

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin IV
(Schwerpunkt: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,
Nephrologie und Klinische Chemie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Charakterisierung des Effekts verschiedener differenzierungssteigernder
Substanzen auf Proliferation, Apoptose und Iodidstoffwechsel in die
transformierte Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie ONCO-DG 1**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Maren Sarah Hülber
aus
Mainz
2008**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Wahl

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. E. Fröhlich

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	10
2. Material	18
2.1 Untersuchungsmaterial	18
2.2 Geräte für die Zellkultivierung	18
2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität	19
2.4 Medien und Reagenzien	20
3. Methoden	24
3.1 Zellzählung	24
3.2 Herstellung von Kulturen mit malignen humanen Thyreozyten	24
3.3 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellkulturen	25
3.4 Passagierung der Zellkulturen	26
3.5 Stimulation der Zellkulturen	26
3.6 Zellernte	30
3.7 Messung der Radioaktivität	31
3.8 Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin mittels Westernblot	32
3.8.1 Proteinbestimmung	32
3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.8.3 Transfer von Proteinen auf Blotmembran mittels Westernblot-Methode	35
3.8.4 Immunreaktion	36
3.9 Immunzytochemischer Nachweis von NIS und Pendrin unter verschiedenen Differenzierungssubstanzen	37
3.10 Facsanalyse (Durchflussmetrie)	38
3.11 Mykoplasmenachweis	39
3.12 Statistische Auswertung	39

4.	Ergebnisse	..41
4.1	¹²⁵ I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit unterschiedlichen Redifferenzierungssubstanzen	..41
4.1.1	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Retinol	41
4.1.2	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter all-trans-Retinsäure	..42
4.1.3	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter 9-cis-Retinsäure	...43
4.1.4	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter 5-Azadeoxycytidin	44
4.1.5	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Mevinolin	...45
4.1.6	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Valproinsäure	...46
4.1.7	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Apicidin	..48
4.1.8	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter APHA	..49
4.1.9	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Troglitazon	49
4.1.10	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Rosiglitazon	..50
4.1.11	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Pioglitazon	51
4.1.12	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Akt-Inhibitor A mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid	52
4.1.13	¹²⁵ I-Iodidaufnahme unter Akt-Inhibitor B (Triciribin) mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid	..55
4.2	³ H-Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit unterschiedlicher Redifferenzierungssubstanzen	56
4.2.1	³ H-Thymidinaufnahme unter Retinol	..57
4.2.2	³ H-Thymidinaufnahme unter all-trans-Retinsäure	..57
4.2.3	³ H-Thymidinaufnahme unter 9-cis-Retinsäure	58
4.2.4	³ H-Thymidinaufnahme unter 5-Azadeoxycytidin	..59
4.2.5	³ H-Thymidinaufnahme unter Mevinolin	..60
4.2.6	³ H-Thymidinaufnahme unter Valproinsäure	..61
4.2.7	³ H-Thymidinaufnahme unter Apicidin	62
4.2.8	³ H-Thymidinaufnahme unter APHA	..63
4.2.9	³ H-Thymidinaufnahme unter Troglitazon	..64

4.2.10	³ H-Thymidinaufnahme unter Rosiglitazon	65
4.2.11	³ H-Thymidinaufnahme unter Pioglitazon	66
4.2.12	³ H-Thymidinaufnahme unter Akt-Inhibitor A mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsen trioxid	67
4.2.13	³ H-Thymidineinbau unter Akt-Inhibitor B (Triciribin) mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsen trioxid	69
4.3	Immunzytochemischer Nachweis von NIS und Pendrin	70
4.4	Nachweis von NIS-Symporter und Pendrin-Transporter mittels Westernblot	81
4.5	Beeinflussung der Apoptoserate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene Differenzierungs-substanzen	82
5	Diskussion	90
5.1	Methoden	90
5.2	Wirkung von Retinoiden auf die ¹²⁵ I-Iodidaufnahme, ³ H-Thymidinaufnahme und Apoptoserate der ONCO-DG 1-Zellen	92
5.3	Wirkung von 5-Aza-deoxycytidin auf die ¹²⁵ I-Iodidaufnahme, ³ H-Thymidinaufnahme und Apoptoserate	93
5.4	Wirkung von Mevinolin auf die ¹²⁵ I-Iodidaufnahme, ³ H-Thymidinaufnahme und die Apoptoserate	95
5.5	Wirkung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Valproinsäure, Apicidin und APHA) auf die ¹²⁵ I-Iodidaufnahme, den ³ H-Thymidineinbau und die Apoptoserate	96
5.6	Wirkung von Thiazolidindione/ Glitazone (Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon) auf die ¹²⁵ I-Iodid- und ³ H-Thymidinaufnahme	99
5.7	Wirkung von Akt-Inhibitoren (Akt-Inhibitor A und Akt-Inhibitor B/ Triciribin) auf die ¹²⁵ I-Iodidaufnahme, ³ H-Thymidinaufnahme und Apoptoseraten mit und ohne gleichzeitiger Stimulation von Arsen trioxid	100
5.8	Anschließende Bewertung der untersuchten Substanzen	103

6 Zusammenfassung .105

7 Anhang ..108

8 Literatur .154

Danksagung .169

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	-Abbildung
Bq	-Becquerel, 1 Zerfall pro Sekunde
kBq	-Kilo-Becquel
CPM	-counts per minute
DPM	-desintegrations per minute
DMSO	-Dimethyl-Sulfoxid
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
μ g	-Mikrogramm, 10^{-9} Kilogramm
h	-Stunde
JMP	-Statistikprogramm von SAS
M	-Mol
mmol	-Millimol, 10^{-3} Mol
l	-Liter
ml	-Milliliter
μ l	-Mikroliter
min	-Minuten
n	-Anzahl der Proben
NIS	-Natrium-Iodid-Symporter
p	-statistische Wahrscheinlichkeit
PBS	-phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PPAR	-Peroxisome Proliferator Activated Receptor
RAR	-Retinoid acid receptor
RXR	-Retinoid X receptor
s	-Sekunde
SD	-Standardabweichung

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

1. Einleitung

Schilddrüsenkarzinome sind sehr seltene Tumore, nur jeder Dritte von 100.000 Personen erkrankt daran und sie machen ungefähr 1% aller Krebsfälle aus (Karavitaki et al, 2002). Frauen erkranken 2 bis 3mal häufiger als Männer, vor allem zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr. Klassifiziert werden die Schilddrüsentumore nach histologischen Kriterien (<http://www.aco-asso.at/manual/aktuell/schilddr/03.html>):

1. Karzinome mit Follikelzellursprung

1.1 Differenzierte Karzinome

1.1.1 Papilläres Karzinom

- a. Klassische Form
- b. Varianten

1.1.2 Follikuläres Karzinom

- a. Minimal invasives Karzinom
- b. Grob-invasives Karzinom

1.2 Gering differenziertes Karzinom

1.3 Anaplastisches (undifferenziertes) Karzinom

2. Karzinome mit C-Zelldifferenzierung

2.1 Medulläres Karzinom

- a. Familiär (z.B. Neoplastische C-Zellhyperplasie)
- b. Sporadisch

2.2 Gemischte Follikelzell und C-Zelldifferenzierung

3. Seltene primäre Schilddrüsenkarzinome

3.1 Plattenepithelkarzinom

3.2 Tumoren mit Thymus- oder thymusähnlicher Schlundtaschen-Differenzierungen

3.3 Mucoepidermoidkarzinom

3.4. Sklerosierendes mukoepidermoides Karzinom mit Eosinophilen

3.5. Ductus thyreoglossus-Karzinom

Tab.1: WHO-Einteilung von Schilddrüsenkarzinomen (1989)

Seltener sind in der Schilddrüse maligne Lymphome, Sarkome und Metastasen extrathyreoidaler Tumore. Die gutartigen Tumore der Schilddrüse werden in follikuläre Adenome und endokrin aktive (autonome) Adenome eingeteilt.

In ungefähr 60% aller Schilddrüsenkarzinomfällen findet sich ein papilläres Karzinom. Es geht von den Follikelzellen aus und ist gekennzeichnet durch papilläre und/ oder follikuläre Auswüchse, die allerdings nicht zwingend vorhanden sein müssen. Es handelt sich um ein langsam und infiltrativ wachsendes Karzinom, bei dem auch die Möglichkeit besteht, dass es zu einer Abkapselung kommt, welche aber nur in 10% aller Fälle auftritt. Weitere Variationen von diesem Tumor sind das papilläre Mikrokarzinom¹, das diffus sklerosierende papilläre Karzinom², das oxyphil (onkozytär) papilläre Karzinom³ und die follikuläre Form des papillären Karzinoms⁴. Alle papillären Schilddrüsenkarzinome besitzen keine Möglichkeit Hormone zu produzieren, können allerdings noch minimal Iod aufnehmen, was sie für eine Radioiodtherapie zugänglich macht.

Eine weitere Neoplasie ist das follikuläre Karzinom mit einem Vorkommen von 20-25%. Genauso wie bei dem papillären Karzinom handelt es sich um follikuläre Neoplasien. Es ist jedoch schwerer zu diagnostizieren. Das Karzinom tritt solitär, unilateral auf. Eine Metastasierung erfolgt hämatogen, lymphogene Ausdehnungen sind seltener zu finden. Die Ausbreitung hängt jedoch von dem Tumortyp ab. Bei einem abgekapselten, minimal invasiven Tumor beträgt die Metastasenbildung um 10%, handelt es sich um ein grob invasives Karzinom⁵ steigt die Häufigkeit auf 80%. Andere Abwandlungen sind das oxyphile (onkozy-

¹ Durchschnittlich 1cm groß; strahlenförmige Narbe; nicht abgekapselt; drüsige und papilläre Formationen

² Plattenepithelartige Differenzierung; lymphozytäre Infiltrate; ausgeprägte Infiltration

³ Kann kein Radiojod speichern, bildet allerdings Thyreoglobulin; große Onkozyten mit eosinophilen Zytoplasmakörper

⁴ Vorkommen von follikulären Strukturen und/ oder Kolloiden

⁵ Unvollständige Kapselbildung, ausgeprägte Infiltration in Weichgewebe, Gefäßeinbrüche

täre), follikuläre Karzinom und das hellzellige Karzinom. Nur wenige follikuläre Karzinome sind in der Lage Hormone zu bilden, können aber Jod aufnehmen . Des Weiteren gibt es noch das anaplastische (undifferenzierte) Schilddrüsenkarzinom. Es geht meistens von den Follikelzellen aus, wächst sehr rasch und diffus ins umliegende Gewebe und metastasiert lymphogen sowie hämatogen. Allerdings macht es nur ungefähr 5-10% aller Schilddrüsenkarzinome aus.

