für 8 Wochen) in gesundem Prostatagewebe nicht in allen Prostata-Lappen die gleiche Anreicherung bewirkte. Die lateralen Lappen zeigten eine signifikant höhere Lykopinanreicherung als die anderen Lappen und es konnte eine Reduktion von Transkriptionsfaktoren, inflammatorischen Zytokinen und IGF-I in den lateralen Prostatalappen nachgewiesen werden. Dies veranschaulicht zum einen, die konzentrationsabhängige Wirkung des Lykopins, zum andern zeigt es lokale Unterschiede die Anreicherung betreffend. Wenn Lykopen in unseren nicht transformierten Zellen keinen Effekt zeigt, so bedeutet dies noch nicht, daß dieses Verhalten auch für transformierte Zellen zutrifft. Der fehlende Einfluss auf normale Zellen wäre für eine Befundung von Schilddrüsenmalignomen sogar von Vorteil. Bezüglich der Vitamin A- Abhängigkeit der Wirkung von Lykopen führten Mc Devitt et al., 2005 einen Versuch an Zelllinien humaner Monozyten und Makrophagen durch.

U-937 Zellen wurden zwischen einem und sechs Tage lang mit Lykopen angereichertem Serum (2-8 mmol / l) inkubiert, daraus resultierte ein Lykopengehalt von 0,2- 1,1 nmol / mg Zellprotein, was der ungefähr 10-fachen Menge des in-vivo-Gehaltes von Zellen entspricht. In dieser Konzentration bewirkte Lykopen eine Proliferationshemmung und regte als einziges Carotinoid (im Test außerdem β -Carotin und Lutein) sogar die Differenzierung der Zellen an.

Aufgrund der Diagramme 8c, 10c, 12c und 15c zeigt sich kein statistischer Einfluß bezüglich der ^3H -Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten durch Lykopen. Möglicherweise könnte sich bei einem größer angelegten Versuchs-

ansatz doch ein sicherer Einfluss von Lykopen und Placebo gegenüber der Kontrolle bemerkbar machen.

4.5 Einfluss von all-trans-Retinol auf die Expression von NIS-Protein

Zwischen den Thyreozyten die in Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an Retinol inkubiert wurden und Thyreozyten, die ohne Zugabe von Retinol zum Medium behandelt wurden, zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Menge exprimierter NIS-Proteine. Obwohl die Retinolbehandlung die Anzahl der NIS-Proteine nicht beeinflusst, kam es in unseren Versuchen unter Retinol zu einer Steigerung der Iodidaufnahme in die Schilddrüsenzellen. Verschiedene Erklärungen sind denkbar. Nasu et al. (1993) beschrieben eine Erhöhung der Iodidaufnahme in Schweineschilddrüsenzellen unter Ethanol und erklären diese mit einer Erhöhung der cAMP-Bildung. Beyer, CH (2004) zeigte ebenfalls an Schweineschilddrüsenzellen eine deutlich gesteigerte Iodidinkorporation auch unter Methanol. Retinol selbst besitzt auch eine alkoholische OH-Gruppe und ist außerdem in Methanol gelöst. Diese einfachen Alkohole könnten aber auch die Fluidität der Thyreozytenmembran beeinflussen, so daß mehr NIS-Proteine an die Oberfläche verlagert werden, ohne daß ihre absolute Zahl zunimmt (Fröhlich et al., 2004). Dies würde die gesteigerte Iodidaufnahme unter Retinol erklären. Eine weitere Erklärung könnte die unterschiedliche Aktivität der vorhandenen NIS-Moleküle sein. So beschrieben Levy et al., 1998 ein NIS-Molekül (T354P), welches zwar an der Zellmembran lokalisiert, aber gänzlich inaktiv war. Davies et al., 2002 zeigten, daß RAR- und RXR-Rezeptoren in ihrer monomeren Form aktiv, in ihrer oligomeren Form jedoch inaktiv sind. So könnte Retinol auch die Monomerisierung der Rezeptoren bewirken und damit deren Aktivität steigern. Mit gesteigerter Aktivität könnte mehr TSH gebunden werden. TSH wiederum weist einen sehr hohen steigernden Effekt auf die Iodidinkorporation auf. Fröhlich et al. (2004) zeigten die Abhängigkeit der NIS-Synthese von TSH in Schweinethyreozyten. Diese Studien machen deutlich, daß die Iodidaufnahme nicht allein von der Menge an NIS-Proteinen abhängig ist. Dohan et al. (2001) wiesen an Gewebeschnitten von verschiedenen Schilddrüsenmalignomen nach, dass in 70 % der unter-

suchten Proben, mit verminderter Iodidaufnahme, die Menge an NIS nicht vermindert sondern meist sogar deutlich erhöht war, aber daß in diesen Geweben der NIS entweder nicht an der Oberfläche der Zellmembran lokalisiert war, bzw. nicht dauerhaft an der Zelloberfläche installiert werden konnte.

4.6 Ciprobay®- Zugabe zum Kulturmedium und seine Auswirkung auf die Iodid- und Thymidinaufnahme

In Vitamin A- freiem Medium zeigte die Zugabe von Ciprobay® zu Beginn der Inkubation einen hemmenden Effekt auf den Thymidineinbau in Schweine-thyreozyten, nach 24 h zeigte sich hingegen kein Unterschied mehr, verglichen mit der Kontrolle ohne Ciprobay®- Zugabe. Thyreozyten, die in Vit. A- haltigem Medium inkubiert wurden, zeigten zu Beginn des Ansatzes (t = 2 h und 4 h) unter Zugabe von Ciprobay® eine Erhöhung der Thymidininkorporation (Abb. 23), während sich nach 24 h eine Verminderung der Thymidinaufnahmerate unter Ciprobay® zeigte. Aranha et al. (2000), zeigten an der HTB-9-Zelllinie (Harnröhrenkarzinomzellen) einen wachstumshemmenden Effekt unter Ciprobay®, welcher sich mit zunehmender Inkubationszeit verstärkte. Als Ursache beschreiben die Autoren die Abnahme des Proteins p21WAF1 (ein cyclinabhängiger Kinasehemmer und dadurch die Apoptose vermindern), dessen Konzentration nach 12 h deutlich reduziert war und nach 24 h auf Null absank. Dies bestätigt die bei unseren Versuchen gemessene verminderte Thymidinaufnahmerate nach 24 h. An der gleichen Zelllinie wiesen auch Kamat et al. (2004) eine konzentrationsabhängige zytotoxische Wirkung von Ciprobay® und von Cefazolin, Sulfamethazol und Nitrofurantoin nach. Aranha et al. (2002) beschrieben als weiteren Wirkungsmechanismus von Ciprobay® die Depolarisierung der Mitochondrien, indem es den intramitochondrialen Kalziumgehalt binnen fünf Minuten absinken lässt, was über eine Aktivierung von Caspase-3 zur Apoptose der Zellen führt. Als Schutzsubstanz vor dieser Apoptose beschreiben die Autoren Cyclosporin A, welches die Permeabilität der Mitochondrienmembranen hemmt, dadurch einen vermehrten Kalziumausstrom und die folgende Depolarisation der Mitochondrien vermindert und so die Zellen

vor Apoptose schützt. Der schnelle Wirkungseintritt von Ciprobay® würde die in unseren Versuchen zu Beginn der Inkubation gemessene verminderte Thymidinaufnahme in die in Vit. A- freiem Medium kultivierten Thyreozyten nach 2 h erklären können.

In einer weiteren Studie berichten Herold et al. (2002), dass Ciprobay® zwar die DNA-Synthese in Kolonkarzinomzellen (CC-531, SW-403, HT29) unterdrückt und die Apoptoserate steigert, nicht jedoch bei Karzinomzellen der Leber (HepG2). Aranha et al. (2003) beschreiben eine gesteigerte Apoptose und die Hemmung des Zellwachstums durch Ciprobay® bei Prostatakarzinomzellen (PC3) mit 70-100%. Als wirkungslos erwies sich das Medikament in dieser Studie jedoch bei normalen Prostata-Epithelzellen (MLC8891). Dieses Ergebnis deckt sich auch mit unseren Beobachtungen, wonach Ciprobay® auf die Thymidinaufnahme bei normalen Thyreozyten keine Wirkung zeigt. Thyreozyten die mit Ciprobay® in Vit. A- haltigem Medium inkubiert wurden, zeigen deutlich höhere Impulsraten als die Kontrolle und als die Ciprobay®-freien Zellen. Ciprobay® hat auf die Proliferation und Apoptose normaler Thyreozyten keine Wirkung.

Die Aufnahmeraten von ^{125}I -Iodid (Abb. 24) zeigten sich unter Ciprobay® in den ersten 4 h der Inkubation generell vermindert, in Vit. A- haltigem Medium setzt sich diese Minderung über die gesamte Ansatzdauer fort, während sich die Aufnahmeraten der Thyreozyten in Vit. A- freiem Medium und Ciprobay®-Zusatz nach 18 h der Kontrolle angleichen. Gegebenenfalls müßte hier die Ciprobay®-Dosis erhöht werden, um einen sicheren Effekt unter Ciprobay® zu erkennen.

Aussicht

Die Wirkung von Retinoiden ist von vielen Faktoren abhängig, z.B. vom Vorhandensein entsprechender nukleärer Rezeptoren wie RAR oder RXR. Deren Expression kann in den unterschiedlichen Malignomen sehr verschieden sein. Retinolbindungsproteine (CRBP) befördern die Substanzen vom Zytosol zu ihren Rezeptoren. Die Wirkung der Retinoide hängt somit auch von diesen Transportproteinen ab. Cvetkovic et al. (2003) stellten fest, daß bei 35% der

untersuchten Ovarialkarzinome kein CRBP 1 (Cellular Retinol Binding Protein) nachweisbar ist. Da dieses Fehlen unabhängig vom Grad der Erkrankung ist, stellt ein veränderter Vitamin A- Stoffwechsel eine mögliche Ursache für die Karzinomentstehung dar.

Vollberg et al., 1992 stellten fest, dass Derivate der Retinsäure mit Benzoaten eine Retinoidwirkung hervorrufen können, ohne an CRBP zu binden. Diese Tatsache ermutigt dazu, neue synthetische Retinoide herzustellen, welche die Transportproteine umgehen können. Um et al. (2003) stellen ein neues synthetische Retinoid mit der Abkürzung ABPN vor, das in HCT-116-Zellen (Kolonkarzinom-Zelllinie) die beste Wachstumshemmung von allen untersuchten Retinoiden (unter anderem all-trans-Retinsäure und Fenretinid) schon bei einer Konzentration von 0,6 µM hervorrief. Seine Wirkung beruht zum einen auf die Induktion der Apoptose mittels Aktivierung von Caspase- 3 und - 8, ausserdem bewirkt ABPN im Gegensatz zu Fenretinid die Aktivierung aller drei RAR-Kernrezeptor-Subtypen. Durch Hemmung der AP-1-Transkriptionsaktivität kommt es zu einer geringeren Expression der Matrix-Metalloproteinasen 1, 2 und 3, welche für die Tumorinvasion mit verantwortlich sind. Somit stellt ABPN ein vielversprechendes Retinoid mit zytotoxischer und antiinvasiver Wirkung dar.

Mehr Aufmerksamkeit sollte auch der 9-cis-Retinsäure gewidmet werden. So zeigt sie verglichen mit 13-cis-Retinsäure ein größeres genregulatorisches Potential. (Blaner WS, 2001). In einer Studie an Rauchern wurde festgestellt, daß dem Bronchialepithel die RAR-β-Rezeptoren fehlen. Durch eine dreimonatige Behandlung mit 100 mg 9-cis-Retinsäure pro Tag kam es zu einem signifikanten Anstieg von RAR-β. Mit 9-cis-Retinsäure behandelte Probanden (ehemalige Raucher) zeigten außerdem eine deutlich geringere Tendenz zur Bildung von Metaplasien. 13-cis- und all-trans-Retinsäure zeigten keine Wirkung. (Kurie JM et al. 2003).

Obwohl Lykopen mit Retinol eng verwandt ist, scheint es den Thymidin- und ¹²⁵I-Stoffwechsel von Schilddrüsen nicht zu beeinflussen, im Gegensatz zu vielen anderen Geweben, wie z.B. Prostata, Leber, Lunge, Brust. (Gerster, MA, 1997).

Aufgrund der mehrfach beschriebenen konzentrationsabhängigen Wirkung des Lykopins, wäre es interessant zu wissen, wieviel Lykopin tatsächlich in den Thyreozyten angereichert wird. Es könnte dadurch zum einen die Bioverfügbarkeit, zum anderen die Aufnahme von Lykopin in die Thyreozyten festgestellt werden. Damit ließe sich eine definitive Wirkung auf den Iodid- und Thymidinstoffwechsel erfassen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure, Lycopin in Form von Nanopartikeln und von Ciprobay® auf das Wachstum und den Stoffwechsel von kultivierten Schweinethyreozyten untersucht. Bei den Kulturen handelt es sich um Primärkulturen.

Als Parameter für das Wachstum diente die ^3H -Thymidinaufnahme und als Parameter für den Stoffwechsel die ^{125}I -Iodid-Aufnahme in die Thyreozyten. Die Thyreozyten wurden wahlweise in retinoidfreiem oder in retinoidhaltigem Medium kultiviert. Für die Vorinkubation (Ansätze I-III, Abb.2-7) betrug die Retinolkonzentration 0; 0,49 und 0,98 μM . Nach dreitägiger Vorinkubation der Thyreozyten in retinolfreiem oder retinolhaltigem Medium erfolgte ein Wechsel des Mediums. Die retinolhaltigen Medien wurden dann ersetzt durch solche, die entweder 13 μM Retinol, 13 μM 13-cis-Retinsäure oder 13 μM Lycopin und je nach Versuchsreihe zusätzlich noch 3 Vol. % Ciprobay® pro Kultur enthielten. Die Ansätze IV-VIII (Abb. 10- 24) wurden direkt mit dem entsprechenden Medium (Vit.A-haltig/ oder Vit.A-frei) und der entsprechenden Substanz ohne Vorinkubation ausgesät und frühestens nach 18 h geerntet.

5.1 Zusammenfassung Thymidinaufnahme

Retinol steigert die ^3H -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten. Die Höhe der maximalen Aufnahmeraten sowie der Zeitpunkt des erreichten Maximums variierten bei den einzelnen Ansätzen. 13-cis-Retinsäure hatte einen eher hemmenden Effekt auf die ^3H -Aufnahmerate. In den unterschiedlichen Ansätzen zeigten sich allerdings leichte Unterschiede. Jene Zellen, welche zunächst mit 0,98 μM und anschließend mit 13 μM Retinol stimuliert wurden, weisen gegenüber der Kontrolle die höchste Steigerung der Thymidinaufnahme auf. In einer Kultur kam es unter 13-cis-Retinsäure allerdings zu einer Verschiebung des Zeitpunktes der maximalen Aufnahmerate (ohne Stimulation nach 48 h, mit 13-cis-Retinsäure bereits nach 24h). Zu diesem Zeitpunkt (t= 24 h) unterschied sich die Thymidinaufnahmerate auch signifikant von der nicht

stimulierten Kontrolle. Diese Aufnahmerate war jedoch nicht höher als die Kontrolle, wenn man sie auf den Mittelwert der nicht stimulierten Kontrollen innerhalb des gesamten Versuchszeitraumes (t= 48 h) bezog. Eine signifikante Erhöhung der Thymidinaufnahme gegenüber der Kontrolle fand sich außerdem bei einem Ansatz, der über 65 h verfolgt wurde. Hier fand sich nach 54 h eine signifikante Steigerung der Thymidinaufnahme.