Fast alle Schilddrüsentumore haben die Fähigkeit Iod aufzunehmen teilweise oder ganz verloren (Klutmann et al, 2001). Die Iodid-Aufnahme aus der Blutbahn in die Schilddrüsenzellen erfolgt über den Natrium-Iodid-Co-Transporter (NIS). Dieser befindet sich an der basolateralen Membran der Thyreozyten (Paire et al, 1997) und arbeitet gegen den Konzentrationgradienten. Wie andere natriumabhängige Transporter benötigt er zusätzliche Energie, die ihm durch die Natrium-Kalium-ATPase ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$) zur Verfügung gestellt wird (Chambard et al, 1983). Die durch NIS vermittelte Anhäufung von Iodid in den Thyreozyten ist eine entscheidende Voraussetzung für den Erfolg der Radioiodtherapie von gut- und bösartigen Schilddrüsenerkrankungen (Spitzweg et al, 2000). Im papillären Schilddrüsenkarzinom wurde zwar eine gesteigerte NIS-Expression, jedoch keine gesteigerte Iodidaufnahme (Saito et al, 1997) entdeckt. Grund dafür könnte ein Defekt des NIS-Gens (Miki et al, 1997) sein. Die Iodidaufnahme durch den Natrium-Iodid-Symporter lässt sich auch kompetitiv durch verschiedene Anionen, wie zum Beispiel Perchlorat (Lawrence et al, 2000) hemmen.

Für die Hormonproduktion muss das Iodid in das Follikellumen transportiert werden. Möglicherweise kommt hierfür das Pendrin in Frage. Dieses gehört zu der Gruppe der Chlorid-Iodid-Transporter (Scott et al, 1999; Bidart et al, 2000) und benötigt im Gegensatz zum NIS keine weitere Energiequelle. Des Weiteren wurde von Rodriguez et al. (2002) ein zweiter apikaler Iodidtransporter (AIT) identifiziert, der ebenfalls einen passiven Iodidtransport in das Kolloid ermöglicht.

Es wäre somit von großem therapeutischem Interesse die Iodinkorporation in maligne transformierte Thyreozyten wiederherzustellen, damit diese für eine Radioiodtherapie zugänglich werden. Aus diesem Grund wird versucht, maligne transformierte Zellen mit verschiedenen Substanzen zu einer Redifferenzierung anzuregen.

Eine dieser Substanzen ist Vitamin A (Retinol) und seine Derivate. Sie binden an den Retinoid Acid Receptor (RAR) oder den Retinoid X Receptor (RXR). Durch Stimulation mit den Retinoiden gehen die Liganden mit einer Vielzahl von anderen Liganden dimere Komplexe ein und üben so Einfluss auf die Genexpression aus. Sie regulieren nicht nur die Entwicklung, Morpho- und Organogenese, das Wachstum, den Stoffwechsel und die Homöostase, sondern nehmen auch Einfluss auf die Differenzierung sowohl im gesunden als auch im entarteten Gewebe. Bei malignen Thyreozyten können die Retinoide eine Redifferenzierung des NIS bewirken und somit die Iodidaufnahme steigern (Simon et al, 2002). Des Weiteren induzieren sie Apoptose, wodurch eine unkontrollierte Proliferation verhindert und beschädigte oder mutierte Zellen eliminiert werden können (Gratzl et al, 2002).

Thiazolidindione/ Glitazone (Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon) besitzen ebenfalls ein Potential zur Redifferenzierung von malignen entarteten Thyreozyten (Fröhlich et al, 2005). Es handelt sich hierbei um Substanzen, die primär als Insulinsensitizer entwickelt wurden und die periphere Insulinresistenz und somit den Blutglukosespiegel senken. Molekular gesehen binden sie an den Peroxisome Proliferator Activated Receptor (PPAR). Dieser bildet nach seiner Aktivierung mit verschiedenen nukleären Rezeptoren, wie zum Beispiel dem nukleären Rezeptor RXR, Komplexe (Verspohl et al, 2002). Dadurch werden die insulinabhängigen Gene zu einer vermehrten Proteinbildung angeregt, welche für die Glucoseaufnahme in die Zelle verantwortlich sind (Bennett et al, 2004; Hernandez et al, 2003; Shen et al, 2004). Des Weiteren sind die Glitazone an der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten beteiligt (Janka, 2001; Vazquez et al, 2002). Thiazolidindione konnten auch eine Redifferenzierung und Wachstumsinhibition bei verschiedenen Tumorzellen erzielen. In der

Tumortherapie wurde Rosiglitazon bei humanen Pankreasneoplasien wie auch bei einem humanen Hypophysenadenom effektiv eingesetzt (Kawa et al, 2002; Heaney et al, 2003).

Andere Differenzierungssubstanzen gehören zu der Klasse der Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC). Histone stellen den Proteinanteil des Chromatins dar. Durch Acetylierung und Deacetylierung wird das Ablesen der Gene an der DNA, die mit ihren Windungen den Histonen aufliegt, reguliert. Histon-Deacetylase-Inhibitoren führen zu einer Hyperacetylierung der Histone. Dadurch werden Ladungen zwischen den Seitenstellen der Histone und den Phosphatgruppen der DNA neutralisiert. Dies führt zu einer offenen Chromatinstruktur, die für Transkriptionsfaktoren, RNA-Polymerase und andere regulatorische Komplexe zugänglich wird. Es können dadurch in Tumoren Gene reguliert werden, welche zelluläre Kontrollfunktionen erfüllen. Es kann somit zu Differenzierung und Apoptose kommen (Jung, 2001). Zu den Histon-Deacetylase-Inhibitoren zählen APHA, Apicidin und die Valproinsäure. In Studien an Kulturen mit veränderten malignen Thyreozyten bewirkte Valproinsäure, das primär als Antikonvulsivum verwendet wird, eine gesteigerte Iodinkorporation durch Reexpression des NIS-Gens (Fortunati et al, 2004).

Mevinolin (Lovastatin) ist eine weitere Differenzierungssubstanz. Es gehört zu den Inhibitoren der β -HMG-CoA-Reduktase. β -HMG-CoA-Reduktase katalysiert die Umwandlung von β -HMG-CoA zu Mevalonat im Cholesterinstoffwechsel und ist das Schlüsselenzym des Cholesterinstoffwechsels. Die hemmende Wirkung von Mevinolin bewirkt einen Abfall des Endproduktes Cholesterin. Dabei fallen auch Intermediärprodukte (downstream products) aus. Das wichtigste scheint das Geranylgeranylphosphat zu sein, das eine Rolle in der Signalübertragung zur Apoptose spielt (Wong WW et al, 2002; Brower, 2003). Neben der Cholesterinsenkung zeigt Mevinolin auch eine Reihe von Effekten bei anderen Erkrankungen (Cannon et al, 2004). In der Tumorforschung zeigt es auch einen hemmenden Einfluss auf das Zellwachstum durch Proteosomaktivierung. Proteosome, bei denen es sich um Enzymkomplexe handelt, lassen den Zellzyklus

arretieren und hindern somit die malignen Zellen an einer unkontrollierten Proliferation. Zusätzlich können sie Apoptose auslösen, was bereits in vivo nachgewiesen wurde (Brower, 2003).

Das zu den Cytidin-Derivaten (Decitabine) gehörende 5-Aza-deoxycytidin zählt zu den Methyltransferase-Inhibitoren und zu den Differenzierungssubstanzen. Bei der DNA-Methylierung wird eine Methylgruppe in die Position 5 des Cytosins eingefügt. Dieser epigenetische Vorgang beeinflusst die Chromatinstruktur transkriptionsbeteiligter Prozesse. Bei malignen Veränderungen ändert sich das Methylierungsmuster. Es kommt zu einer globalen Hypomethylierung mit inselartigen Hypermethylierungen (Jones et al, 2002). Dies kann zur Unterdrückung von Tumor-Suppressor-Genen führen. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren verhindern die Hypermethylierung und können die Expression von Tumor-Suppressor-Genen wieder herstellen und wirken somit antitumorös. 5-Aza-deoxycytidin wird anstelle des Nucleosidbausteins Cytosin, der als Substrat der Methyltransferase fungiert, in die DNA eingebaut und wirkt dann als Selbstmordsubstrat (Lyko, 2002).

Eine weitere viel versprechende Redifferenzierungssubstanz stellt das Arsen-trioxid dar. Es induziert Apoptose in den Tumorzellen, in dem es mit einer Vielzahl von cystein-, bzw. thiolhaltigen Proteinen agiert. Allerdings wurden bis jetzt keine weiteren zell-differenzierenden Effekte entdeckt (Miller, 2002). Dennoch wurde eine Entfaltung anti-tumorigener Wirkung bei Mamma-, Cervix-, Prostatakarzinomen und Karzinomen des Gastrointestinaltraktes beobachtet (Zhang, 1999; Maeda et al, 2001; Chun et al, 2002; Vuky et al, 2002). Des Weiteren ist ein Synergismus zwischen Arsen-trioxid und den Retinoiden (Huang, 2000; Cai, 2000; Au et al, 2002; Zheng, 2005), sowie mit den Akt-Inhibitoren bekannt (Tabellini et al, 2005).