Lykopen-Nanopartikel hatten auf die Thymidinaufnahme der Thyreozyten insgesamt gesehen keinen steigernden Effekt, das Maximum der nicht stimulierten Kontrolle wurde zu keinem Zeitpunkt übertroffen.

Ciprobay® zeigte nur in Verbindung mit Vitamin A- haltigem Medium eine kurz andauernde (bis 4 h) leichte Erhöhung der Thymidinaufnahmerate. Bei längerer Inkubationszeit (16-30 h) und in den Ansätzen mit retinolfreiem Medium zeigte sich eher eine Thymidinabnahme. Keiner dieser Effekte ließ sich jedoch statistisch sichern.

5.2 Zusammenfassung Iodidaufnahme

In unseren Versuchen zeigte 13-cis-Retinsäure keinen signifikanten Einfluss auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die Thyreozyten. Die Maxima der Iodidaufnahme wurden verglichen mit der Kontrolle allenfalls früher erreicht. Im Gegensatz dazu steigerte Retinol die maximale Aufnahmerate des Radioiodids signifikant. Da die Radioiodidaufnahme in die kultivierten Thyreozyten phasenförmig verläuft, zeigte sich eine vorübergehende signifikante Steigerung der Iodidaufnahme nach 4 h Inkubationszeit und dann wieder nach 48 h.

Lykopen-Nanopartikel in einer Konzentration von 13 µM führten zu keiner Steigerung der Iodidaufnahmeraten in die Thyreozyten. Enthielt das Inkubationsmedium Vitamin A, so hatten die mit Lykopen stimulierten Thyreozyten ähnliche Aufnahmeraten wie die nicht stimulierten Zellen. War kein Vitamin A im Medium enthalten, so war die Aufnahmerate von ¹²⁵I-Iodid in der Lykopen-Gruppe nicht signifikant vermindert. Damit ist Lykopen, trotz seiner chemischen Ähnlichkeit zu Retinol, zumindest in einer Konzentration von 13 µM kein Ersatz zu Retinol.

Der Einfluss von 3 Vol.% Ciprobay® auf die Iodidaufnahme ist insgesamt ein hemmender. In der frühen Inkubationsphase kam es bei einzelnen Ansätzen zu einer Erhöhung der Radioiodaufnahme, die durch andere Versuchsreihen jedoch nicht bestätigt wurde.

5.3 Zusammenfassung NIS

Der immunhistochemische Nachweis der NIS-Expression zeigte, dass die NIS-Menge unabhängig von der Retinolkonzentration relativ konstant blieb. Das Standard-NCTC- Medium mit einer physiologischen Konzentration an Vitamin A induzierte eine etwas höhere NIS-Expression.

6. Literatur

1. Arnhold, Th
Untersuchungen zum Metabolismus von Vitamin A/ Retinoiden im
Hinblick auf eine Risikoabschätzung ihrer teratogenen Wirkung beim
Menschen
Rer.nat. Dissertation, Braunschweig 2000
2. Aijan, R.A., et al.
The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found
in autoimmunity.
J.Endocrinol, 1998. 158: p. 351-8
3. Amann, JN.
Der Einfluss von all-trans-Retinol, all-trans-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure
und Lykopen
a) auf den ³H-Thymidineinbau in kultivierte Schweinethyreozyten
b) auf die Apoptoserate kultivierter Thyreozyten
Med. Dissertation, Tübingen 2002
4. Aranha O; Grigon R; Fernandes N; Mc Donnell TJ; Wood DP; Sarkar FH
Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is
associated with cell cycle arrest and apoptosis.
Int J Oncol 2003 Apr;22:787-94
5. Aranha O; Wood DP; Sarkar FH
Ciprofloxacin mediated cell growth inhibition, S/G2 cell cycle arrest, and
apoptosis in human transitional cell carcinoma of the bladder cell line.
Clin Cancer Res 2000 Mar;6: 891-900
6. Aranha O; Zhu L; Alhasan S; Wood DP; Kuo TH; Sarkar FH
Role of mitochondria in ciprofloxacin induced apoptosis in bladder cancer
cells
J Urol 2002 Mar;167:1288-94
7. Bankson DD., Countryman CJ., Collins SJ. (1991)
Potentiation of the retinoic acid induced differentiation of HL-60 cells by

- Lycopene (Abstract)
Am J Clin. Nutr. 53 Suppl, p. 13
8. Ben- Dor A.; Nahum A.; Danilenko M.; Giat Y.; Stahl W.; Martin HD.;
Emmerich T.; Noy N.; Levy J.; Sharoni Y.
Effects of acyclo-retinoic acid and lycopene on activation of retinoic acid
receptor and proliferation of mammary cancer cells.
Arch Biochem Biophys 2001 Jul 15; 391: 295-302
 9. Bertram JS., Pung A., Churley M., Kappock TJ., Wilkins SR., Cooney
RV.
Diverse carotenoids protect against chemically induced neoplastic trans-
formation
Carcinogenesis 12:671-678 (1991)
 10. Beyer, CH.
Der Einfluss von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinsäure, Methanol und TSH
unter verschiedenen Kulturbedingungen auf den ¹²⁵I-Stoffwechsel von
kultivierten Thyreozyten und deren RAR α - und RXR α -Rezeptoren
Med. Dissertation, Tübingen 2004
 11. Blaner WS
Cellular mechanism and actions of 13-cis retinoic acid.
J Am Acad Dermatol 2001 Nov;45:S129-35
 12. Boileau TW; Liao Z; Kim S; et al.
Prostate carcinogenesis in N- methyl-N- nitrosourea (NMU)- testosterone-
treated rats fed tomato powder, lycopene, or energy-restricted diets
J Natl Cancer Inst. (United States), Nov 5 2003, 95 p 1578-86
 13. Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, 1998
Na⁺/I⁻-symporter distribution in human thyroid tissues: An immunohisto-
chemical study.
J Clin. Endocrinol Metab 83 :4102-4106
 14. Carrasco, N. 1993
Iodide transport in thyroid gland.
Biochem Biophys Acta 1154:65-82

15. Castro MR, Bergert ER, Beito TG, MC Iver BD, Goellner JR, Morris JC
Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: Immunohistochemical Characterization of this protein in thyroid cells.
J Clin Endocrinol Metab 1999, 84:2957-2962
16. Cerutti JM; Ebina KN; Matuso SE; Martins L; Maciel RM; Kimura ET
Expression of Smad 4 and Smad 7 in human thyroid follicular carcinoma cell lines
J Endocrinol Invest 2003 Jun; 26: 516-21
17. Countryman C., Bankson D., Collins S., Mar B., Lin W.
Lycopene inhibits growth of the HL-60 promyelocytic leukemia cell line
Clin. Chem. 37: 1056 (1991)
18. Cvetkovic D; Williams SJ; Hamilton TC
Loss of cellular retinol- binding protein 1 gene expression in microdissected human ovarian cancer.
Clin Cancer Res 2003 Mar; 9: 1013-20
19. Dai, G., O.Levy, and N.Carrasco, Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter.
Nature, 1996. 379: p. 458-60
20. De La Vieja, A., Dohan O, Levy O, Carrasco N
Molecular analysis of the sodium/iodide symporter : impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology.
Physiol Rev, 2000. 80: p. 1083-105
21. Derwahl, M.
Von der diffusen Struma zur Knotenstruma.
Internist (Berl), 1998. 39: p.577-83
22. Dohan, I., I. De La Vieja, and I. Carrasco,
Molecular Study of the Sodium-Iodide Symporter (NIS): A new field in Thyroidology.
Trends Endocrinol Metab, 2000. 11: p. 99-105
23. Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N
Predominant Intracellular Overexpression of the Na^+ / I^- Symporter (NIS)

- in a Large Sampling of Thyroid Cancer Cases
Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 86, No.6 p. 2697-2700
24. Eskandari, S., et al.
Thyroid Na⁺/I⁻-symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity.
J Biol Chem, 1997. 272: p. 27230-8
25. Fröhlich E; Wahl R
Effects of retinol on follicular porcine thyrocytes in culture
J Mol Med 1999 Jan;77:189-92
26. Fröhlich E, Witke A, Czarnocka B, Wahl R
Retinol has specific effects on binding of thyrotrophin to cultured porcine thyrocytes
Journal of Endocrinology (2004) 183, 617-626
27. Fujiwara, H., et al.
Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na⁺/I⁻-symporter [letter].
Nat Genet, 1997. 16: p. 124-5
28. Gerster, MA, 1997
The potential role of Lycopene for human health
Journal of the American College of Nutrition, Vol.16, No.2, 109-126
29. Gianni M; Ponzanelli I; Mologni L; Reichert U; Rambaldi A; Terao M; Garattini E
Retinoid- dependent growth inhibition, differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells. Expression and activation of caspases
Cell Death Differ 2000 May;7:447-60
30. Goretzki PE, Simon D, Frilling A, Witte J, Reiners C, Grussendorf M, Horster FA, Röher HD (1994)
Surgical reintervention for differentiated thyroid carcinoma.
Br J Surg 80: 1131-1134.
31. Herold C; Ocker M; Ganslmayer M; Gerauer H; Hahn EG; Schuppan D
Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human

- colorectal carcinoma cells.
BR J Cancer 2002 Feb 1;86:443-8
32. Herzog A, Siler U, Spitzer V, Seifert N, Denelavas A, Hunziker PB, Hunziker W, Goralczyk R, Wertz K
Lycopene reduced gene expression of steroid targets and inflammatory markers in normal rat prostate
FASEB J. 2005 Feb;19(2):272-4
33. Hinds TS, West WL, Knight EM (1997)
Carotenoids and Retinoids: A review of research, clinical, and public health applications.
J Clin Pharmacol 37:551-558.
34. Holmes WF; Dawson MI; Soprano RD; Soprano KJ
Induction of apoptosis in ovarian carcinoma cells by AHPN / CD437 is mediated by retinoic acid receptors.
J Cell Physiol 2000 Oct; 185:61-7
35. Joba W, Spitzweg C, Schriever K, Heufelder AE, 1999
Analysis of human sodium/iodide symporter, thyroid transcription factor-1, and paired-box-protein-8 gene expression in benign thyroid diseases.
Thyroid 9:455-466
36. Kammat AM; Lamm DL
Antitumor activity of common antibiotics against superficial bladder cancer
Urology 2004 Mar;63:457-60
37. Kawaguchi, A., et al.,
Transforming growth factor-beta 1 suppresses thyrotropin-induced Na⁺/I⁻-symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells.
Thyroid, 1997. 7: p. 789-94
38. Kim HS, Bowen P, Chen L, Duncan C, Ghosh L, Sharifi R, Christov K
Effects of tomato sauce consumption on apoptotic cell death in prostate benign hyperplasia and carcinoma
Nutr. Cancer 2003; 47:40-7

39. Kogai, T. et al.
Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells.
Endocrinology, 1997. 138: p 2227-32
40. Konta T; Xu Q; Furusu A; Nakayama K; Kitamura M
Selective roles of retinoic acid receptor and retinoic x receptor in the suppression of apoptosis by all-trans-retinoic acid.
J. Biol. Chem 2001 Apr 20;276:12697-701
41. Kosugi, S., et al.
High prevalence of T354P sodium/ iodide symporter gene mutation in Japanese patients with iodide transport defect who have heterogeneous clinical pictures.
J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83: p. 4123-9
42. Kosugi, S., S. Bhayana, and H.J. Dean
A novel mutation in the sodium/iodide symporter gene in the largest family with iodide transport defect.
J Clin Endocrinol Metab, 1999. 84: p. 3248-53
43. Kurie JM; Lotan R; Lee JS; Morice RC; Liu DD; Xu XC; Khuri FR; Ro JY; Hittelman WN; Walsh GL; Roth JA; Minna JD; Hong WK
Treatment former smokers with 9-cis-retinoic acid reverses loss of retinoic-acid-receptor-beta in the bronchial epithelium: results from randomized placebo-controlled trial.
J Natl Cancer Inst 2003 Feb 5;95:206-14
44. Lazar, V., et al.
Expression of the Na⁺/I⁻-symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes.
J Clin Endocrinol Metab , 1999. 84: p. 3228-34
45. Levy J., Bosin E., Feldman B., Giat Y., Miinster A., danilenko M., Sharoni Y.
Lycopene is a more potent inhibitor of human cancer cell proliferation than either α-Carotene or β-Carotene
Nutr. Cancer 24: 257-266 (1995)

46. Lin XF; Zhao BX; Chen HZ et al.
RXR(alpha) acts as a carrier for TR3 nuclear export in a 9-cis-retinoic-acid-dependent manner in gastric cancer cells.
J Cell Sci 2004 11 1;117(Pt 23): 5609-5621
47. Mandell, R.B.; L.Z. Mandell and C.J. Link, Jr.
Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/ iodide symporter gene.
Cancer Res, 1999. 59: p. 661-8
48. Mangelsdorff DJ, Evans RE (1995):
The RXR heterodimers and orphan receptors.
Cell 86:841-850.
49. Matsuda, A. and S. Kosugi
A homozygous missense mutation of the sodium/ iodide symporter gene causing iodide transport defect [see comments].
J Clin Endocrinol Metab, 1997. 82: p. 3966-71
50. Mc Devitt TM, Tchao R, Harrison EH, Morel DW
Carotenoids normally present in serum inhibit proliferation and induce differentiation of a human monocyte/ macrophage cell line (U 937)
J. Nutr. 2005 Feb; 135(2): 160-4
51. Mc Iver B; Grebe SK; Eberhardt NL
The PAX8/ PPAR gamma fusion oncogene as a potential therapeutic target in follicular carcinoma
Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2004 Sep; 4:221-34
52. Pekary, A.E. and J.M. Hershman
Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce Na⁺/ I⁻-symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells. Endocrinology, 1998. 139: p. 703-12
53. Rillema, J.A., T.X. Yu, and S.M. Jhiang
Effect of prolactin on sodium iodide symporter expression in mouse mammary gland explants [In Process Citation].
Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. 279: p. E769-72

54. Riso P; Visioli F; Erba D; Testolin G; Porrini M.
Lycopene and vitamin C concentrations increase in plasma and lymphocytes after tomato intake. Effects on cellular antioxidant protection.
Eur J Clin Nutr. 2004 Mar 31 (PMID: 15054415)
55. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, 1997
Increased expression of the Na⁺/I⁻-symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue.
J Clin Endocrinol Metab 82:3331-3336
56. Saito, T. et al.
Increased expression of the Na⁺/I⁻-symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue.
J Clin Endocrinol Metab, 1997. 82: 3331-6
57. Schmutzler C; Brtko J; Winzer R; Jakobs TC; Meissner-Weigl J; Simon D; Goretzki PE; Köhrle J;
Functional retinoid and thyroid hormone receptors in human thyroid-carcinoma cell lines and tissues
Int J Cancer 1998 May 4;76:368-76
58. Schmutzler C; Cuong Hoang-Vu; Boltze C; Rüter B; Köhrle J
Experimental Study: Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses
European Journal of Endocrinology 2004 Apr; 150:547-56
59. Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazza ferri EL, Ihiang SM
Expression, exon- intron organization and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter.
Endocrinology 1997; 138: 3555-3558
60. Smanik, P.A., et al.
Cloning of the human sodium iodide symporter.
Biochem Biophys Res Commun, 1996. 226: p. 339-45
61. Spitzweg, C., et al.
Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic

- acids from salivary gland, mammary gland and gastric mucosa.
 J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83: p. 1746-51
62. Spitzweg, C., et al.
 Clinical review 132 : The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy.
 J Clin Endocrinol Metab, 2001. 86:p. 3327-35
63. Spitzweg, C., et al.
 Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide transporter.
 Cancer Res, 2000. 60: p. 6526-30
64. Szondy Z; Reichert U; Bernadon JM; Michel S; Toth R; Karaszi E; Fesus L
 Inhibition of activation-induced apoptosis of thymocytes by all-trans and 9-cis-retinoic acid is mediated via retinoic acid receptor alpha
 Biochem J 1998 May 1;331 (Pt 3):767-74
65. Takiyama Y; Miyokawa N; Sugawara A; Kato S; Ito K; Oikawa K; Kobayashi H; Kimura S; Tateno M
 Decreased expression of retinoid x receptor isoforms in human thyroid carcinomas
 J Clin Endocrinol Metab 2004 Nov;89: 5851-61
66. Um SJ; Han HS; Kwon YJ; Park SH; Rho YS; Sin HS; Park JS
 Novel retinoic acid derivate ABPN has potent inhibitory activity on cell growth and apoptosis in cancer cells.
 Int J Cancer 2003 Dec 20;107: 1038-46
67. Ukai, N., et al. (1996)
 The Water- Solubilization and Stabilization of Lycopene by Cyclodextrin and Addition of Protein
 Nippon Kagaku Kaishi 43, 55-68
68. Uyttersprot, N., et al.
 Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and expression of thyroperoxidase and Na⁺ / I⁻-symporter mRNAs in dog thyroid.
 Mol Cell Endocrinol, 1997. 131: p. 195-203

69. Wang CJ., Chou MY., Lin JK. (1989)
Inhibition of the transplantable C-6 glioma cells inoculated in rats by
retinoids and carotenoids
Cancer Lett. 48:135-142
70. Wolf G., (1996)
A history of vitamin A and retinoids.
FASEB J 10: 1 102-1107.
71. Xiang XU, Yan Wang, Andreas I. Constantinou, Maria Stacewicz-
Sapuntzakis, Phyllis E. Bowen, Richard B. van Bremen, 1999
Solubilization and Stabilization of Carotenoids Using Micelles: Delivery of
Lycopene to Cells in Culture
Lipids, Vol. 34, no 10
72. Xu, X., et al. (1999)
Solubilization and Stabilization of Carotinoids Using Micelles: Delivery of
Lycopene to Cells in Culture
Lipids, Vol. 34, no. 10

7. Anhang

7.1. Zahlenwerte der Abbildungen im Ergebnis-Teil

Tabelle 0.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/ Stimulanzen	3	6	17	24	30	41	48
ohne Stimulation							
Mittelwert	511,32	913,20	641,90	771,20	944,67	814,52	1090,22
stabw	69,87	288,91	155,94	161,24	264,13	77,76	62,62
SEM	28,52	117,95	63,66	65,83	107,83	31,75	25,56
Retinol frei + 2,6 nmol							
Mittelwert	669,07	989,33	2067,75	1012,60	882,20	713,72	1228,50
stabw	175,60	317,84	1314,66	149,74	43,75	207,92	242,83
SEM	71,69	129,76	536,71	61,13	17,86	84,88	99,14
Retinol 0,098 + 2,6 nmol							
Mittelwert	668,52	1058,0	1341,80	1153,07	1120,7	899,02	1412,18
stabw	150,97	269,58	328,73	255,47	231,60	143,48	354,69
SEM	61,64	110,05	134,20	104,30	94,55	58,57	144,80
Retinol 0,196 + 2,6 nmol							
Mittelwert	758,27	965,08	1382,33	1214,90	1414,4	1080,8	1700,95
stabw	206,74	227,55	354,22	164,87	317,98	247,53	253,05
SEM	84,40	92,90	144,61	67,31	129,81	101,05	103,31
13-cis-Retinsäure frei+2,6 nmol							
Mittelwert	495,33	572,42	700,85	475,22	730,50	712,97	847,87
stabw	30,93	87,41	87,81	161,24	114,57	109,06	66,78
SEM	12,63	35,68	35,85	65,82	46,77	44,53	27,26
13-cis-Retinsäure 0,098+2,6 nmol							
Mittelwert	418,27	569,75	672,00	612,97	938,95	900,07	1123,72
stabw	36,08	102,65	54,24	106,18	63,21	101,38	140,60
SEM	14,73	41,91	22,14	43,35	25,81	41,39	57,40
13-cis-Retinsäure 0,196+2,6 nmol							
Mittelwert	596,52	702,32	686,55	720,80	841,78	958,38	1066,27
stabw	319,03	297,90	85,16	67,01	157,56	85,72	55,63
SEM	130,24	121,62	34,76	27,36	64,32	35,00	22,71

Tabelle 0.2 Iodaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanzen	3	6	17	24	30	41	48
ohne Stimulation							
Mittelwert	174,7	268,8	176,2	138,3	203,6	146,9	161,5
stabw	22,27	73,68	26,38	5,37	145,8	51,48	17,47
SEM	9,09	30,08	10,77	2,19	59,55	21,02	7,13
Retinol frei + 2,6 nmol							
Mittelwert	222,3	338,8	490,3	258,7	227,7	226,0	251,4
Stabw	54,50	77,48	165,5	48,06	42,98	64,58	46,11
SEM	22,25	31,63	67,57	19,62	17,55	26,36	18,82
Retinol 0,098 + 2,6 nmol							
Mittelwert	201,5	306,5	394,4	278,9	306,0	236,7	277,7
stabw	75,73	19,94	14,42	34,51	51,83	199,6	3,82
SEM	30,92	8,14	5,89	14,09	21,16	81,49	1,56
Retinol 0,196 + 2,6 nmol							
Mittelwert	153,1	258,4	421,7	306,0	414,8	252,4	362,3
stabw	29,42	54,52	81,39	88,81	21,35	75,09	56,21
SEM	12,01	22,26	33,23	36,26	8,72	30,66	22,95
13-cis-Retinsäure frei+2,6 nmol							
Mittelwert	144,4	280,6	207,8	129,9	180,4	155,4	166,7
stabw	1,06	95,32	112,3	51,12	1,56	28,21	20,15
SEM	0,43	38,91	45,87	20,87	0,64	11,52	8,23
13-cis-Retinsäure 0,098+2,6 nmol							
Mittelwert	140,3	233,9	184,4	158,5	210,2	179,6	179,3
stabw	84,64	8,91	14,00	13,29	17,82	8,70	30,26
SEM	34,55	3,64	5,72	5,43	7,27	3,55	12,36
13-cis-Retinsäure 0,196+2,6 nmol							
Mittelwert	228,0	261,9	200,1	190,4	280,2	205,2	223,1
stabw	41,08	155,7	4,38	23,12	192,9	13,72	26,66
SEM	16,77	63,57	1,79	9,44	78,75	5,60	10,88

Tabelle 1.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/ Stimulanz	4	17	24	48
ohne Stimulation				
Mittelwert	634,38	664,75	982,30	1962,78
StabW	84,32	124,15	220,79	890,02
SEM	34,43	50,68	90,14	363,35
Retinol frei+2,6 nmol				
Mittelwert	1063,7	690,7	1265,50	1727,92
StabW	255,22	158,18	250,86	627,33
SEM	104,19	64,58	102,41	256,11
Retinol 0,098+2,6 nmol				
Mittelwert	1070,15	596,28	1086,73	2013,03
StabW	397,87	77,02	198,66	199,14
SEM	162,43	31,44	81,10	81,30
Retinol 0,196+2,6 nmol				
Mittelwert	3105,00	642,82	1387,87	2199,22
StabW	3611,17	100,15	424,23	681,10
SEM	1474,25	40,88	173,19	278,06
13-cis-Retinsäure frei+2,6 nmol				
Mittelwert	345,58	614,00	1540,95	896,53
StabW	35,38	137,57	544,49	179,72
SEM	14,44	56,16	222,29	73,37
13-cis-Retinsäure 0,098+2,6 nmol				
Mittelwert	334,62	693,82	1799,62	891,15
StabW	48,91	72,49	434,07	96,79
SEM	19,97	29,60	177,21	39,51
13-cis-Retinsäure 0,196+2,6 nmol				
Mittelwert	323,78	646,27	1824,22	875,72
StabW	64,20	128,96	456,95	106,92
SEM	26,21	52,65	186,55	43,65

Tabelle 1.2 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden (p<0,05) zur Kontrolle. (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/ Stimulanz	4	17	24	48
ohne Stimulation				
Mittelwert	147,10	167,82	198,67	274,02
StabW	48,37	34,04	13,37	139,10
SEM	19,75	13,90	5,46	56,79
Retinol frei+2,6 nmol				
Mittelwert	194,32	180,20	224,32	215,57
StabW	19,72	23,45	30,39	42,51
SEM	8,05	9,57	12,40	17,36
Retinol 0,098+2,6 nmol				
Mittelwert	200,37	166,78	203,52	209,75
StabW	41,05	50,21	21,52	33,97
SEM	16,76	20,50	8,78	13,87
Retinol 0,196+2,6 nmol				
Mittelwert	254,38	147,43	228,63	273,67
StabW	159,73	29,51	46,63	90,43
SEM	65,21	12,05	19,04	36,92
13-cis-Retinsäure frei+2,6 nmol				
Mittelwert	102,38	155,97	284,80	157,35
StabW	13,55	33,06	124,92	35,44
SEM	5,53	13,50	51,00	14,47
13-cis-Retinsäure 0,098+2,6 nmol				
Mittelwert	87,25	160,77	262,78	169,92
StabW	13,85	20,99	45,95	47,17
SEM	5,65	8,57	18,76	19,26
13-cis-Retinsäure 0,196+2,6 nmol				
Mittelwert	114,77	222,80	346,48	180,38
StabW	23,17	112,63	132,94	76,20
SEM	9,46	45,98	54,27	31,11

Tabelle 2.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	6	17	24	30	41	48	54	65
ohne Stimulanz										
Mittelwert	446	340	657	717	626	888	773	695	568	1033
StabW	229	161	368	369	295	421	604	319	241	474
SEM	182	138	268	292	255	362	315	283	232	421
Retinol frei+2,6 nmol										
Mittelwert	628	5875	1099	877	1153	1108	862	837	792	1536
StabW	123	244	241	95	331	282	148	148	1007	259
SEM	50	99	98	38	135	115	60	60	41	105
Retinol 0,098+2,6 nmol										
Mittelwert	653	446	858	987	1076	795	895	928	784	1589
StabW	143	61	124	214	81	175	127	120	93	349
SEM	58	25	50	87	33	71	51	49	37	142
Retinol 0,196+2,6 nmol										
Mittelwert	678	513	1146	873	1344	1056	1196	933	830	2229
StabW	162	51	491	220	492	166	252	138	147	715
SEM	66	20	200	90	200	67	103	56	60	292
13-cis-Retinsäure frei+2,6 nmol										
Mittelwert	618	1241	1003	1387	1203	1076	789	754	776	1040
StabW	105	388	414	499	442	237	226	151	148	186
SEM	43	158	169	203	180	96	92	61	60	76
13-cis-Retinsäure 0,098+2,6 nmol										
Mittelwert	468	755	832	829	870	915	655	648	4986	886
StabW	145	165	147	427	222	153	63	115	10170	263
SEM	59	67	60	174	90	62	25	47	4152	107
13-cis-Retinsäure 0,196+2,6 nmol										
Mittelwert	370	502	769	936	888	838	781	620	9936	751
StabW	103	107	192	413	129	186	165	87	14678	87,29
SEM	429	43	78	168	52	75	67	35	5992	35,64

Tabelle 2.2 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fettgedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	6	17	24	30	41	48	54	65
ohne Stimulanz										
Mittelwert	154,1	97,68	200,8	414,9	191,3	285,6	301,2	204,1	132,6	216,8
StabW	31,96	50,42	127,8	118,8	34,08	135,8	125,4	41,65	6,36	12,59
SEM	13,05	20,58	52,19	48,50	13,91	55,45	51,21	17,00	2,60	5,14
Retinol frei+2,6 nmol										
Mittelwert	139,9	206,8	310,1	390,4	257,7	279,8	496,9	240,4	132,6	267,4
StabW	11,84	106,4	111,9	91,12	77,91	102,0	190,2	26,30	26,94	65,00
SEM	4,83	43,43	45,68	37,20	31,81	41,66	77,65	10,74	11,00	26,54
Retinol 0,098+2,6 nmol										
Mittelwert	163,1	132,5	190,5	335,2	229,2	227,4	288,2	188,8	145,6	254,1
StabW	29,99	31,48	49,27	136,6	66,25	81,56	79,42	20,96	30,75	38,29
SEM	12,24	12,85	20,12	55,75	27,05	33,30	32,42	8,56	12,55	15,63
Retinol 0,196+2,6 nmol										
Mittelwert	68,43	58,95	86,63	175,9	107,5	114,1	133,3	72,78	62,95	102,7
StabW	82,43	64,40	91,13	143,8	107,2	101,0	136,1	100,7	72,12	131,6
SEM	33,65	26,29	37,20	58,71	43,77	41,25	55,57	41,10	29,44	53,73
13-cis-Retinsäure frei+2,6 nmol										
Mittelwert	198,8	377,1	324,0	575,7	275,5	304,2	323,3	318,7	167,9	200,5
StabW	31,59	145,1	179,9	190,2	75,10	95,21	73,35	120,9	37,83	44,06
SEM	12,90	59,22	73,46	77,66	30,66	38,87	29,95	49,38	15,45	17,99
13-cis-Retinsäure 0,098+2,6 nmol										
Mittelwert	135,2	308,9	264,9	477,1	168,2	197,7	210,7	267,7	145,1	176,3
StabW	28,67	104,8	62,58	221,7	43,17	42,49	45,43	103,0	53,46	58,16
SEM	11,70	42,79	25,55	90,50	17,62	17,35	18,55	42,07	21,83	23,75
13-cis-Retinsäure 0,196+2,6 nmol										
Mittelwert	176,4	205,9	230,1	441,7	216,2	273,8	209,3	249,7	119,2	157,1
StabW	70,53	94,62	68,29	105,1	88,95	152,2	36,03	65,14	66,70	21,74
SEM	28,79	38,63	27,88	42,91	36,32	62,13	14,71	26,59	27,23	8,87

Tabelle 3.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulation								
Mittelwert	1472,9	2182,1	6449,1	4792,6	3559,3	3510,5	3198,9	2748,4
stabw	289,57	344,59	788,10	631,62	953,72	1212,4	349,56	468,86
SEM	118,22	140,68	321,74	257,86	389,35	494,97	142,71	191,41
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	1765,5	2083,7	7360,6	5870,2	3832,1	4826,5	2909,4	2404,3
stabw	369,53	303,30	924,07	617,68	869,66	676,22	504,49	574,99
SEM	150,86	123,82	377,25	252,17	355,04	276,07	205,96	234,74
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	1244,4	1937,9	6793,0	5289,0	3724,7	3241,4	3752,9	1706,8
stabw	305,45	359,53	1625,5	957,92	594,22	393,54	1515,2	225,81
SEM	124,70	146,78	663,62	391,07	242,59	160,66	618,56	92,19