Inhibitoren der Proteinkinase B (PKB oder auch Akt genannt) üben auch Einfluss auf die Differenzierung maligner Krebszellen aus. Da die PKB/Akt zu den Serin-/Threonin-Kinasen gehört, besteht ihre Aufgabe in der Phosphorylierung

verschiedener Proteine. Hierdurch nimmt diese Kinase Einfluss auf mehr als 500 Gene des menschlichen Genoms, die vor allem das Zellwachstum und die Apoptose regulieren. In vielen Tumoren sind Regulationsstörungen des Akt/PI3K-Signalweges durch übermäßige Expression und Aktivierung des PIK3C- oder Akt-Gens zu beobachten (Osaki et al, 2004). Es wird allerdings vermutet, dass dieser übermäßigen Expression nicht immer dieselbe Mutation zu Grunde liegt (Wu et al, 2005; Kim et al, 2005; Mandal et al, 2005). Durch den Einsatz von Akt-Inhibitoren wird bei cancerogenen Thyreozyten die Zellproliferation gesenkt und die Apoptoserate erhöht (Mandal et al., 2005). Allerdings wurden in verschiedenen Studien, in denen der Akt-Inhibitor in Kombination mit Arsentrioxid angewendet wurde, unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Apoptoserate festgestellt (Ramos et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen unter Verwendung von Zellkulturen humaner kanzerogener Thyreozyten beantwortet werden:

- Hat Retinol/ Retinsäure/ 9-cis-Retinsäure/ Troglitazon/ Rosiglitazon/ Pioglitazon/ APHA/ Apicidin/ Valproinsäure/ Arsentrioxid/ Akt-Inhibitor A/ Akt-Inhibitor B (Triciribin) eine differenzierungssteigernde Wirkung auf maligne humane Thyreozyten? Und wie wirken sich diese Substanzen auf die ^{125}I -Iodidaufnahme aus?
- Ist unter Anwendung der oben genannten Substanzen ein Anstieg der NIS-Expression zu beobachten?
- Ist ein Anstieg des Pendrin-Proteins unter dem Einfluss der oben genannten Substanzen zu erkennen?
- Lässt sich ein additiver Effekt von Akt-Inhibitor A mit Arsentrioxid bei der ^{125}I -Iodidaufnahme und dem ^3H -Thymidineinbau feststellen?

- Ist ein Synergismus von Akt-Inhibitor B (Triciribin/Akt Inhibitor V) mit Arsentrioxid bei der ^{125}I -Iodidaufnahme und dem ^3H -Thymidineinbau zu beobachten?
- Welchen Einfluss haben die oben genannten Substanzen auf den ^3H -Thymidineinbau?
- Haben die oben genannten Substanzen einen Apoptose-induzierenden Effekt?
- Wie verhält sich unter den oben genannten Substanzen die Thymoglobulinproduktion?

2. Material

2.1 Untersuchungsmaterial

- Humane kanzerogene Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 (DSZM no.: ACC 507)

2.2 Geräte für die Zellkultivierung

- Sterile Werkbank:
 - Heraeus Herasafe, Heraeus
- Zentrifuge:
 - Hettich Rotixa / RP, Hettich
 - Beckmann Coulter CH-AVJ 20 XP
 - Heraeus Biofuge primo R
- Lichtmikroskop:
 - Olympus IX 51
- Brutschrank:
 - Heracell, Heraeus
 - Heracell 240, Heraeus
- Zellzählgerät:
 - Schärfe Systeme, Casy® Model TTC
- Spektrometer:
 - Ultrospec 2100 pro (UV-visible Spectrometer), Amersham Biosciences
- Luminometer:
 - Mithras LB 940, Berthold Technologies
- Westernblots:
 - The Joey Gel Caster, Modell JG C-4, JG C-2, JG C-3, owl
 - P8DS Emperor Penguin, Vertical Electrophoresis System, owl
 - VEP-2 Bandit, Mini Tank Electroblotting System, owl

- Membran Immobilon-P-Transfer, Cat.No: IPVH 00010, Poresize: 0,45mm, Millipore
- Power Supply, E 385, Consort
- Heizblock, thermomixer comfort, Eppendorf
- Kamera: Fujifilm/Raytest, Intelligent Dark Box, LAS 3000
- Aufnahmeprogramm: Image Reader LAS 3000
- Auswertesoftware: AIDA Image Analyzer; V.3.44
- Zellkulturflaschen:
 - Costar 3150, 162 cm², Corning Incorporated
 - Falcon 35 3108, 50 cm²
- Zellernte:
 - Zellerntegerät Cellharvester IH 280, Inotech AG
 - Printed Filtermat 1450-421, Glass Fibre Filter, 90 x 120 mm, Wallac
 - Sample Bag 1450-432, 90 x 120 mm, Perkin Elmer
 - Filtermat 11731, 102 x 256 mm, Skatron Instruments
- Kulturgefäße:
 - Costar 3548, 48 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated
 - Costar 3596, 96 Well Cell Culture Cluster, Corning Incorporated
- Zentrifugenröhrchen:
 - 50 ml Cellstar, Cat.No. 227261, gr einer bio-one
- Facsanalyse:
 - Zentrifuge Hettich Roto Silenta/K, Hettich
 - Facs- Gerät, Modell %Calibur+, Becton Dickson, USA
 - Facsröhrchen, Becton Dickson, USA

2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität

- Zur Messung von Beta -Strahlung:
 - Microbeta-Trilux, 1450 Microbeta (liquid scintillation & luminescence counter), Wallac

- Tri-carb 2900 TR (liquid scintillation Analyzer), Packard (Biosciences Company)
- Zur Messung von Gamma-Strahlung:
 - Wizard 3 μ 1480 Automatic Gamma Counter, Wallac
- Erfassung der Chemolumineszenz auf Blot-Membran:
 - LAS 3000 Image Reader (Fuji Photo Film)
 - Dokumentation mit Advanced Image Data Analyser, Version 3.4

2.4 Medien und Reagenzien

- (6-³H)-Thymidin, TRK 61, Amersham Biosciences
- ¹²⁵I-Iodid, IMS. 30, Amersham Biosciences
- 2-Mercaptoethanol
- 9-cis-Retinsäure, R 4643, Sigma
- Acrylamide-bis-Lösung 40%, 10681; Serva
- Akt-Inhibitor B: Triciribin, Cat. 124012, Calbiochem
- Akt. Inhibitor A: 1L6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-*sn*-glycerocarbonate, Cat. 124005, Calbiochem
- APHA, A 2478, Sigma
- Apizidin, A 88851, Sigma
- APS 10% (Ammonium Persulfat), A-3678; Sigma
- Arsen(III)-tri-oxid (arsenige Säure), Universitätsapotheke Tübingen
- 5-Aza-deoxycytidin, 11390, Fluka
- Bio-Rad Protein Assay, Cat: 500-0006, Bio-Rad Laboratories GmbH
- Blotpuffer nach Tobwin [pH 8,5]: 3,03 g Trizma Base + 14,41 g Glycin + 200 ml Methanol + 1000 ml Ampuwa
- Bradford Stammlösung: 100 mg Coomassie brilliant blue G 250 gelöst in 50 ml 95% EtOH + 100 ml 85% Ortho-Phosphorsäure, wird erst kurz vor Gebrauch mit A. bidest 1:7 verdünnt

- Bromphenolblau (w/v), 8122; Merck
- Casyton, Isotone Kochsalzlösung, Schärfe Systeme
Cat. BE 17-517 Q, Cambrex
- Coomassie Brilliant Blue G 250 (0,1% in 50% Methanol)
- Dimethylsulfoxid (DMSO), D-8418, Sigma
- ECL-Lösung (Lsg A:Lsg B; 1:1):
 - Lösung A: 4,41 mM Luminol (12,307-2, Aldrich) und 4,32 mM p-Jodphenol (1,020-1, Aldrich) in 0,1 M TRIS/HCl (pH 9,35) aufgelöst
 - Lösung B: 0,025% Wasserstoffperoxid 30% (A 2473,0500, AppliChem) in 0,1 M TRIS/HCl (pH 9,35) aufgelöst
- Erstantikörper:
 - NIS 4, Prof. Czarnocka, Warschau
 - PDS1, Prof. Czarnocka, Warschau
 - Thyreoglobulin: polyclonal Rabbit, Anti Human Thyreoglobulin, A0251, DAKO Cytomation
- Essigsäure 1%, 8.18755.1000, Merck
- Ethanol (Lösungsmittel für Mevinolin), Universitätsapothek Tübingen
- Fetales Kälberserum: fetal bovine serum, F 7524, Sigma
- Glycerin (87%), 1.04091.1000; Merck
- Glycin, 3908; Roth
- H₂O₂ 30%, A 2473,0500; Appli Chem
- HCl (32%ig), 1.00319.1000; Merck
- HMW (high molecular weight marker) Calibration Kit for SDS, Electrophoresis, Mix of protein standard, Cat. 17-0615-01, Amersham Biosciences
- Holtz'sches Gemisch (30g D+-Saccharose + 1g Gummi Arabicum + 1000 ml H₂O)
- Kulturmedium: RPMI 1640 + L-Glutamine, Ref. 21875-034, Gibco
- Laufpuffer für SDS-PAGE nach Laemmli: 30 g Trizma-Base + 144 g Glycin + 10 g SDS + 1000 ml Ampuwa
- Luminol, 12,307-2, Aldrich

- Magermilchpulver 5%, T 145.2, Roth
- Methanol (Lösungsmittel für Retinoide), 1.06009.2511, Merck KGaA
- Mevinolin, M2147, Sigma
- Myco Alert Mycoplasma Detection Kit, Cambrex, USA
- NaCl, 3957,1, Roth
- NBT: BCIP/ NBT (5-Bromo-4-chloro3-indolyphosphat/ Nitro blue tetrazolium), Sigma fast BCIP/ NBT B 5655 zur Bestimmung des NIS
- PBS Biowhittaker, phosphate buffered saline without Ca and Mg 1x, No. 0019, Cambrex, USA
- Pioglitazon, M 683-056, Takeda Chemical Industries
- P-Jodphenol, 1,020-1, Aldrich
- Ponceau S 0,5% (Anfärbung der Blotmembran), 33429, Serva
- Probenpuffer für SDS-PAGE: 62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8], 4% SDS (Sodium dodecyl sulphate), 10% Glycerol, 10% Dithiothreitol (als Ersatz von 2-Mercaptoethanol, das in der gleichen Konzentration eingesetzt wurde), 0,01% Bromphenolblau
- Propanol, 1.09634.2511; Merck
- Retinoic acid all trans, R-2625, Sigma
- Retinol, Sigma
- Rosiglitazon, GlaxoSmithKline Pharma
- Sammelgelpuffer für SDS-PAGE (0,5 M Tris Base [pH 6,8]: 6,1 g Trizma Base in ca. 50 ml lösen und mit 2,8 ml HCl 32% auf pH 6,8 einstellen, mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen
- SDS 10% (Natriumlaurylsulfat, 4360.1; Roth
- Staurosporin, 1055682, Roche Diagnostics
- Temed, T-9281; Sigma
- Trenngelpuffer für SDS-PAGE (1,5 M Tris Base [pH 8,8]): 18,2 g Trizma-Base in ca. 50 ml lösen und mit ca. 2,8 ml HCl 32% auf pH 8,8 einstellen, mit Aqua bidest auf 100 ml auffüllen
- TRIS 0,25 M, 4855, Roth

- Tris-buffered saline (TBS) (20 mM Tris, 0,9% NaCl, pH 8,0), 4855.1, Roth
- Trizma Base, 4855; Roth
- Troglitazon, Calbiochem
- Trypsin-EDTA (10x), Cat. 15400-054, Invitrogen Corporation
- TWEEN, 37470, Serva
- Valproic acid sodium salt, P 4543, Sigma
- Zweitantikörper
 - NIS, PDS1, Thyreoglobulin: Goat, anti-rabbit IgG-HRP (1:5000), sc-2004, Santa Cruz biotechnology

3. Methoden

3.1 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte mittels des Gerätes Casy® Model TTC (Schärfe Systeme/Reutlingen). Das System beruht auf dem Prinzip der Widerstandsmessung kombiniert mit der Technik der elektronischen Pulsflächenanalyse. Für die Messung werden 10 µl hochkonzentrierte Zelllösung, z.B. resuspendiertes Zellpellet, in 10 ml Casyton®, eine Verdünnungslösung für Zellkulturen, pipettiert.

Die Zellzählung wurde nicht nur zur Feststellung der benötigten Zellzahl pro Kultur, sondern auch für den Vergleich des Zellwachstums unter verschiedenen Bedingungen benutzt.

3.2 Herstellung von Kulturen maligner Thyreozyten

Die bei den Versuchen verwendete Zelllinie, ONCO-DG 1, entstammt einer 49-jährigen Frau mit gut differenziertem, azidophilen, papillären Schilddrüsenkarzinom.

Zu 500 ml Medium RPMI 1640 mit L-Glutamin wurde vor Gebrauch 55 ml fetales Kälberserum zugesetzt. Davon wurden dann 20 ml in eine 162cm² Flasche gegeben, in der die Zellen zur Vermehrung kultiviert wurden.

Das Kulturmedium besteht aus einem Gemisch aus Kohlenhydraten⁶, Aminosäuren⁷, anorganischen Salzen⁸ und Vitaminen⁹ (Katalysatoren) und basiert auf einem Hydrogencarbonat-Puffersystem. Damit ein Übersättigen des Mediums mit H⁺-Ionen bemerkt werden kann, ist Phenolrot als Indikator zugesetzt. Außerdem ist zusätzlich L-Glutamin dem Medium hinzugefügt.

⁶ Insbesondere Glukose, welche als Energiequelle für die Biosynthese dient.

⁷ Aminosäuren werden zur Proteinsynthese benötigt

⁸ Anorganische Salze, wie Kalzium, Kalium, Magnesium, Natrium, Phosphate, Chloride, Sulfate, Bikarbonate, sind nicht nur für das Zellwachstum von Nöten, sondern auch für das Aufrechterhalten des osmotischen Drucks der Zellmembran

⁹ diese wirken als Katalysatoren für metabolische Vorgänge

Das fetale Kälberserum enthält weitere für das Zellwachstum und die Proliferation benötigte Substanzen wie zum Beispiel PDGF, Insulin, Cortisol, Schilddrüsenhormone. Bevor das fetale Kälberserum verwendet wird, sollte bei 56°C das Komplement inaktiviert werden.

Um die intakten, sich am Boden des Kulturgefäßes verankerten Zellen wieder ab zu lösen, wird Trypsin-EDTA eingesetzt. Trypsin ist eine Endopeptidase und spaltet insbesondere die extrazellulären Adhäsionsproteine der Thyreozyten. Vor der Verwendung von Trypsin muss das alte Kulturmedium dekantiert und das Gefäß mitsamt der festhaftenden Zellen mit 10 ml PBS gewaschen werden. Nach dem Waschvorgang wird 1 ml Trypsin-EDTA (10x) in die Kulturflasche gegeben und 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen lösen sich jetzt innerhalb von 10 Minuten vom Boden ab. Damit das Trypsin nicht zu lange auf die Zellen einwirken kann, wird, sobald ein Ablösen sichtbar ist, 10 ml Kulturmedium hinzu gegeben. Dadurch wird das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wird abpipettiert und in 50 ml Falconröhrchen gesammelt und daraufhin 7 Minuten bei 4°C und 120 g abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wird dekantiert und das übrig gebliebene Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert.

Um die Zellzählung durchzuführen werden von dieser Zellsuspension 20 µl in 10 ml Casyton® gegeben und die Zählung wie in 3.1 beschrieben durchgeführt.

3.3 Kulturbedingungen für die verwendeten Zellkulturen

Für ein optimales Zellwachstum werden die Zellkulturflaschen im Brutschrank (Heraeus) unter Lichtabschluss bei 37° C mit 95% Luft und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre begast. Die Zellen können bei diesen Bedingungen stetig weiter wachsen, solange sie ausreichend Nährmittel und Ausbreitungsmöglichkeiten haben.

3.4 Passagierung der Zellkulturen

Das Passagieren (Splitten) wird erforderlich, um auch den nachgewachsenen Zellen die Möglichkeit zu geben, sich am Gefäßboden zu verankern. Durch Verhinderung der Kontaktinhibition wird ein stetiges Wachstum garantiert. Dafür werden die Zellen wie in 3.2 beschrieben abtrypsinisiert, die Zellsuspension in einem Becherglas gesammelt und auf zusätzliche Kulturflaschen verteilt. Werden bei einem Versuchsansatz Zellen verbraucht, so können auch die restlichen Zellen, die nicht für den Ansatz benötigt wurden, auf weitere Kulturflaschen verteilt und somit passagiert werden.

3.5 Stimulation der Zellkulturen

Für die Versuchsansätze wurden die Zellen wie in 3.2 beschrieben abtrypsinisiert und einer Zellzählung unterzogen. Die aus den Kulturflaschen entnommene Lösung mit Zellen ist allerdings so hochkonzentriert an Zellen, dass sie erst mit Medium verdünnt werden muss, um geeignete Zellsuspensionen für die Weiterverarbeitung zu erhalten. Diese Suspensionen wurden mit verschiedenen Substanzen versehen, die auszutesten waren. Die auf gewünschte Zellzahl entsprechend eingestellten Suspensionen wurden dann in die well-Platten ausgesät. Eingesetzt wurden bei einer 48-well-Platte 200 µl Zellsuspension mit jeweils ca. 0,130 Millionen Zellen pro well und bei der 96-well-Platte 100µl Zelllösung mit 0,065 Millionen Zellen pro well.

An den Thyreozyten wurden folgende Substanzen in den angegebenen Konzentrationen getestet:

- **Retinol:** 13 µM; 6,5 µM; 3,2 µM und 1,6 µM.

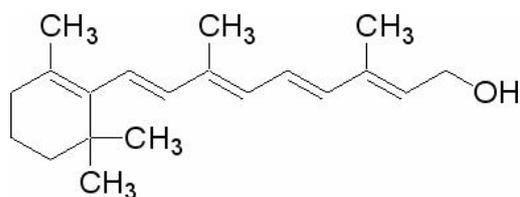


Abbildung 1: Retinol

- **all-trans-Retinsäure:** 2 μM ; 1 μM und 0,5 μM .

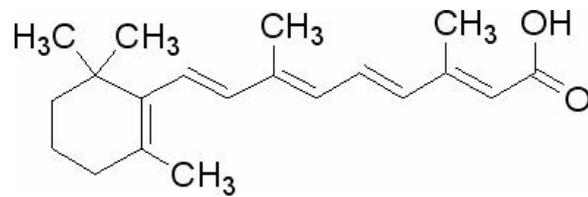


Abbildung 2: all-trans-Retinsäure

- **9-cis-Retinsäure:** 2 μM ; 1 μM und 0,5 μM .

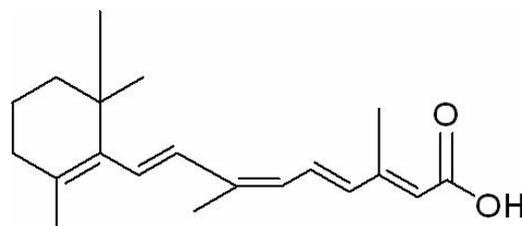


Abbildung 3: 9-cis-Retinsäure

- **Troglitazon:** 10 μM , 5 μM und 2,5 μM .

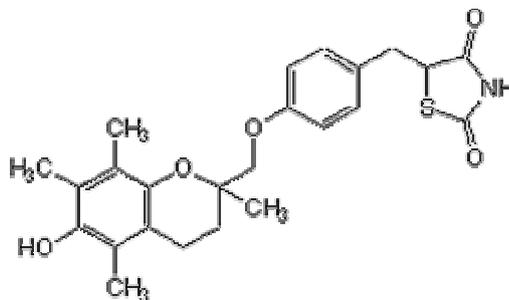


Abbildung 4: Troglitazon

- **Rosiglitazon:** 10 μM und 20 μM .

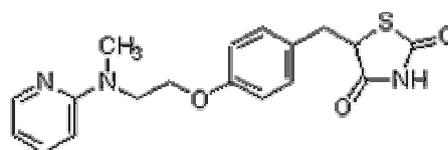


Abbildung 5: Rosiglitazon

- **Pioglitazon:** 10 μ M und 20 μ M.

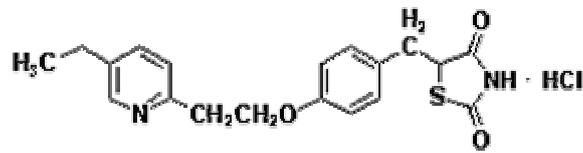


Abbildung 6: Pioglitazon

- **Apicidin:** 500 nm, 200 nm, 100 nM, 15 nM und 10 nM .