Tabelle 3.2 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle. (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulation								
Mittelwert	494,55	744,93	1938,1	1321,1	897,45	1120,9	695,97	555,43
stabw	31,54	178,31	337,03	195,02	181,97	393,28	134,67	152,61
SEM	12,88	72,80	137,59	79,61	74,29	160,56	54,98	62,30
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	272,52	578,75	818,03	673,23	339,38	576,53	343,93	354,10
stabw	111,92	366,08	108,23	131,79	59,90	163,67	113,30	148,46
SEM	45,69	149,45	44,19	53,80	24,45	66,82	46,25	60,61
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	549,78	688,32	1883,9	1431,5	933,95	905,30	709,57	625,30
stabw	86,16	124,86	320,15	250,56	117,17	123,66	156,45	112,83
SEM	35,17	50,97	130,70	102,29	47,84	50,48	63,87	46,06

Tabelle 4.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Stimulation/Zeit	2	4	16	24	30	40	48	54
Ohne Stimulation								
Mittelwert	1245,7	1650,1	3099,9	2668,8	2071,2	1418,7	2114,7	1959,2
StabW	520,90	320,91	901,16	635,99	333,11	194,80	254,72	511,62
SEM	212,66	131,01	367,90	259,64	135,99	79,53	103,99	208,87
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	1081,9	1522,6	3505,3	3401,5	2064,1	1777,6	2298,1	2077,1
StabW	206,06	261,24	1155,7	262,01	304,94	198,16	438,29	174,63
SEM	84,12	106,65	471,83	106,96	124,49	80,90	178,93	71,29
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	1389,5	1678,1	4148,9	3799,6	2119,3	1720,9	2190,5	2048,6
StabW	361,75	228,72	677,57	509,43	263,77	262,47	352,91	325,67
SEM	147,69	93,37	276,61	207,97	107,68	107,15	144,08	132,96

Tabelle 4.2 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=6. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Stimulation/ Zeit	2	4	16	24	30	40	48	54
Ohne Stimulation								
Mittelwert	238,42	376,20	1252,25	861,25	509,08	547,27	536,63	434,40
StabW	124,71	203,69	373,41	548,70	94,54	239,98	108,26	104,14
SEM	50,91	83,16	152,44	224,01	38,60	97,97	44,20	42,52
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	127,90	181,28	754,55	311,10	205,38	322,60	477,83	312,53
StabW	22,73	31,40	488,87	35,04	41,04	60,11	262,61	209,44
SEM	9,28	12,82	199,58	14,31	16,75	24,54	107,21	85,50
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	301,22	468,02	1554,95	894,82	576,20	533,13	529,97	312,53
StabW	111,06	253,73	225,11	105,63	83,29	65,98	78,52	209,44
SEM	45,34	103,58	91,90	43,12	34,00	26,94	32,06	85,50

Tabelle 5.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=4. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulation								
Mittelwert	2685,25	433,95	476,28	912,48	759,13	1239,98	2270,65	2782,93
StabW	602,47	92,54	526,70	259,73	230,52	228,88	207,55	1017,29
SEM	301,23	46,27	263,35	129,86	115,26	114,44	103,78	508,65
Lykopen BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	3760,46	817,58	1882,76	767,72	624,10	1336,30	2257,06	1560,30
StabW	3037,55	423,27	3410,47	469,14	170,97	787,76	472,12	836,33
SEM	1358,43	189,29	1525,21	209,81	76,46	352,30	211,14	374,02
Lykopen BASF Placebo								
Mittelwert	3332,28	904,14	830,80	1062,5	1222,9	1469,66	2239,96	2949,76
StabW	595,88	207,92	765,50	527,42	720,60	366,79	747,09	560,82
SEM	266,49	92,99	342,34	235,87	322,26	164,03	334,11	250,81

Tabelle 5.2 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=4. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulanz								
Mittelwert	2066,7	2227,1	3577,8	2197,7	3341,8	1336,0	2097,7	1363,1
StabW	523,94	587,50	2723,2	659,59	1739,9	238,32	900,84	592,59
SEM	261,97	293,75	1361,6	329,79	869,96	119,16	450,42	296,30
Lykopen BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	2465,5	2452,4	3483,4	2348,5	3936,3	1833,2	1916,2	1129,4
StabW	1228,0	611,49	2800,0	1174,1	2304,0	1236,8	1240,2	384,93
SEM	549,19	273,47	1252,2	525,10	1030,4	553,14	554,65	172,15
Lykopen BASF Placebo								
Mittelwert	2246,2	2421,5	4270,3	3306,5	5154,1	2160,4	2207,0	1896,7
StabW	418,85	570,12	2315,8	1271,6	2964,9	831,71	778,79	842,77
SEM	187,31	254,97	1035,7	568,68	1325,9	371,95	348,29	376,90

Tabelle 5.3 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=4. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Messung im Gamma-Zähler.

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulanz								
Mittelwert	1918,5	2462,25	3599,7	3101,75	3331,73	1791,0	1981,98	1364,2
StabW	468,72	581,99	2496,8	1533,71	1087,37	765,60	705,93	505,63
SEM	234,36	291,00	1248,4	766,86	543,69	382,80	352,97	252,82
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	2437,3	2542,64	3970,6	2898,90	4155,10	1960,4	2114,48	1369,5
StabW	1073,0	485,81	2232,6	1725,35	2471,06	1060,5	854,36	686,27
SEM	479,88	217,26	998,46	771,60	1105,09	474,29	382,08	306,91
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	2206,5	2632,52	4449,3	3197,32	5149,90	2343,5	2751,40	1848,4
StabW	405,57	741,80	2480,0	1748,45	3001,50	1416,6	1165,78	881,04
SEM	181,38	331,74	1109,1	781,93	1342,31	633,54	521,35	394,01

Tabelle 6.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=4. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulation								
Mittelwert	3205	556,65	495,28	793,38	837,28	1543,6	2213,0	1945,7
Stabw	533,8	196,38	362,08	546,73	135,12	109,61	527,74	700,50
SEM	266,9	98,19	181,04	273,36	67,56	54,81	263,87	350,25
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	3076,4	1615,9	2732,9	2374,7	2848,8	2202,9	2427,6	2044,3
Stabw	2180,1	816,37	1119,3	1016,1	1113,5	510,58	284,94	358,09
SEM	974,98	365,09	500,56	454,40	497,97	228,34	127,43	160,14
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	2550,4	764,53	797,38	985,90	1535,1	1434,6	1911,9	1794
Stabw	4656,5	333,94	570,34	365,18	649,05	584,85	547,49	879,04
SEM	2082,4	149,34	255,06	163,31	290,26	261,55	244,84	393,12

Tabelle 6.2 Iodaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=4. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/ Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulation								
Mittelwert	2607,4	3047	6178,5	3062,3	3948,1	2494,7	2597,5	2263,6
StabW	406,09	183,98	1251,7	1769,7	125,04	282,41	1216,3	412,17
SEM	181,61	82,28	559,76	791,44	55,92	126,3	543,93	184,33
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	2456,1	2435,3	5113,4	3673	6672,3	2216,2	3592,7	3592,7
StabW	1311,8	847,47	1002,6	947,31	1218,1	303,56	531,96	169,78
SEM	586,63	379	448,38	423,65	544,73	135,76	237,9	75,93
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	2824	3178,8	4635	3462,5	5213,2	1867,3	2458,1	1690,5
StabW	1216,6	1684,5	3087,9	243,32	3075,2	845,35	477,16	752,36
SEM	544,07	753,35	1381	108,81	1375,3	378,05	213,39	336,47

Tabelle 6.3 Jodeinbau in Schweinethyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=4. Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Messung im Gamma- Zähler.

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Stimulation								
Mittelwert	2552,8	3298,5	6100,0	3862,5	4157,9	2796,1	3302,1	2323,3
Stabw	326,02	383,92	1622,2	838,73	283,33	260,94	657,92	542,82
SEM	145,80	171,69	725,47	375,09	126,71	116,70	294,23	242,75
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	2685,7	2722,2	7149,7	4679,4	7708,3	3097,9	4134,3	2518,2
Stabw	2423,2	2728,4	6987,7	4626,1	8192,1	3066,6	4444,9	2507,3
SEM	1083,7	1220,2	3124,9	2068,9	3663,6	1371,4	1987,8	1121,3
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	2591,2	2944,5	5355,0	3780,2	5353,9	2169,6	2826,4	1824,1
Stabw	2712,2	3013,8	5611,3	3598,6	5854,6	2094,6	3084,4	1715,5
SEM	1212,9	1347,8	2509,5	1609,3	2618,2	936,74	1379,4	767,21

Tabelle 7.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n= 4 (ohne weitere Stimulation) oder n=5 (mit zusätzlicher Stimulation der Zellen). Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Vit. A								
ohne Stimulanz								
Mittelwert	561,6	393,9	923,75	2353,1	6418,6	31853	32183	51717
StabW	335,2	29,21	586,80	267,32	453,74	2734,8	18647	7772,6
SEM	167,60	14,61	293,40	133,66	226,87	1367,4	9323,8	3886,3
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	831,62	472,52	1391,6	2350,2	8216,5	33035	37474	43338
StabW	288,77	76,43	476,23	1180,4	266,9	2594,3	2506,9	1615,8
SEM	129,14	34,18	212,98	527,90	1191,8	1160,2	1121,1	722,60
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	827,04	702,02	1753,7	2079,9	11570	34163	43327	23479
StabW	151,19	174,94	524,78	907,48	2850,2	1454,8	2559,4	32279
SEM	67,61	78,24	234,69	405,84	1274,7	650,61	1144,6	14436
mit Vit.A								
ohne Stimulanz								
Mittelwert	842,35	842,35	4479,4	22597	9172,9	7423,7	12061	18980
StabW	339,89	339,89	3636,7	22408	4118,2	1245,2	4907,8	18080
SEM	169,94	169,94	1818,3	11204	2059,1	622,62	2453,9	9040,1
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	1207,4	1207,4	4340,6	25406	6303,2	7432,9	19753	39496
StabW	47,70	47,70	408,94	15474	2732,8	1752,5	7237,7	3091,9
SEM	21,33	21,33	182,88	6920,3	1222,1	783,74	3236,8	1382,7
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	972,02	972,02	22867	35055	5918,2	12130	17957	9548,4
StabW	376,64	376,64	24184	18610	1444,4	6120,0	19676	14890
SEM	168,44	168,44	10815	8322,5	645,97	2736,9	8799,2	6659,2

Tabelle 7.2 Iodaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in dpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n=4 (ohne weitere Stimulation) oder n=5 (mit zusätzlicher Stimulation der Zellen). Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation).

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Vit.A								
ohne Stimulanz								
Mittelwert	719,05	3072,7	3913,7	8785,4	2984,2	1635,9	746,25	1685,2
StabW	246,17	627,64	568,56	1382,6	876,43	182,37	85,49	600,08
SEM	123,09	313,82	284,28	691,29	438,21	91,18	42,75	300,04
Lykopen BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	1141,2	1636,4	4110,4	8337,2	3102,3	1381,9	528,46	2256,8
StabW	269,88	214,73	453,46	4095,1	425,77	465,61	168,49	407,04
SEM	120,69	96,03	202,79	1831,4	190,41	208,23	75,35	182,03
Lykopen BASF Placebo								
Mittelwert	1006,9	1539,4	4375,0	7596,2	3939,9	1021,5	582,08	1391,6
StabW	167,74	199,82	611,51	4960,6	535,91	229,96	86,77	1289,9
SEM	75,02	89,36	273,48	2218,4	239,66	102,84	38,80	576,90
mit Vit.A								
ohne Stimulanz								
Mittelwert	1319,2	2792,8	3982,0	1503,7	6417,8	5035,9	5131,0	1079,0
StabW	98,62	545,59	1824,9	138,51	614,17	1294,9	768,00	482,09
SEM	44,10	244,00	816,14	61,94	274,66	579,08	343,46	215,60
Lykopen BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	1690,9	2573,5	761,50	1528,6	5935,6	4035,9	3713,9	1072,9
StabW	163,72	1361,3	190,29	146,11	1135,8	977,18	590,22	466,59
SEM	73,22	608,80	85,10	65,34	507,96	437,01	263,95	208,67
Lykopen BASF Placebo								
Mittelwert	1954,4	3585,7	1036,3	1535,1	3406,6	4557,9	1898,7	538,06
StabW	415,63	2353,3	793,76	106,41	828,52	712,90	1946,2	98,02
SEM	185,88	1052,4	354,98	47,59	370,53	318,82	870,35	43,84

Tabelle 7.3 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung und SEM bei n= 4 (ohne weitere Stimulation) oder n=5 (mit zusätzlicher Stimulation der Zellen). Die fett gedruckten Ergebnisse sind signifikant verschieden ($p < 0,05$) zur Kontrolle (Thyreozyten ohne Stimulation). Messung im Gammazähler.

Zeit/Stimulanz	2	4	16	24	30	40	48	54
ohne Vit.A								
ohne Stimulanz								
Mittelwert	686,98	1812,8	3616,3	9209,1	3042,2	2280,9	1846,7	2549,9
StabW	239,62	265,49	331,15	1093,6	768,76	239,90	142,60	852,02
SEM	119,81	132,75	165,57	546,81	384,38	119,95	71,30	426,01
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	1153,3	1549,2	4549,4	9527,9	3574,7	2121,1	1548,1	3537,5
StabW	278,44	170,40	493,29	5450,0	398,59	628,13	381,40	570,02
SEM	124,52	76,20	220,61	2437,3	178,26	280,91	170,57	254,92
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	1043,3	1598,6	4473,7	7857,2	3194,9	1687,2	1418,8	3384,8
StabW	188,96	192,89	731,44	5456,0	858,65	182,91	208,43	475,69
SEM	84,51	86,26	327,11	2440,0	384,00	81,80	93,21	212,73
mit Vit.A								
ohne Stimulanz								
Mittelwert	1265,9	2781,5	5630,1	4801,8	6686,8	1842,8	1126,7	1522,9
StabW	70,58	752,11	1161,9	1309,3	646,37	904,67	150,39	113,77
SEM	35,29	376,06	580,95	654,63	323,19	452,34	75,20	56,89
Lykopin BASF 2,6 nmol								
Mittelwert	1630,6	3345,2	8461,5	6927,9	7019,9	1840,0	998,14	1592,4
StabW	125,59	627,46	1154,7	1784,4	1895,1	1026,2	54,78	114,29
SEM	56,17	280,61	516,41	798,00	847,52	458,91	24,50	51,11
Lykopin BASF Placebo								
Mittelwert	1515,9	2279,1	6800,5	5350,0	6268,8	2230,7	1005,0	1537,2
StabW	781,13	1707,9	1857,5	755,44	788,12	947,60	66,58	98,30
SEM	349,33	763,80	830,70	337,84	352,46	423,78	29,78	43,96

Tabelle 8.1 Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit einer Ciprobay®- Zugabe. Angegeben sind Mittelwert, die prozentuale Normierung und die Stichprobenanzahl n. (Abb. 23b).