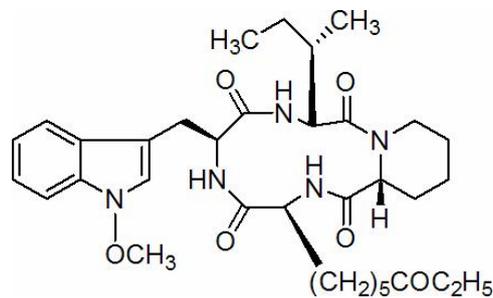


Abbildung 7: Apicidin

- **APHA:** 20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 1 μ M und 0,5 μ M.



Abbildung 8: APHA

- **Valproinsäure:** 3 mM, 1 mM und 0,5 mM.

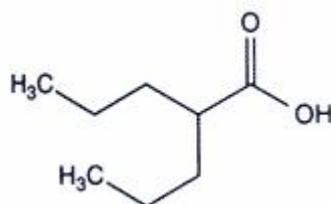


Abbildung 9: Valproinsäure

- **5-Aza-2-Deoxycytidin:** 10 μM ; 5 μM ; 1 μM und 0,5 μM .

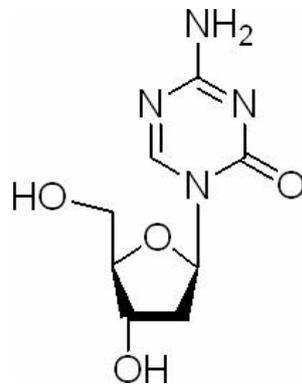


Abbildung 10: 5-Aza-2-Deoxycytidin

- **Mevinolin:** 100 μM ; 50 μM ; 37 μM ; 25 μM und 12 μM .

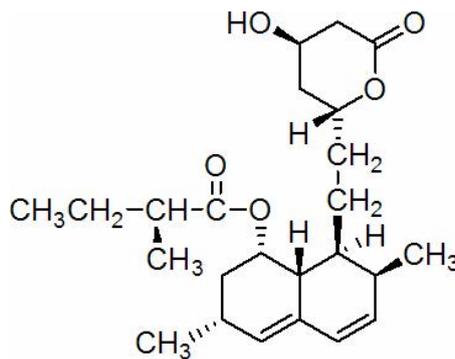


Abbildung 11: Mevinolin

- **Arsentrioxid (As_2O_3):** 2 μM .
- **Akt-Inhibitor A/ 1L6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-*sn*-glycerocarbonate:** 2 μM , 5 μM und 10 μM . Bei einem weiteren Versuchsansatz wurde den bei der Zellaussaat mit Akt-Inhibitor behandelten Zellen 2 Stunden später noch 10 μl Arsentrioxid mit der Endkonzentration 2 μM zugefügt.

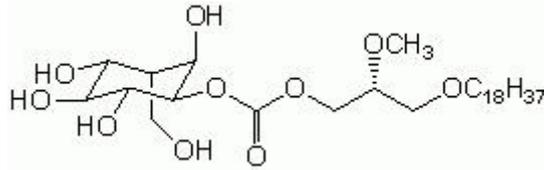


Abbildung 12: Akt-Inhibitor (1L6-Hydroxymethyl-chiro-inositol-2-(R)-2-O-methyl-3-O-octadecyl-*sn*-glycerocarbonate)

- **Akt-Inhibitor B (Triciribin/ Akt-Inhibitor V):** 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM und 20 μM . Bei einem Teil der Untersuchungen wurde den bei der Zellaussaat mit Triciribin behandelten Zellen 2 Stunden nach Kulturbeginn noch Arsentrioxid mit der Endkonzentration von 2 μM hinzu gegeben.

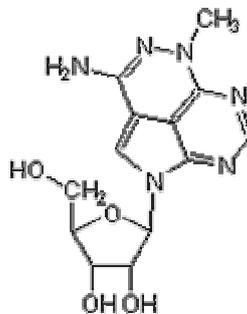


Abbildung 13: Triciribin

Die Versuche zur ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten wurden in 48-well-Platten durchgeführt. Pro well wurden 10 μl ^{125}I iodid (4kBq) eingesetzt. Die Versuche zur ^3H -Thymidinaufnahme wurden in 96-well Platten durchgeführt. Pro well wurden 10 μl ^3H -Thymidin (6 kBq) eingesetzt. Die Radioaktivität wurde jeweils zu Beginn der Kultur dem Medium zugegeben.

3.6 Zellernte

- Vorbereitungen für die Messung des ^{125}I -Iodideinbaus

Nach Ablauf definierter Inkubationszeiten wurden die Zellen geerntet. Mittels Zellharvester wurden die Thyreozyten auf ein Filterpapier gesaugt und die ausgestanzten Filterpapierstücke in für die Zellzählung geeigneten Gefäße gegeben.

- Vorbereitung für die Messung des ^3H -Thymidineinbaus

Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen bei -20°C eingefroren. Beim Einfrieren und Auftauen wird der Zellkern und die Zellmembran zerstört und die DNA freigelegt. Im Zytoplasma gelöstes ^3H -Thymidin wird dadurch aus der Zelle freigesetzt und beim Filtrieren entfernt. Die entstandenen Zellfragmente und die freigelegte DNA wurden mittels Zellharvester auf einem Filterpapier (90 x 120 mm) gesammelt und dieses in eine Plastiktüte derselben Größe gegeben. Hinzu kamen noch 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Betaplate Scint, Perkin Elmeri life science). Die Plastiktüte wurde dann zugeschweißt. Die eingetüteten Filterpapiere wurden in eine Kassette gelegt und die Radioaktivität im - Counter (Microbeta-Trilux) gemessen.

3.7 Messung der Radioaktivität

- Messung von ^{125}I -Iodid

Die Radioaktivität des in die Thyreozyten aufgenommene ^{125}I -Iodid wurde im Gamma-Counter Wizard 3% von Wallac gemessen. Die mit dem zellbeladenem Filterpapier bestückten Plastikröhrchen wurden eine Minute gemessen.

- Messung von ^3H -Thymidin

Während der Replikationsphase (S-Phase) des Zellzyklus wird Thymidin als Nukleosidbaustein in den DNA-Strang eingebaut. Gemessen wurde die Radioaktivität (cmp-Modus) durch mehrere Detektoren des Microbeta Trilux von Wallac, die sich über der Kassette bewegen. Die Thymidinaufnahme in die DNA ist eine Voraussetzung für die Fähigkeit der Zellen zu proliferieren

3.8 Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin mittels Westenblot

3.8.1 Proteinbestimmung

Bei den einzelnen Versuchsansätzen wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt. Diese diente neben der Zellzahl als Bezugsgröße.

Die Proteinbestimmung wurde mit der von Bradford 1976 entwickelten Methode durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine. Im sauren Milieu bewirkt der gebundene Farbstoff eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm nach 595 nm. Verwendet wurde hierzu der Protein-Assay von BioRad und eine Rinderserumalbumin (BSA)-Stammlösung, mit der eine Standardreihe von 0 bis 12 µg Protein pro ml hergestellt wurde.

Um im Rahmen des Westernblots Probenmaterial mit definiertem Proteingehalt zu gewinnen, mussten kultivierte Thyreozyten wie unter 3.2 beschrieben abgetrypsiniert und gezählt werden. Dann wurden sie in 50 cm²-Kulturflaschen mit dem jeweiligen Stimulanzium ausgesät und 24 bis 48 Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst, in Zentrifugenröhrchen gesammelt und 7 Minuten bei 4°C und 120 g abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert und dann eine Zellzählung wie in 3.1 beschrieben durchgeführt. Danach wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet nur in ungefähr 1 ml PBS resuspendiert. Die Lösung mit den suspendierten Zellen wurde in ein Eppendorfröhrchen überführt und 10 Minuten bei 4°C und 16 000 U/min abzentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wird abdekantiert und die Eppendorfröhrchen für 2 bis 3 Minuten über Kopf auf ein saugfähiges Tuch gestellt. Danach wurde das Zellpellet bei -80°C eingefroren und bei Bedarf für die Proteinbestimmung vorbereitet.

3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Ziel der Gelelektrophorese ist es, Proteine auf Grund ihres Molekulargewichts zu trennen. Dafür wird ein Gel benötigt, welches mittels Siebfunktion die unterschiedlichen Moleküle entsprechend ihrer Größe sortiert. Es besteht aus zwei verschiedenen Gelarten, dem Sammelgel 5% und dem Trenngel 7% für NIS und 12,5% für Pendrin. Diese beiden Gele bestehen aus einer Basis von 40% Bis-Acrylamid und SDS.

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-bis-Lösung 40%	3,13 ml	1,25 ml
Trenngelpuffer	10 ml	-
Sammelgelpuffer	-	10 ml
Destilliertes H ₂ O	4,27 ml	6,15 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
Temed	15 µl	15 µl
APS 10%	30 µl	30 µl

Tab. 2: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Als Sammelgelpuffer wurde eine auf pH 6,8 eingestellte Lösung aus 0,5 M Trismabase und Salzsäure hergestellt. Für den Trenngelpuffer wurde 1,5 M Trismabase verwendet und ebenfalls mit Salzsäure auf einen pH von 8,8 eingestellt. Sowohl bei der Trenngel- als auch bei der Sammelgelherstellung wurde APS und Temed als letztes hinzugefügt, da sie als Starter der Polymerisation fungieren. Als erstes wurde das Trenngel hergestellt, in den Gelgießstand eingefüllt und eine dünne Schicht Ethanol darüber pipettiert, diese bewirkte einen geraden Abschluss zum vertikal darüberliegendem Sammelgel und wurde nach der Polymerisation entfernt. Danach wurde das letzte Viertel der Gelgießkammer mit Sammelgel aufgefüllt und ein Kamm, der Taschen für die Proteinproben im Sammelgel erzeugt, eingefügt. Auf Grund des geringen Vernetzungsgrades des Sammelgels wandern die Proteine hier schneller hindurch und werden an

der Grenze zum Trenngel aufgehalten und zusammengeschoben. Dies bewirkt eine verbesserte Auflösung. Diese Art der Proteinauftrennung wird auch als diskontinuierliche Gelelektrophorese bezeichnet.

In die Taschen des Sammelgels wurden jeweils 30 µg Protein von den zu analysierenden Proben mittels Pipetten gegeben und eine Tasche des Gels mit einem High-Molecular-Weight-Längenmarker befüllt. Dieser enthielt die Proteine Myosin, Alpha Makroglobulin, Beta Galactosidase, Transferrin, Glutamic Dehydrogenase. Myosin hat ein Molekulargewicht von 212 000 Dalton und ist damit dem Molekulargewicht von monomerem Thyreoglobulin (300 000-330 000 Dalton) ähnlich. Der Natrium-Iod-Symporter hat ein Molekulargewicht von 80 000-90 000 Dalton und liegt damit dem Molekulargewicht von Transferrin (76 000 Dalton) sehr nahe. Alle aufzutragenden Proteine (Proben) müssen allerdings vor dem Auftrag mit Probenpuffer nach Laemmli (siehe 2.4) vermischt werden. Die im Probenpuffer gelösten Proben werden bei 95°C ungefähr 5 Minuten erhitzt. Die Aufgabe von Probenpuffer und Erhitzung besteht in der Denaturierung und Dissoziation der Proteine der Probe. Des Weiteren wird durch die Einfärbung der gelösten Proteine mit Coomassie-blau ein rechtzeitiges Stoppen der Elektrophorese zum Zeitpunkt des kompletten Geldurchlaufs aller Proteine ermöglicht. Die Rolle der negativ geladenen Sulfatgruppen im SDS ist die Nivellierung der positiven Ladungen der Proteine. Je größer das Molekül, desto mehr SDS-Moleküle lagern sich an und desto negativer wird der Komplex. Alle Moleküle bekommen das gleiche Verhältnis von Ladung zu Masse und damit die gleiche Mobilität, welche sie in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe und nicht ihrer Ladung wandern lässt.

Nachdem die Proben aufgetragen wurden, wurden die Gelplatten vertikal in die Elektrophoreseapparatur gestellt und diese mit Laufpuffer aufgefüllt. Der Laufpuffer (siehe 2.4) soll während der Elektrophorese den pH-Wert konstant halten. Es wurde eine Spannung von 80 Volt für ca. 120 Minuten an den Elektrophoreseapparat gelegt. Die negativ geladenen Moleküle wanderten zunächst von der Auftragsstelle (Minus-Pol) durch das Sammelgel und dann durch das Trenngel zur positiv geladenen Anode nach unten .

3.8.3 Transfer von Proteinen auf Blotmembran mittels Westernblot-Methode

Die in den Gelen aufgetrennten Proteine besitzen immer noch die Fähigkeit aus dem Elektrophorese-Gel zu diffundieren. Aus diesem Grund werden sie auf eine PVDF-Membran (0,45 μ M/Immobilion P®, Millipore) übertragen auf der sie durch hydrophobe Wechselwirkung und Wasserstoffbrücken ruhig gestellt werden und renaturieren. Das durch die elektrophoretische Auftrennung erhaltene Muster wird dabei beibehalten. Dies ist für den immunhistochemischen Nachweis von NIS, Pendrin und Thyreoglobulin notwendig.

Um die Gele auf die Membran zu übertragen, wurden sie in einem mit Blotpuffer (siehe 2.4) gefüllten Tablett aus den Glasträgern entfernt. Dabei war darauf zu achten, das Gel nicht zu drehen, um Verwechslungen der Proben zu vermeiden. Derweilen wurde die Blotmembran für 15 Sekunden in 100%iges Methanol und dann ebenfalls in Blotpuffer gelegt. Dann erfolgte der Aufbau eines so genannte *sBlotsandwich* wie in Abb. 14 dargestellt. Es wurde bei einer Spannung von 80 mA pro Stunde ungefähr 120 Minuten geblottet (VEP-2 Bandit, Mini Tank Electroblotting System).

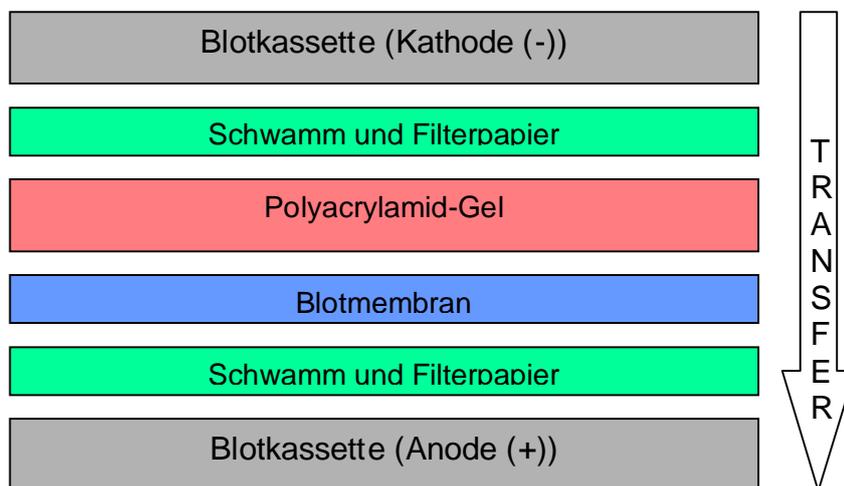


Abbildung 14

Danach wurden das Gel und die Membran entnommen und angefärbt. Für die Färbung des Gels wurde Millipore Coomassie Brilliant Blue R (siehe 2.4) verwendet, welches die noch im Gel befindlichen Proteine denaturierte, fixierte und

sichtbar machte. Die Membran wurde mit einem Gemisch aus Ponceau-S Rot (0,5%), Essigsäure (1%) und Wasser gefärbt. Durch die wasserlösliche Eigenschaft von Ponceau-S Rot war eine ungehinderte Reaktion mit den Antikörpern nach Entfärben der Membran mittels Wasser möglich.

3.8.4 Immunreaktion

Um eine besonders gute Immunreaktion zu erzielen, muss die zuvor in Methanol getränkte Blotmembran für 3 Stunden bei Raumtemperatur in 5% Lactalbumin vorinkubiert werden. Hierbei werden die freien Bindestellen der Membran blockiert und somit für Antikörper unzugänglich gemacht. Dies ist notwendig, damit bei der späteren Anfärbung nur Antikörper sichtbar gemacht werden, welche an den entsprechenden Proteinen gebunden sind. Wären die Bindestellen der Membran nicht blockiert, würden diese ebenfalls angefärbt und somit das Ergebnis verfälschen.

Nach der Vorinkubation wurde die Membran mit TBS-Puffer, der mit 0,1% Tween versetzt wurde, 3mal jeweils 15 Minuten gewaschen, bevor sie mit dem Erstantikörper in entsprechender Verdünnung über Nacht bei 8°C auf einem Schüttler inkubiert wurde. Hierbei wurde für den NIS-Nachweis der NIS-4-Antikörper und für den Pendrinachweis der PDS-1-Antikörper (Verdünnung 1:1000 in TBS) verwendet. Am nächsten Morgen wurde die Membran wieder 3mal 5 Minuten mit TBS/Tween gewaschen, um die verbleibenden ungebundenen Antikörper zu entfernen. Nun erfolgte die Inkubation mit dem zweiten mit Horseradish-Peroxidase-(HPR)-konjugierten Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Es ist ein Goat-Anti-Rabbit IgG-Antikörper (Detektionsantikörper/Verdünnung: 1:10000) benutzt. Dieser bindet an den ersten Antikörper und ist für die Visualisierung notwendig.

Erneut muss die Membran gewaschen und danach für 3-5 Minuten im Dunkeln in die ECL-Lösung gelegt werden. Mit Hilfe des sEnhanced Chemiluminescence%Verfahrens (ECL) der Firma Amersham Pharmacia Biotech wurde der Blot entwickelt. Hierbei wird aus Luminol 3-Aminophthalsäure, was mit einer Licht-

emission einhergeht. Die Blots wurden visualisiert und dokumentiert mit dem Image Reader LAS-3000 (Fuji Photo Film) und dem Advanced Image Data Analyser Version 3.4.

3.9 Immunzytochemischer Nachweis von NIS und Pendrin unter verschiedenen Differenzierungssubstanzen

Hierfür wurden 10 ml Zellsuspension mit circa 6,6 Millionen Thyreozyten und der jeweiligen Differenzierungssubstanz in 75 cm² Kulturflaschen für 24 und 48 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen abtrypsiniert, eine Zellzählung wie in 3.1 beschrieben durchgeführt und die Zellzahl auf 9 Millionen Zellen pro Milliliter vorbereitet. Es wurden 5 Objektträger pro Redifferenzierungssubstanz bereitgestellt. Zwei für die Darstellung der Proteine NIS und Pendrin, ein weiterer für die HE-Färbung und zwei weitere dienten als Ersatz. Jeder Objektträger wurde mit 50 µl Zellsuspension beträufelt und die Zellen wie bei einem Blutausstrichs ausgestrichen. Danach wurden die Objektträger bei 37°C für eine Stunde im Trockenschrank getrocknet. Sobald der Zellausstrich trocken war, wurden die Objektträger für 10 Minuten in 4% Paraformaldehyd gelegt und die Zellen fixiert. Die Objektträger wurden nun für weitere 10 Minuten in das Hottel'sche Gemisch gestellt und dann erneut getrocknet.

Der Nachweis von NIS und Pendrin erfolgt durch folgendes immunzytochemisches Prinzip:

- Bindung des Erstantikörpers an das Antigen (eingesetzte Verdünnung: Antikörper NIS-3: 1:200; Antikörper PDS-1: 1:150; 160 µl/Objektträger)
- Bindung des biotinylierten Zweitantikörper (Detektionsantikörper) an den Erstantikörper (Verdünnung: 1:100)
- Bindung von enzymmarkiertem Streptavidin (Verdünnung: 1:150 in PBS) an das Biotin des Zweitantikörpers
- Sichtbar machen des fixierten Enzyms mittels Chromogen-Substratlösung

3.10 Facsanalyse (Durchflusszytometrie)

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

Von den malignen humanen Thyreozyten wurden jeweils 100 µl aus einer Zellsuspension mit 500 000 Zellen pro ml in ein Kulturloch einer 96-well-Platten ausgesät. Während der Aussaat wurden entweder die zu testenden Redifferenzierungssubstanzen oder die Zellgifte Staurosporin oder H₂O₂ hinzu gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeiten von 24 und 48 Stunden wurden die Zellen in den Kulturschalen zentrifugiert (7 min, 4°C, 300 g). Anschließend wurden die Überstände dekantiert, die Zellen in 500 µl PBS-Puffer resuspendiert und in ein Facsröhrchen überführt. Nach weiterem Zentrifugieren, Dekantieren und Resuspendieren wurden die Thyreozyten mit einem hypotonen Puffer (Propidiumiodid (PI), 50µg/ml zusammen mit 0,1%igem Natrium-Zitrat und 0,1%igem TritonX-100 in destilliertem Wasser gelöst) lysiert und die Zellkerne sofort mit der Durchflusszytometrie analysiert. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid lagert sich in die DNA des Zellkerns ein. Die Analyse wurde mit dem Facs-Gerät (Modell: sFACS Calibur% Becton Dickson, Software: cellquest) durchgeführt.