Zeit/Stimulation	2	4	24
Vit.A- frei +Ciprobay			
ohne Stimulanz			
Mittelwert	400	518	559
%	52	82	98
n	5	5	6
Vit.A- frei ohne Ciproay			
ohne Stimulanz			
Mittelwert	771	632	573
%	100	100	100
n	6	6	4
Vit. A-haltig +Ciprobay			
ohne Stimulanz			
Mittelwert	1487	2787	1132
%	192	440	197
n	5	4	4
Vit. A-haltig ohne Ciprobay			
ohne Stimulanz			
Mittelwert	1098	1539	1703
%	142	243	297
n	4	6	6

**Thymidinaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten
Abhängigkeit einer Ciprobay®- Zugabe**

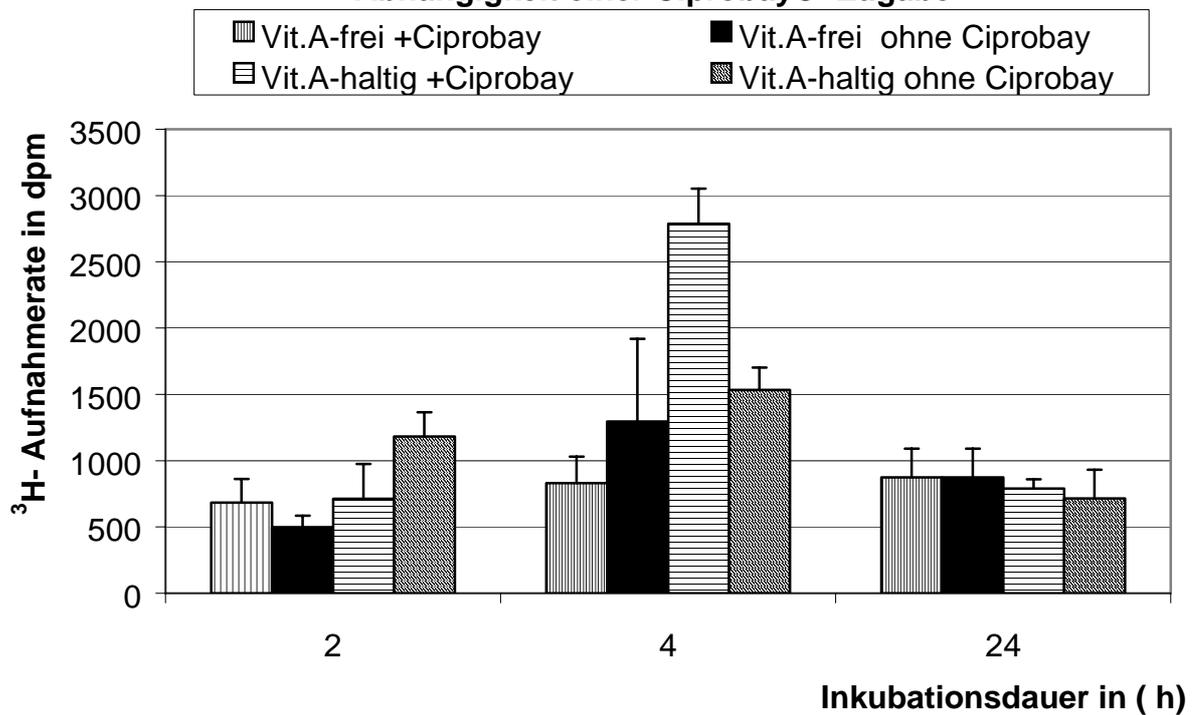


Abb. 23 b

Abb. 23b zeigt den Thymidinaufnahme in Schweinethyreozyten. Dargestellt sind hier die Mittelwerte und SEM bei variabler Stichprobenanzahl n. (Tab. 8.1 s.S. 107).

Tabelle 8.2 Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten in Abhängigkeit einer Ciproba®-Zugabe. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung, SEM die prozentuale Normierung und die Stichprobenanzahl n. (Abb.24 b)

Zeit/ Stimulanz	2	4	18	24
Vit.A- frei mit Ciprobay				
ohne Stimulanz				
Mittelwert	2151	2782	3224	4557
StabW	345,56	473,92	468,06	849,69
SEM	99,75	149,86	209,32	379,99
%	80	91	104	101
n	12	10	5	5
Vit.A-frei ohne Ciprobay				
ohne Stimulanz				
Mittelwert	2679	3044	3079	4489
StabW	585,76	535,85	303,02	995,20
SEM	169,09	148,61	151,51	445,07
%	100	100	100	100
n	12	13	4	5
Vit.A-haltig mit Ciprobay				
ohne Stimulanz				
Mittelwert	1780	1612	2435	2497
StabW	492,55	173,84	197,48	486,65
SEM	201,08	65,70	74,64	243,32
%	66	52	79	55
n	6	7	7	4
Vit.A-haltig ohne Ciprobay				
ohne Stimulanz				
Mittelwert	2733	2765	3045	4346
StabW	445,15	286,10	533,99	1030,58
SEM	134,21	108,13	238,81	420,73
%	102	90	98	68
n	11	7	5	6

**¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte Schweinethyreozyten
Einfluss einer Ciprobay®- Zugabe**

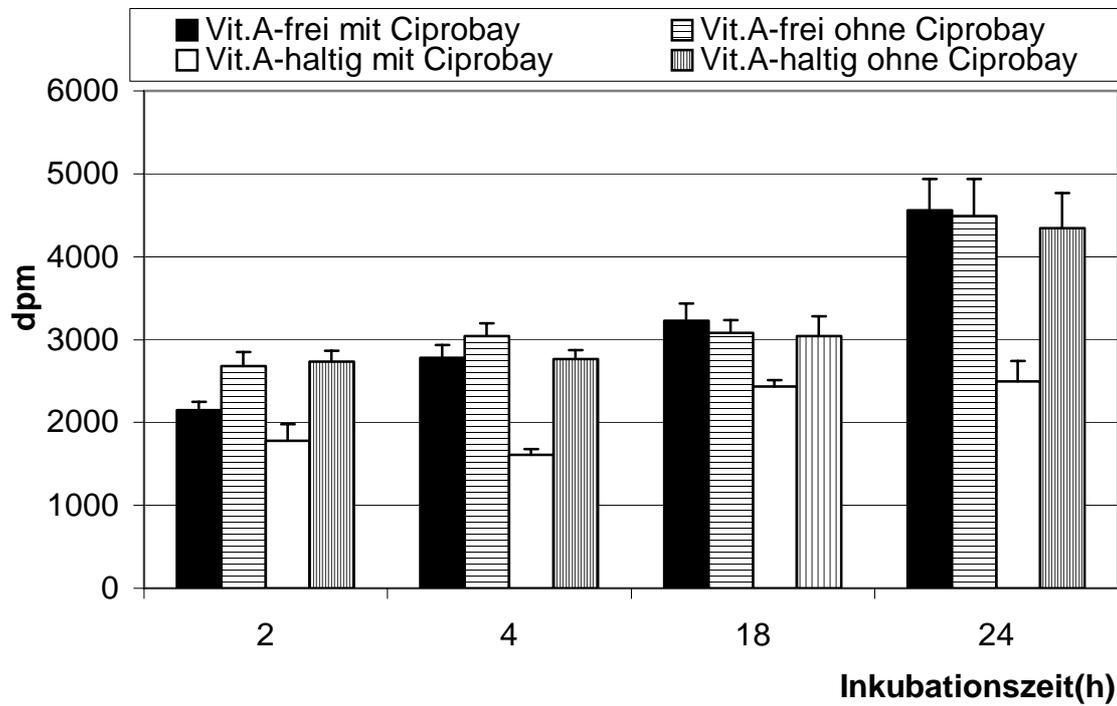
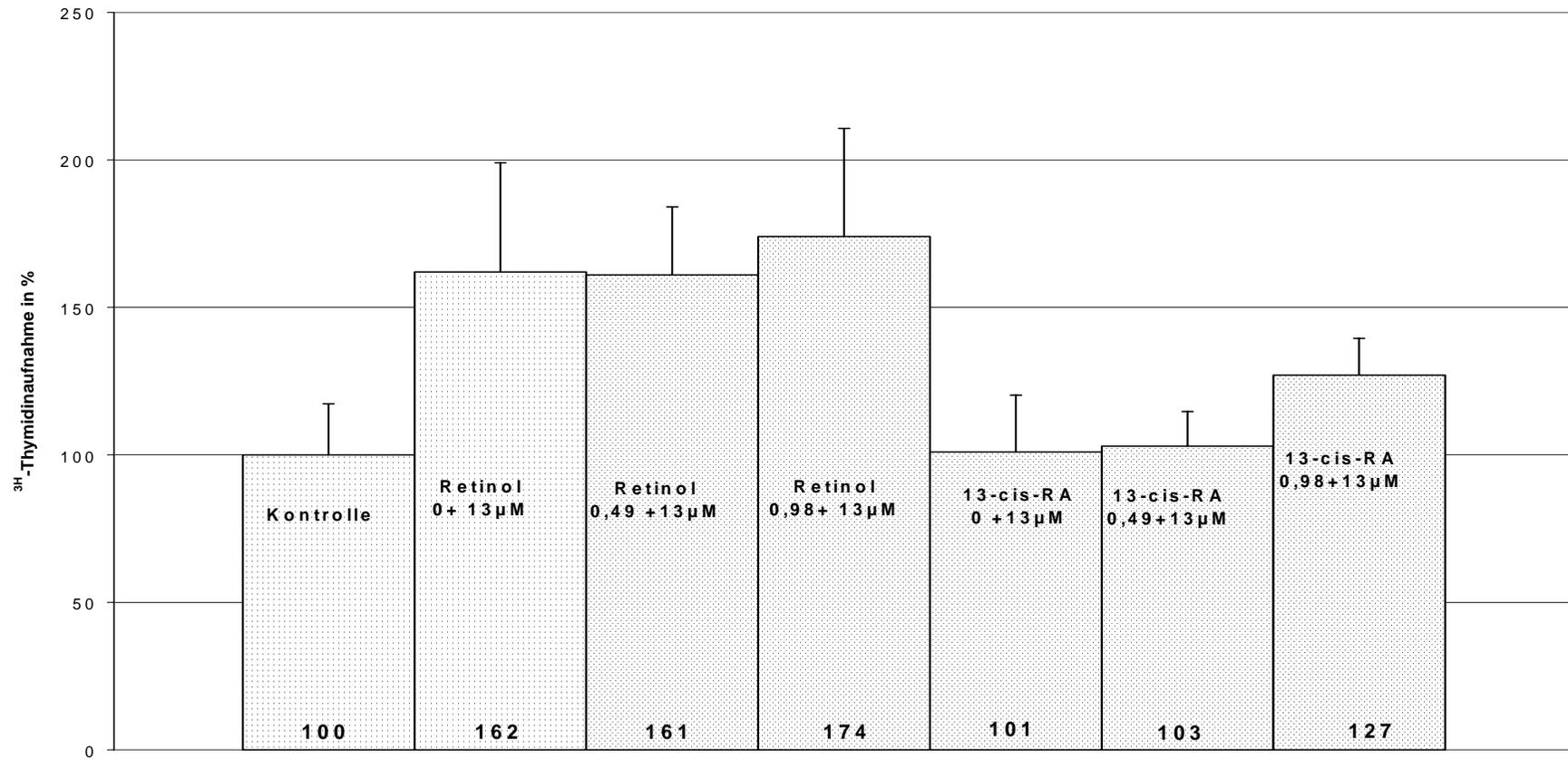


Abb. 24 b

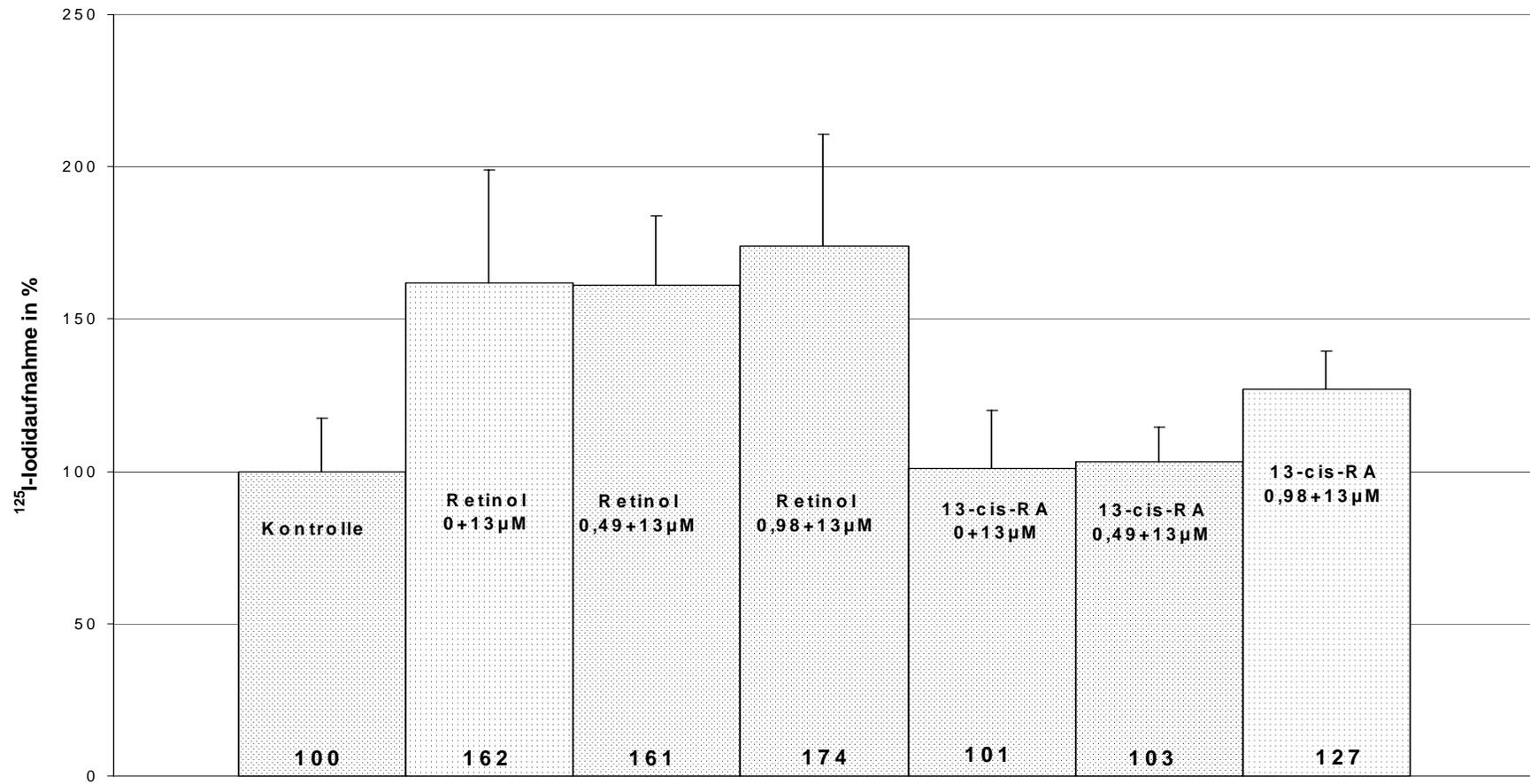
Abb.24 b zeigt die Iodidaufnahme in Schweinethyreozyten. Dargestellt sind hier die Mittelwerte und SEM bei variabler Stichprobenanzahl n. (Tab. 8.2 s.S. 109)

7.2 Normierte Abbildungen zur Einschätzung der Wirkungsprofile der Substanzen



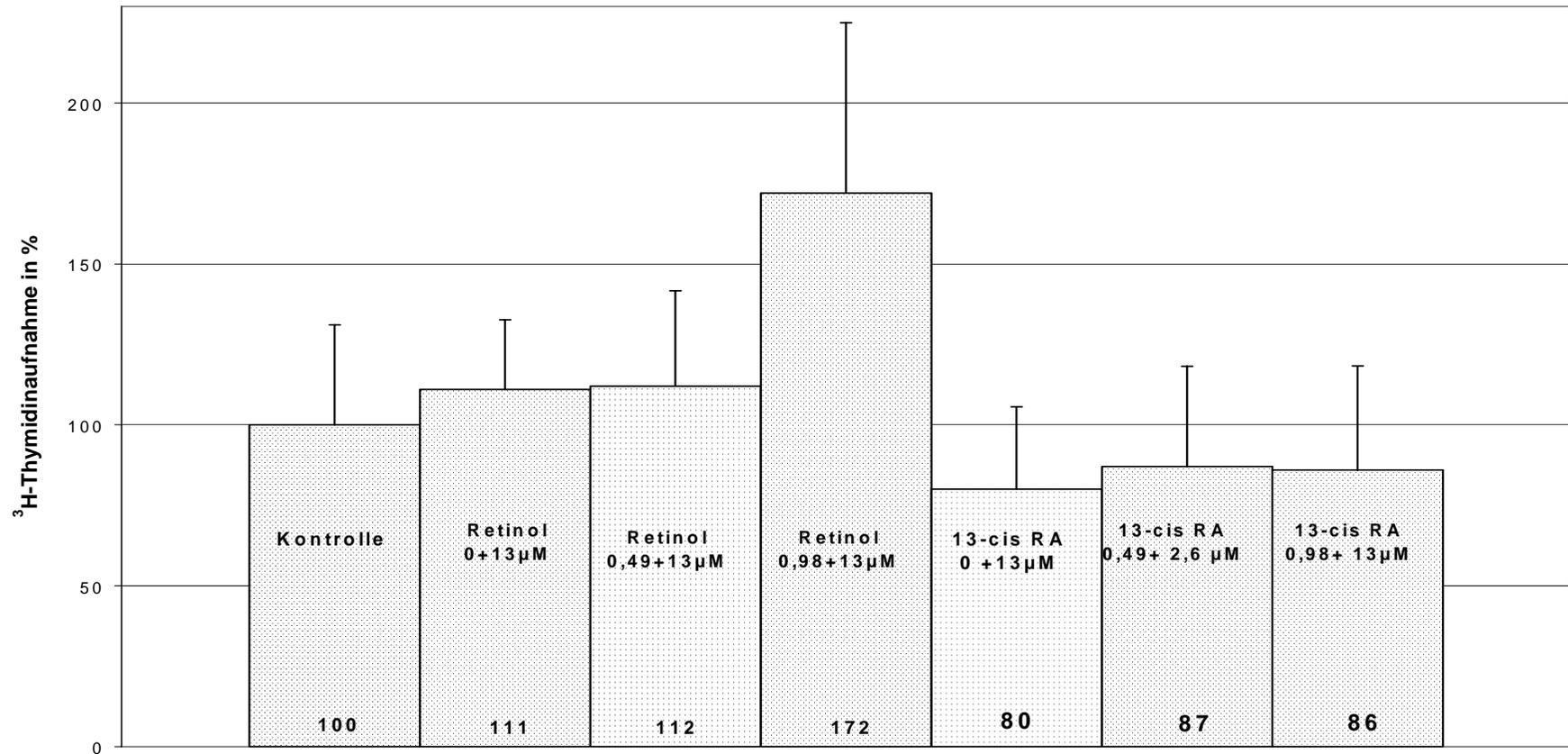
Mittelwert und SEM der Abb. 2a und 2b, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb.2c.



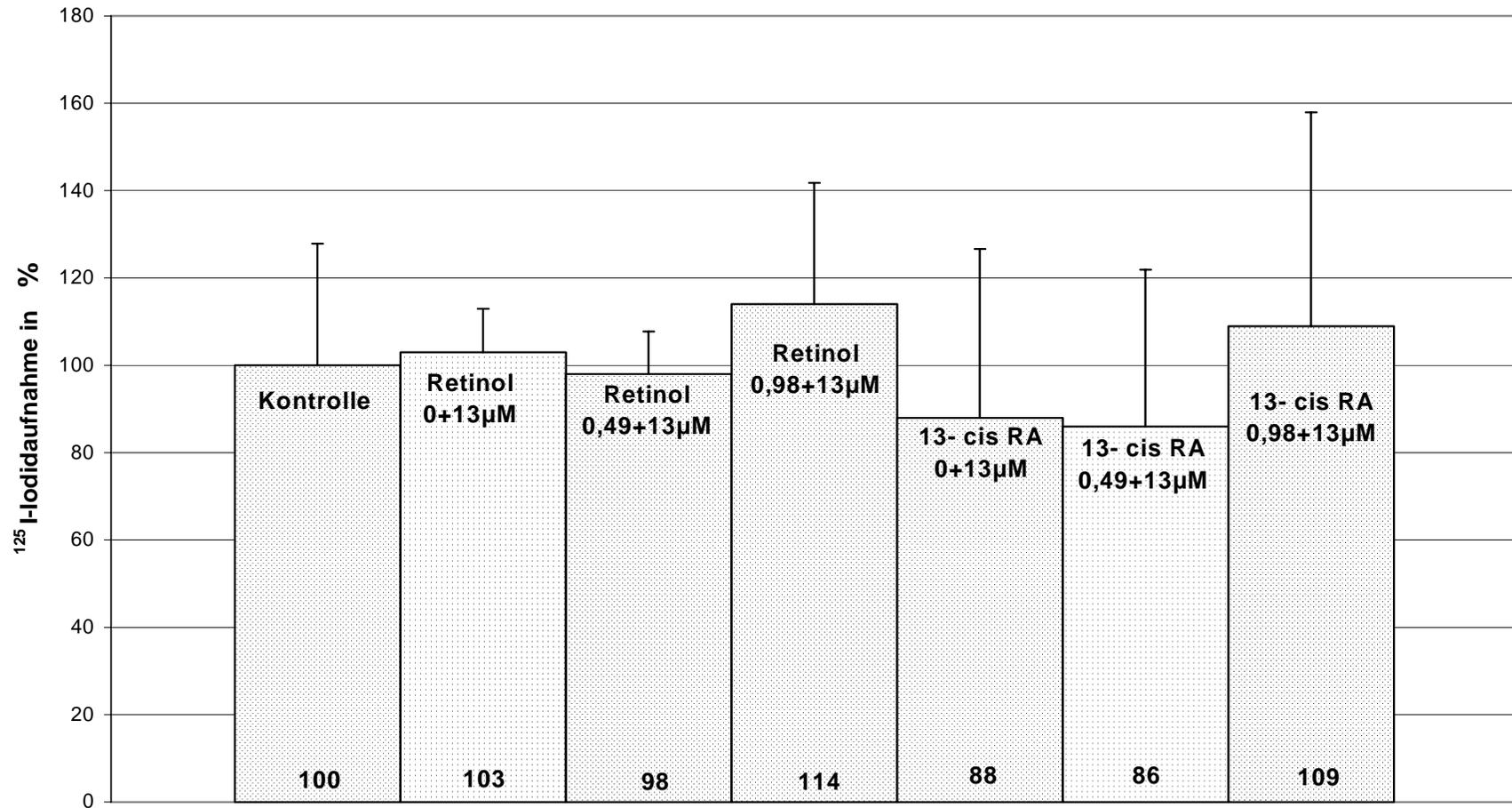
Mittelwert und SEM der Abb. 3a und 3b, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb.3c.



Mittelwert und SEM der Abb. 4a und 4b, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb. 4c



Mittelwerte und SEM der Abb 5a und 5b, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb.5 c

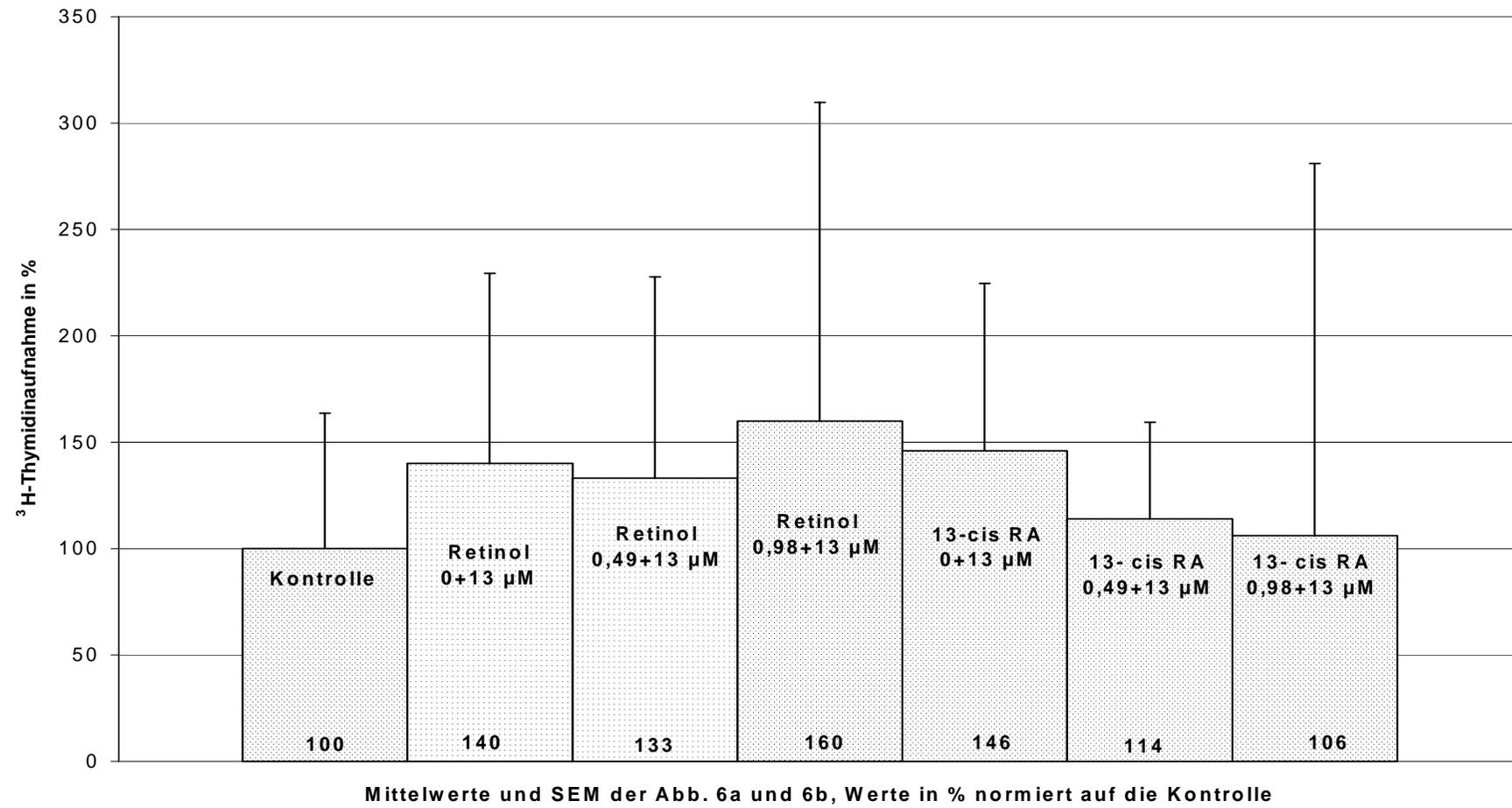
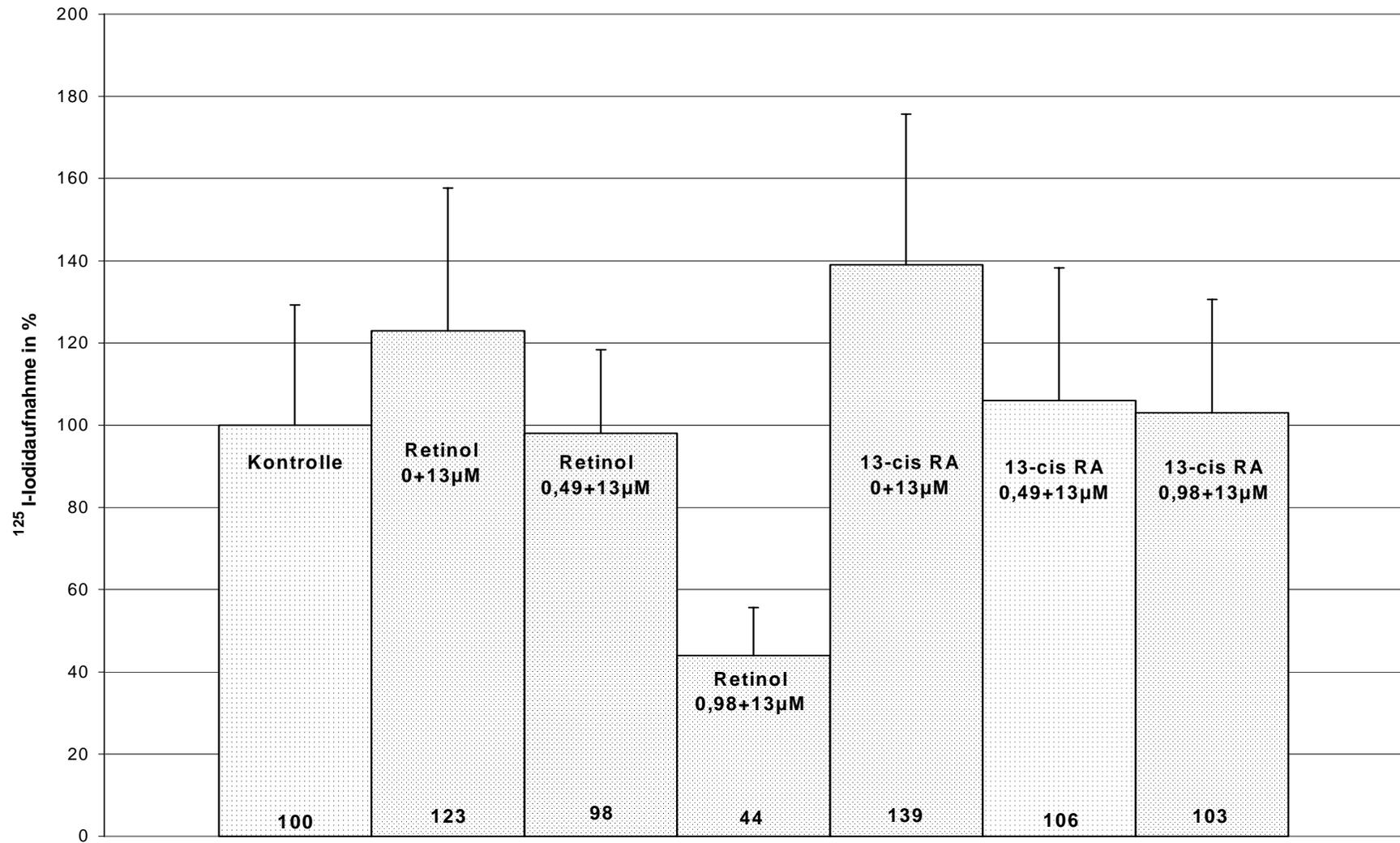
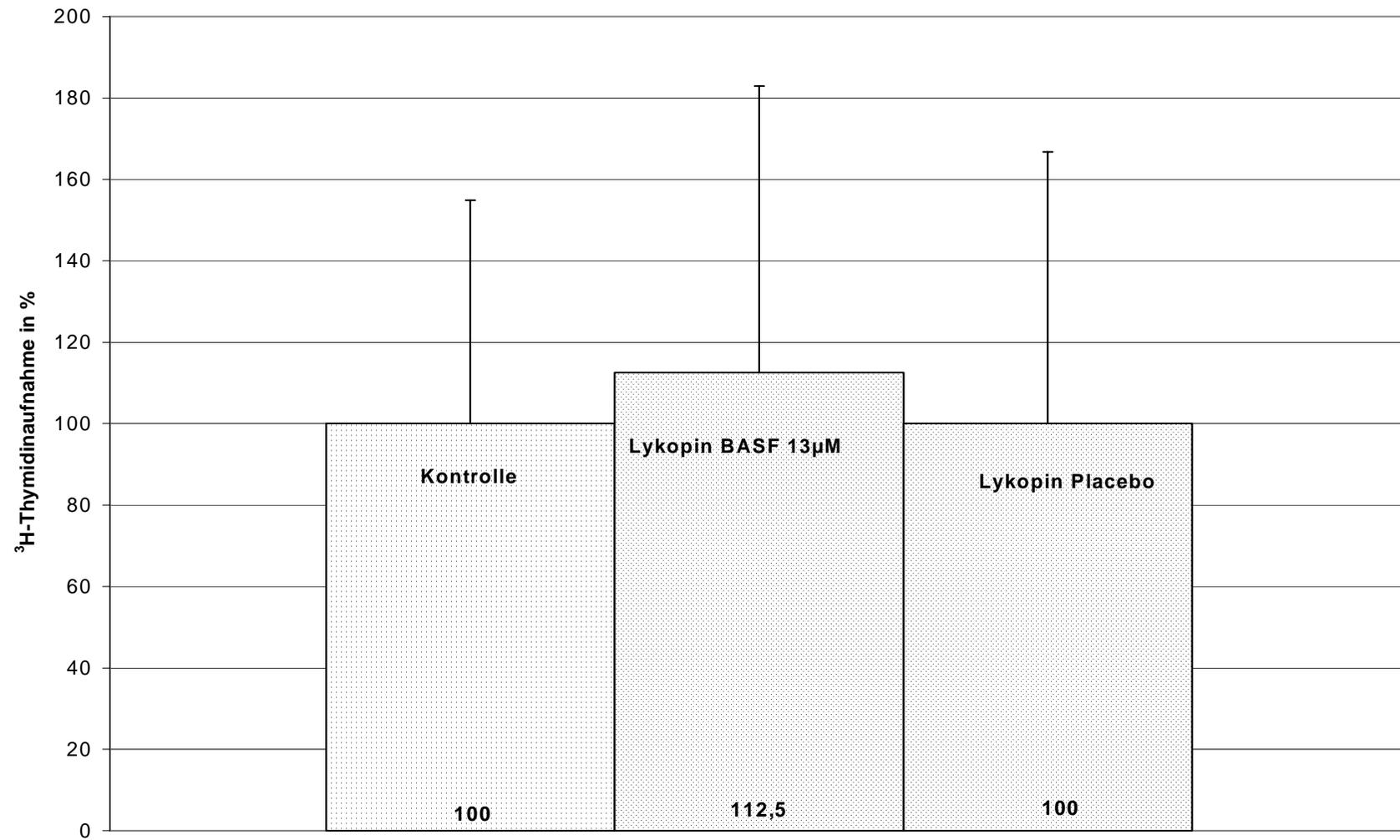