Das Messprinzip der FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) beruht auf der Methode der hydrodynamischen Fokussierung. Hierbei werden die mit PI angefärbten Zellproben in Form einer Suspension in die Trägerflüssigkeit eingebracht, welche kontinuierlich an einer Lichtquelle vorbeifließt. Durch die höhere Strömungsgeschwindigkeit der Trägerflüssigkeit können die Zellen oder isolierte Zellkerne einzeln und in einer fixen Position am Laserlicht vorbeigeführt werden. Die PI-positiven Zellkerne werden durch Argon-Laserlicht (488 nm) angeregt, das Propidiumiodid emittiert dabei Fluoreszenzlicht (625 nm), welches von mehreren Photozellen aufgefangen werden kann. Zellkerne mit DNA-Fragmentierung (hypodiploider DNA) wurden als apoptotisch betrachtet und konnten gut von Kernen mit normalem (diploidem) DNA-Gehalt unterschieden werden. Des Weiteren ist eine Differenzierung zu primär nekrotischen Zellen möglich.

Für apoptotische Zellen charakteristisch ist sowohl eine Abnahme des DNA-, wie auch des Proteingehalts. Bei nekrotischen Zellen hingegen kommt es zwar zu einem reduzierten Proteingehalt, allerdings ist der DNA-Gehalt zunächst nicht stark verändert. Daraus resultiert ein höheres DNA-/Proteinverhältnis der nekrotischen Zellen. Durch Einfärben von DNA und RNA ist es möglich G₁- und G₀-Phasen-Zellen zu unterscheiden. Da bei nekrotischen Zellen der RNA-Gehalt minimal ist, können diese Zellen von lebenden und apoptotischen getrennt werden. Ausschließlich sekundäre Nekrosen, welchen eine Apoptose vorausgeht, sind nicht mit der Nicoletti-Methode zu erfassen.

3.11 Mykoplasmennachweis

Bei den vorliegenden Zellkulturen besteht die Möglichkeit einer Kontamination mit Mykoplasmen (Mollicutes). Es handelt sich hierbei um die kleinsten, selbstständig vermehrungsfähigen Bakterien, die die Möglichkeit besitzen Thymidin aufzunehmen. Wenn diese mitgemessen würden, könnten die Ergebnisse des Thymidineinbaus in die Thyreozyten fälschlicherweise erhöht ausfallen. Allerdings besitzen die Mykoplasmen eine durchschnittliche Größe von 0,8 µM und der verwendete Glasfaserfilter eine Porengröße von 1,5 µM. Aus diesem Grund dürften sie ungehindert die Poren des Filters passieren und somit die Messung nicht beeinflussen. Dennoch wurden die Proben mittels Myco Alert Mycoplasma Detection Kit (Cambrex, USA) überprüft.

Die lebenden Mykoplasmen werden im Zuge des Testes lysiert und ihre Enzyme freigesetzt. Diese reagieren mit dem Myco Alert Substrat, welches ADP zu ATP katalysiert. Die ATP-Konzentration wird sowohl vor und als auch nach Zufügen des Myco Alert Substrats gemessen. Falls das zweite Ergebnis erhöht ausfällt, kann eine Mykoplasmen-Kontamination angenommen werden.

3.12 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit dem Dunnett Test, welcher multiple Vergleiche mit den Durchschnittswerten einer Versuchsgruppe ermöglicht. Die Wahrscheinlich-

keit einer falschen Interpretation liegt nach Dunnett bei diesem Verfahren unter 5%. Hierbei werden alle Ergebnisse als signifikant bewertet, wenn $p < 0,05$ und die Werte positiv sind. Der herkömmliche t-Test hingegen ist nicht annähernd so signifikant.

Die Statistik ist im Anhang aufgeführt. Des Weiteren finden sich dort Abbildungen, in denen die Einbauraten von ^{125}I -Iodid und ^3H -Thymidin aller Inkubationszeiten gemittelt wurden.

Für die Durchführung wurde das Statistikprogramm JMP5 und SAS eingesetzt. Für die statistische Beratung danke ich Frau Dr. Tina Herberts, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

4. Ergebnisse

4.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Redifferenzierungssubstanzen

Maligne menschliche Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 wurden mit verschiedenen Redifferenzierungssubstanzen während der Aussaat stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten Thyreozyten, die nur mit dem Lösungsmittel für die jeweilige Redifferenzierungssubstanz versehen wurden, so wie Zellen ohne jegliche Stimulation.

Die Iodaufnahme in die Schilddrüsenzellen wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen und die Ergebnisse mit den Kontrollen verglichen. Zusätzlich wurde ein Vergleich zwischen den eingesetzten Konzentrationen angestrebt. Die Ergebnisse wurden an der gleichen Zelllinie erhoben und in den Abbildungen 16-33 dargestellt.

4.1.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter Retinol

Die kultivierten Thyreozyten in Abb. 15 wurden mit Retinol (Vitamin A) oder mit Methanol (Lösungsmittel für Retinol) stimuliert und die Iodidaufnahme in die Schilddrüsenzellen gemessen.

Dabei wurde nur nach 24 Stunden bei den Konzentrationen 13 µM, 6,5 µM, 3,25 µM und 1,6 µM eine signifikante Steigerung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme gemessen.

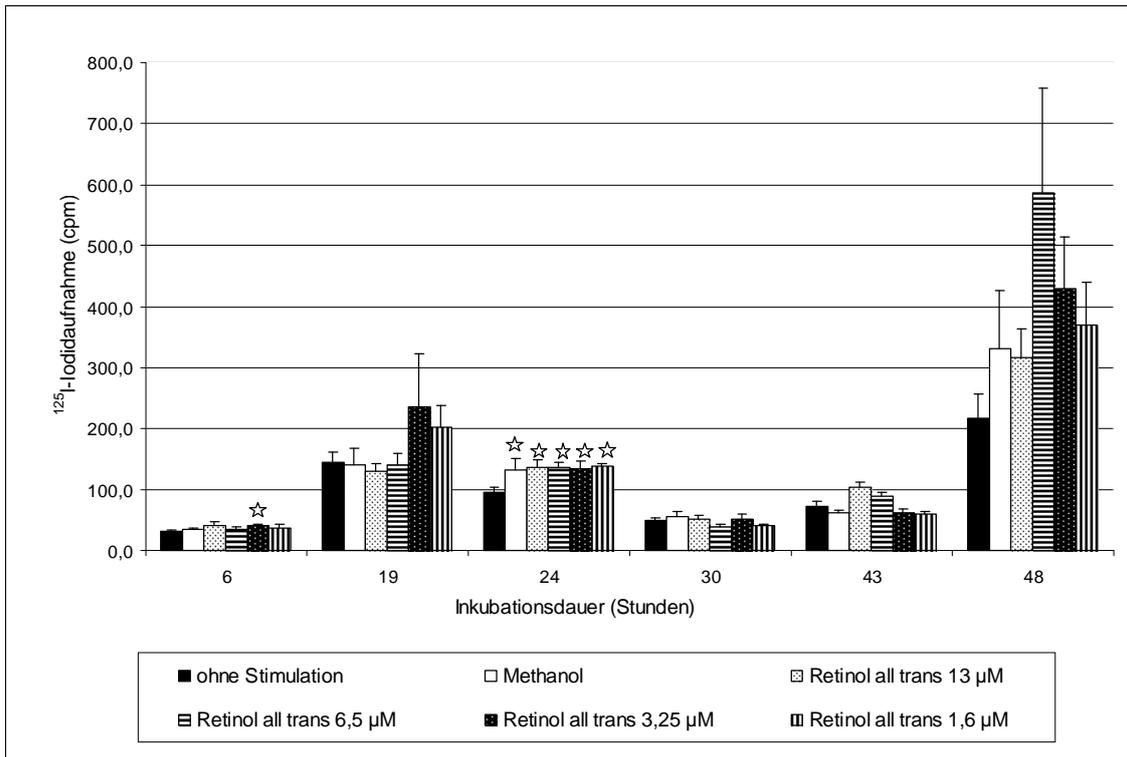


Abbildung 15: Einfluss von Retinol (13; 6,5; 3,25; 1,6 μM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 4 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.2 ^{125}I -Iodidaufnahme unter all-trans-Retinsäure

Die Thyreozyten in Abb. 16 wurden mit all-trans-Retinsäure stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen ohne jegliche Zusätze wie auch mit Methanol stimulierte Schilddrüsenzellen ausgesät. Die Zellen wurden nach verschiedenen Zeiten geerntet und ihre Iodidaufnahme gemessen. Nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden ist eine signifikante Erhöhung der ^{125}I -Iodidaufnahme unter allen all-trans-Retinsäurekonzentrationen im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Besonders hervorzuheben ist allerdings die Konzentration 0,5 μM . Hierbei kam es nicht nur zu einer signifikanten Steigerung der Iodidaufnahme nach 24, sondern auch nach 30 und 48 Stunden.