Abb.6 c



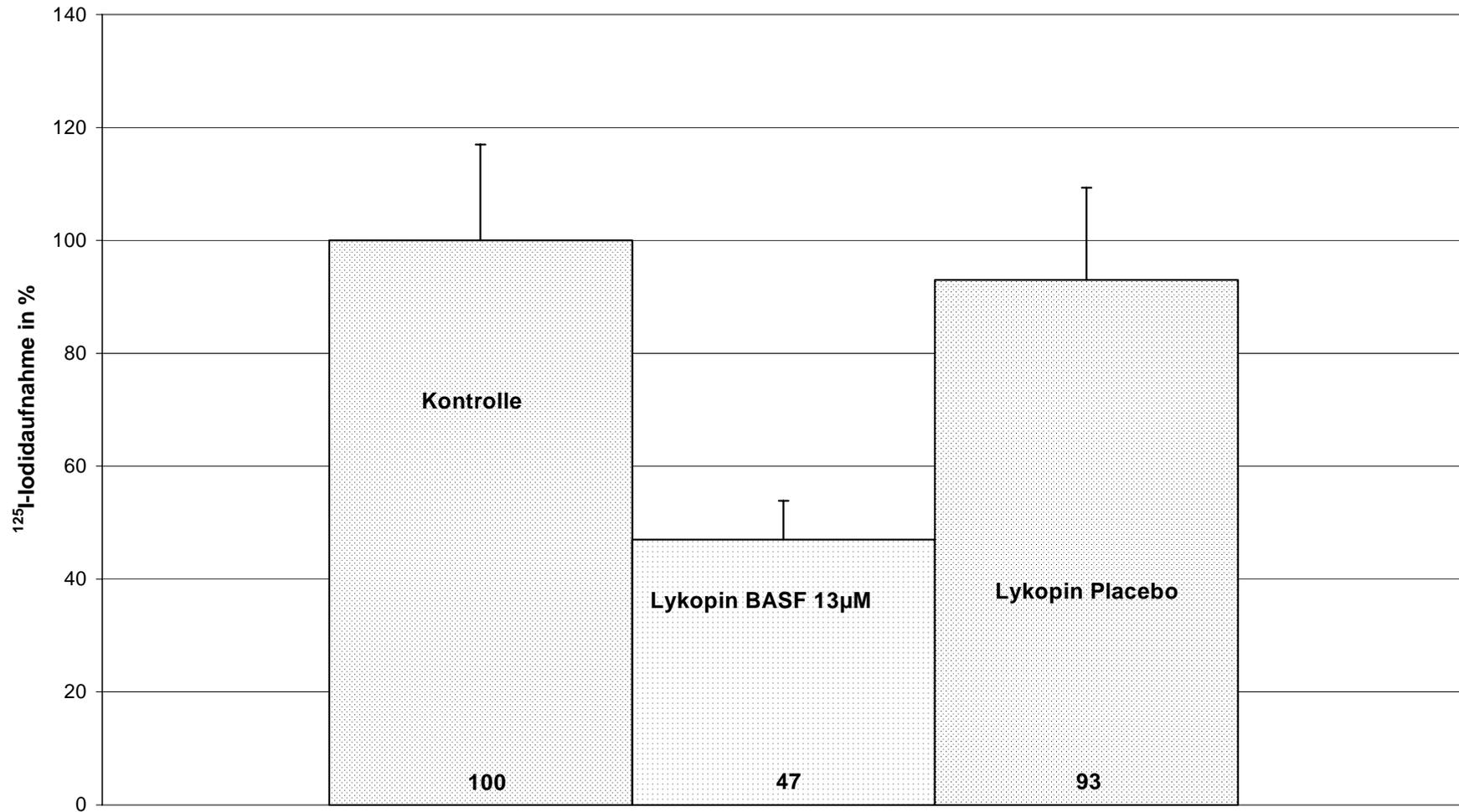
Mittelwerte und SEM der Abb. 7a und 7b, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb. 7c



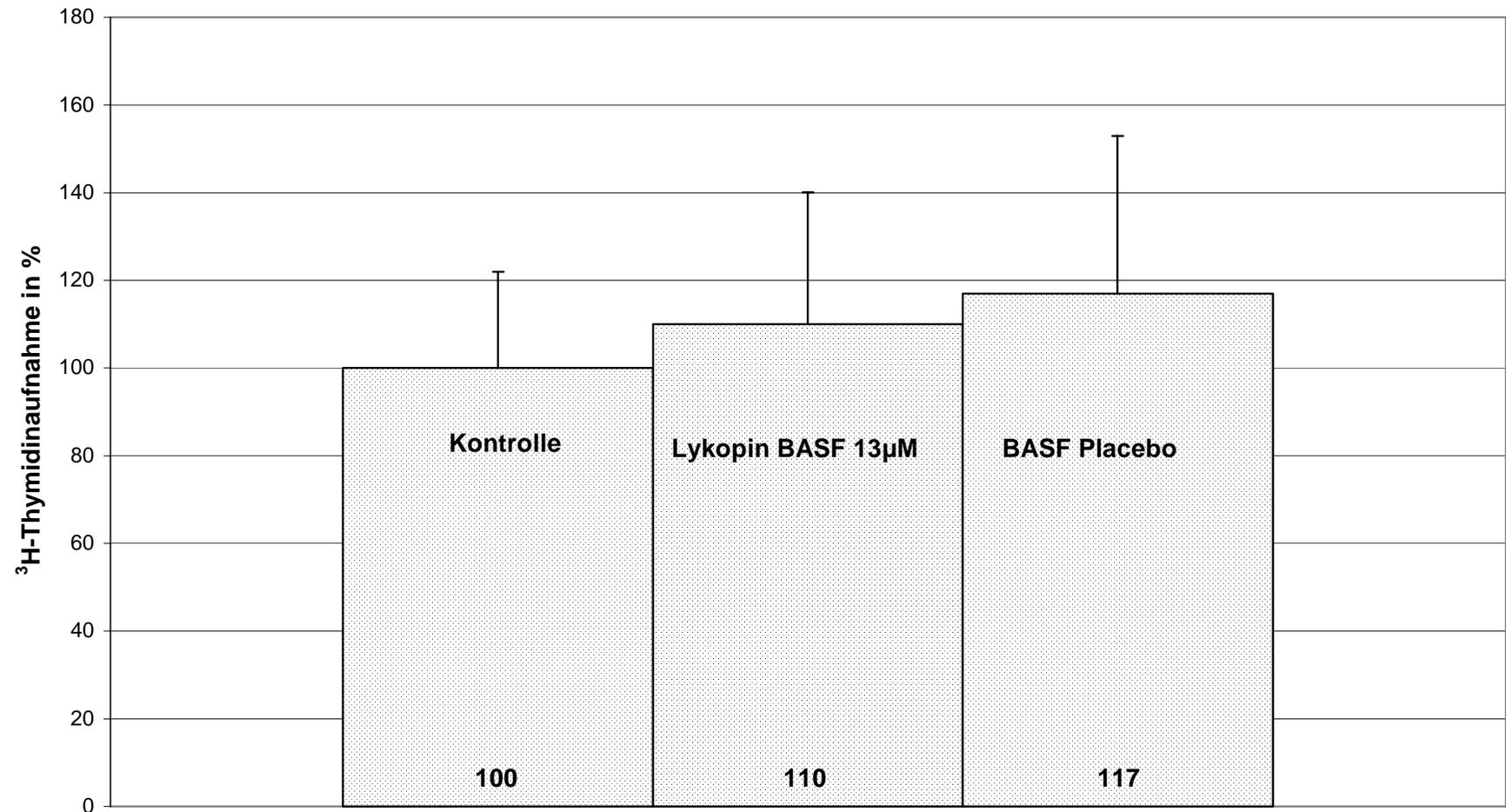
Mittelwerte und SEM der Abb. 8, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb. 8 c



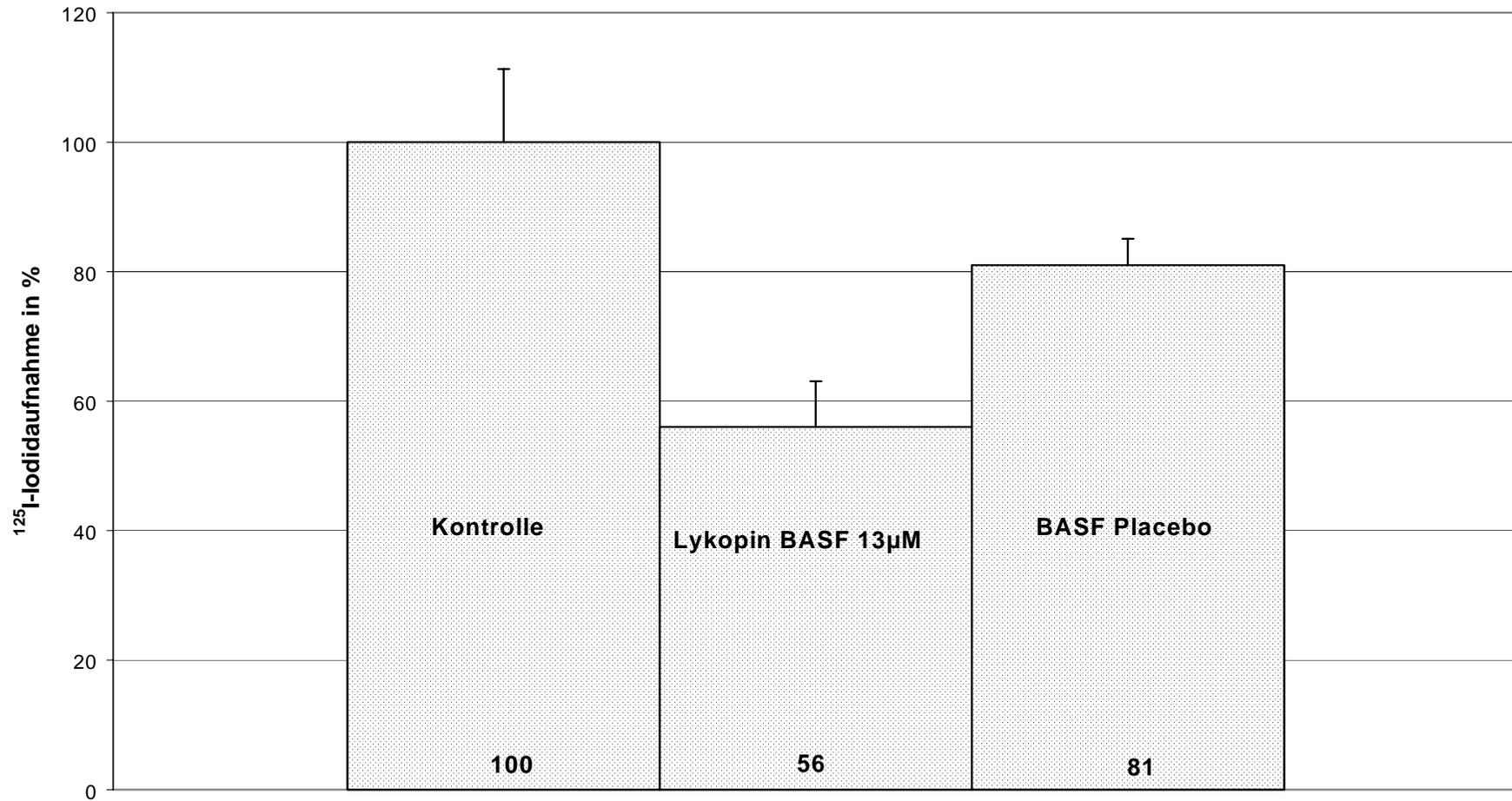
Mittelwerte und SEM der Abb. 9, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb.9 c



Mittelwert und SEM der Abb. 10, Werte in % normiert auf die Kontrolle

120



Mittelwert und SEM der Abb. 11, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb. 11 c

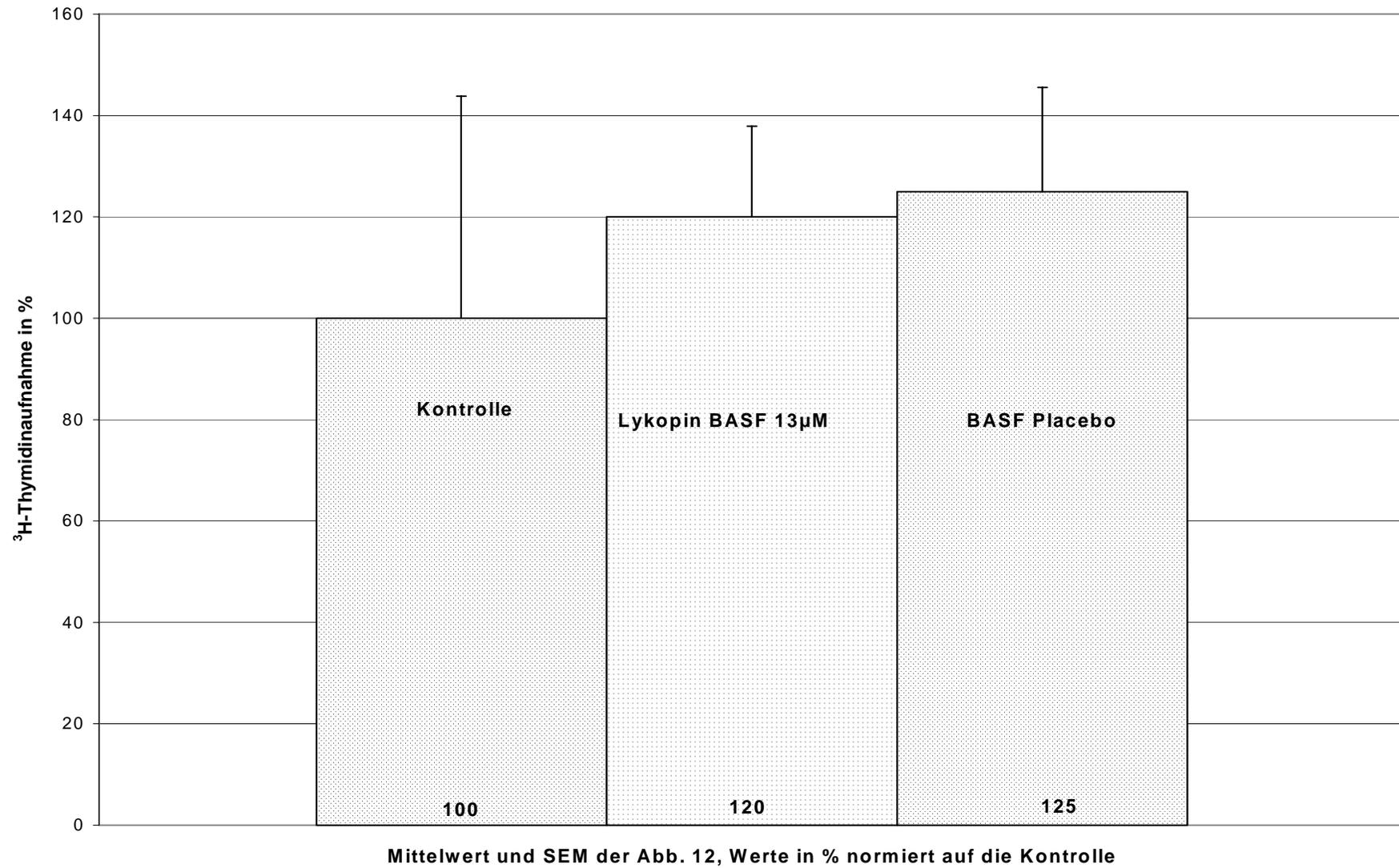
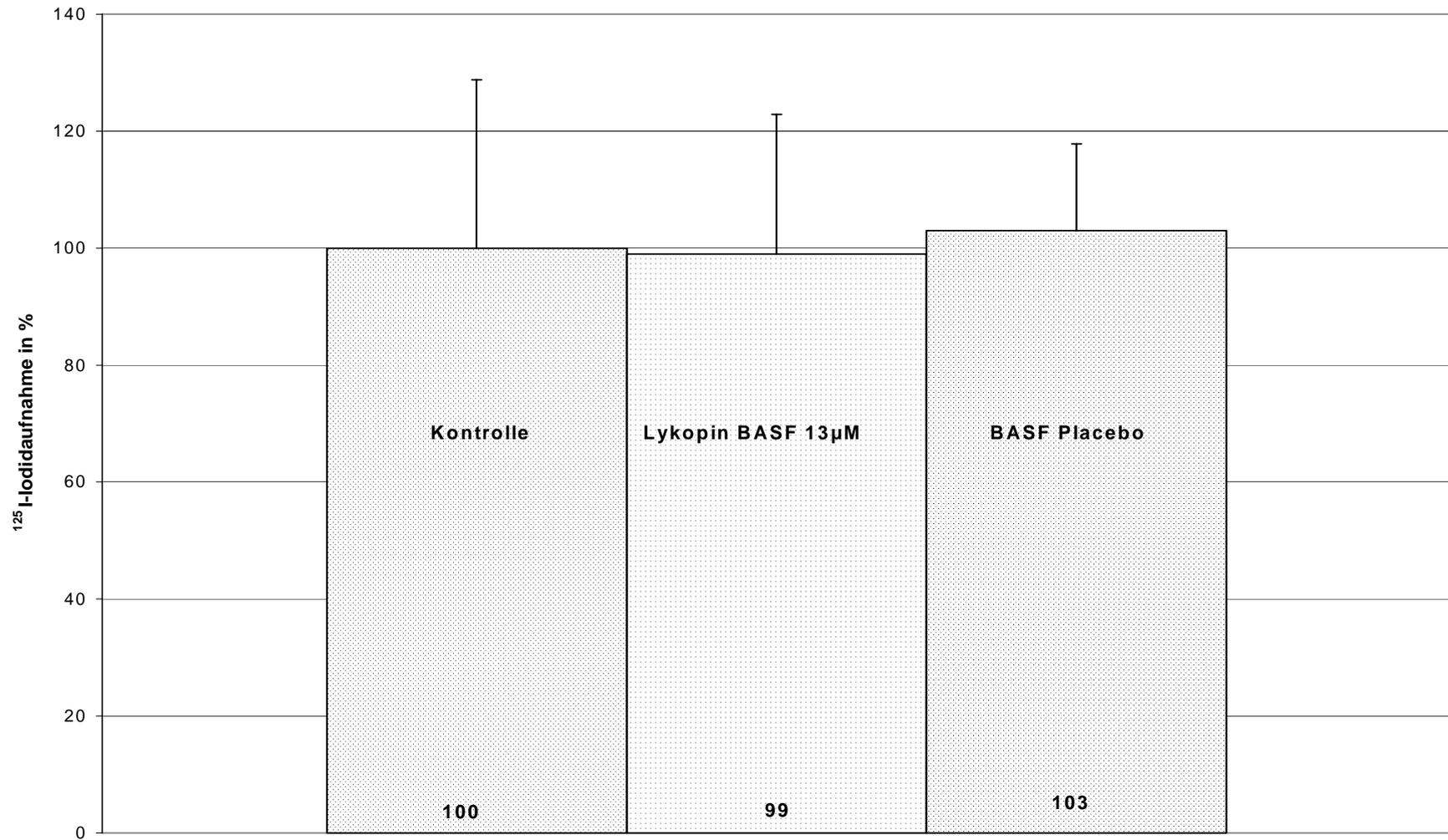


Abb. 12 c



Mittelwert und SEM der Abb.13, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb. 13 c

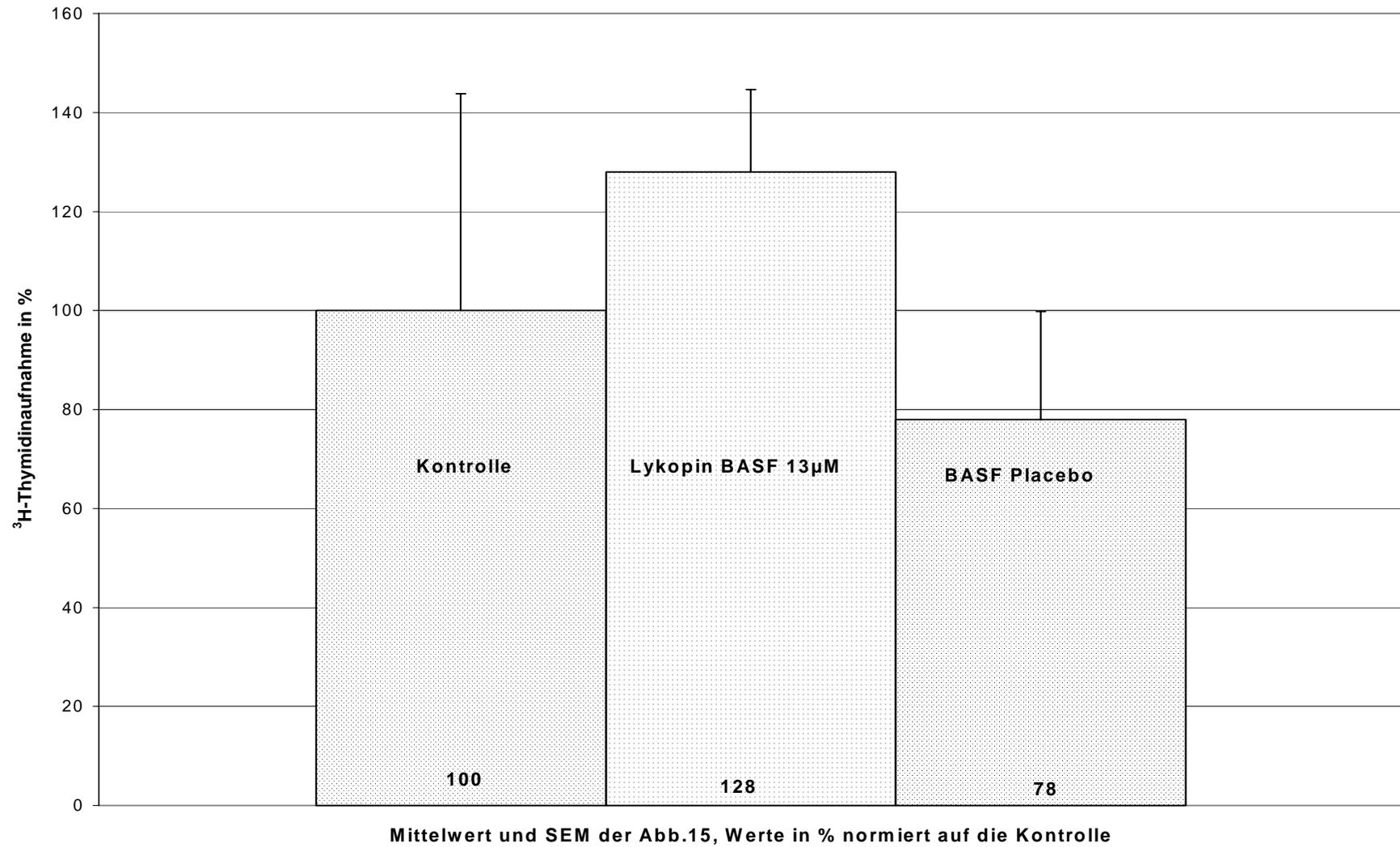
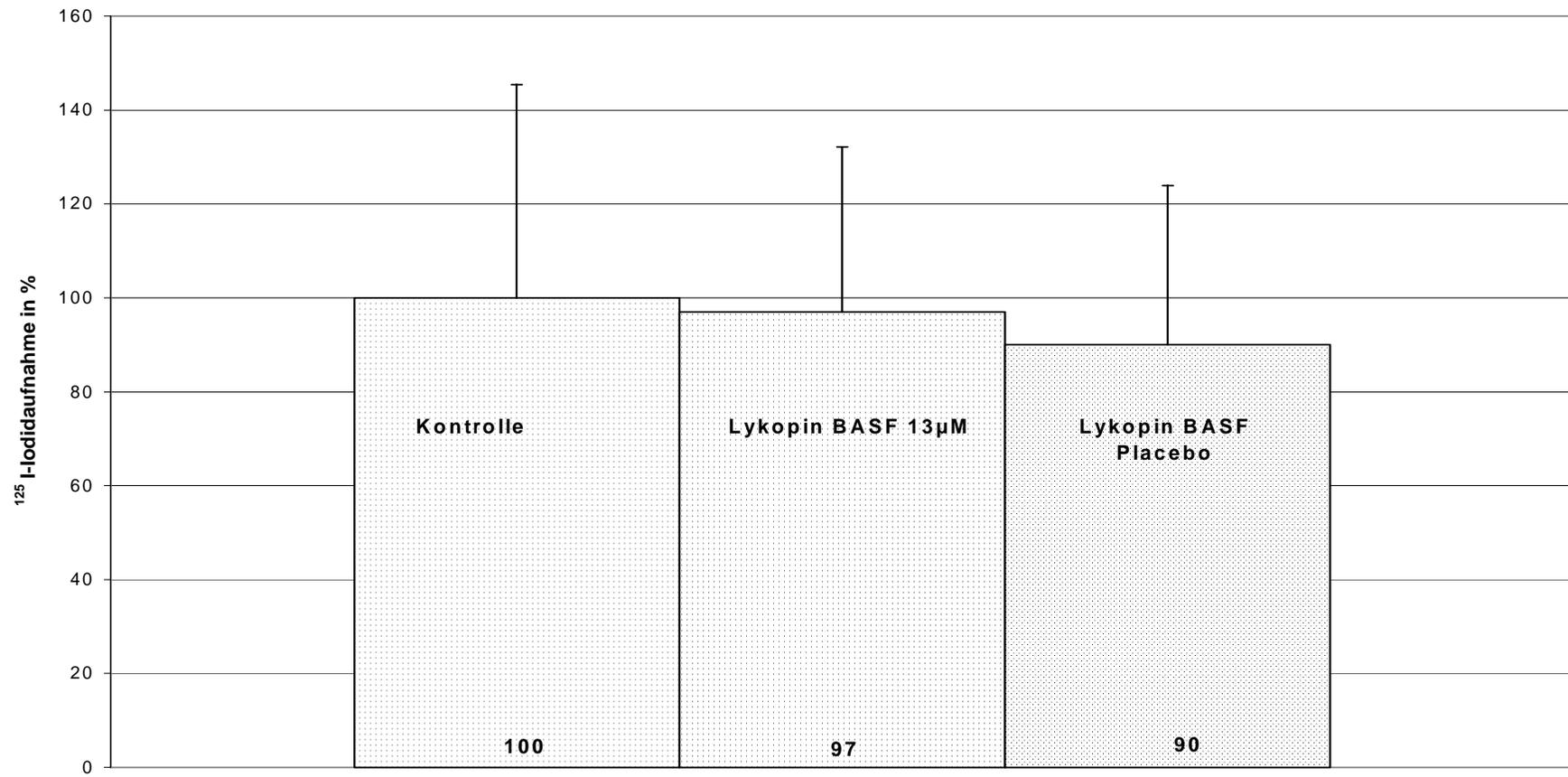


Abb. 15 c



Mittelwert und SEM der Abb. 16, Werte in % normiert auf die Kontrolle

Abb. 16 c