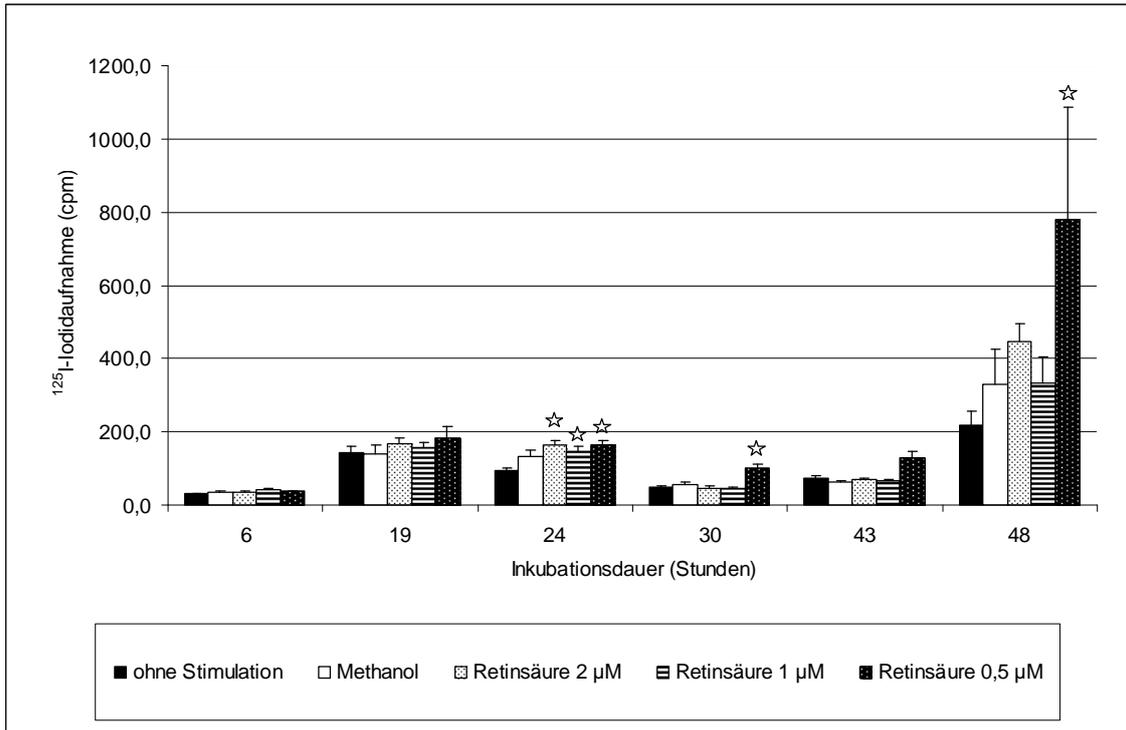


Abbildung 16: Einfluss von all-trans-Retinsäure (2; 1 und 0,5 µM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 5 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.3 ^{125}I -Iodidaufnahme unter 9-cis-Retinsäure

Die Thyreozyten in Abb. 17 wurden mit 9-cis-Retinsäure stimuliert und die ^{125}I -Iodidaufnahme gemessen. Die Abb. 17 zeigt, dass bei fast allen eingesetzten Konzentrationen und zu fast allen Zeiten ein signifikanter Anstieg der Iodidaufnahme zur Kontrolle besteht. Ausnahmen sind allerdings nach 6 Stunden die Konzentrationen 2 und 0,5 µM und nach 19 Stunden ebenfalls die Konzentration 2 µM.

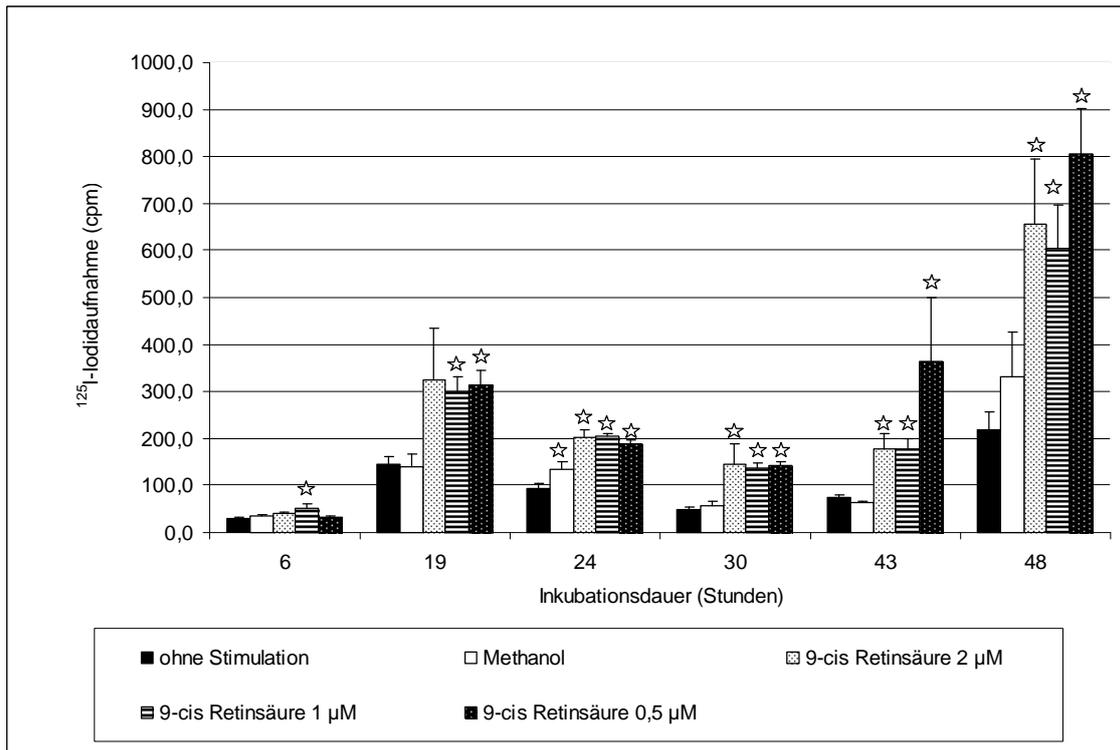


Abbildung 17: Einfluss von 9-cis-Retinsäure (2; 1 und 0,5 μM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 6 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.4 ^{125}I -Iodidaufnahme unter 5-Aza-deoxycytidin

Die malignen Schilddrüsenzellen wurden in Abb. 18 mit 5-Aza-deoxycytidin stimuliert. Als Kontrollen dienten unstimulierte Thyreozyten wie auch Thyreozyten stimuliert mit DMSO (Lösungsmittel von 5-Aza-deoxycytidin). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde zu verschiedenen Zeiten gemessen. Wie die Abbildung zeigt, kam es nach 43 Stunden im Vergleich zu den unstimulierten Zellen zu einer signifikant niedrigeren Iodidaufnahme unter 10 μM 5-Aza-deoxycytidin. Ganz analoge Ergebnisse fanden sich auch unter 5 μM nach 24 Stunden und unter 0,5 μM nach 30 Stunden Inkubationsdauer. Die übrigen Unterschiede waren nicht signifikant.

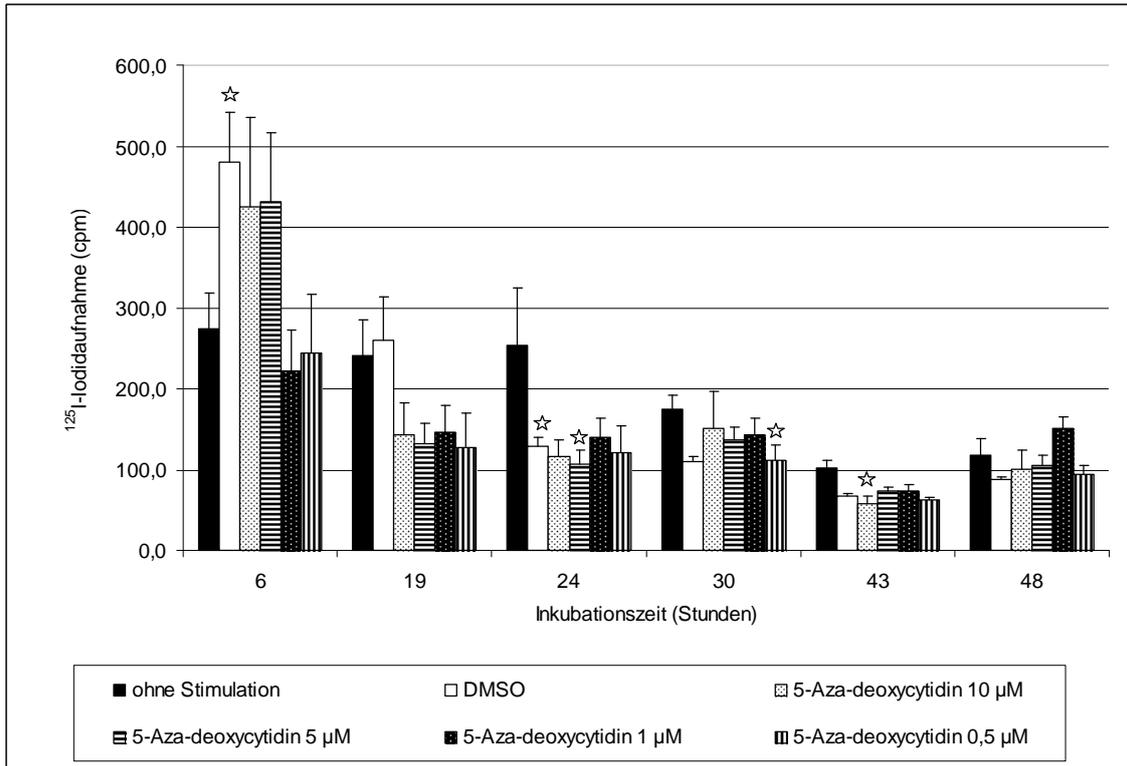


Abbildung 18: Einfluss von 5-Aza-deoxycytidin (10; 5; 1 und 0,5 µM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 7 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.5 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Mevinolin

Die Thyreozyten in Abb. 19 wurden mit Mevinolin stimuliert. Als Kontrollgruppen dienten Thyreozyten ohne Stimulation und mit Ethanol (Lösungsmittel von Mevinolin) stimulierte. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach verschiedenen Zeiten gemessen. Wie die Abbildung zeigt, kam es bei allen Konzentrationen kam es bei den Inkubationszeiten 6, 19 und 24 Stunden zu einem signifikanten Rückgang der Iodidaufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Nach 30 Stunden findet sich ein signifikant negativer Wert nur bei der Endkonzentration 100 µM. Nach 48 Stunden leichter, nicht-signifikanter Anstieg zwischen 12 µM und 50 µM.

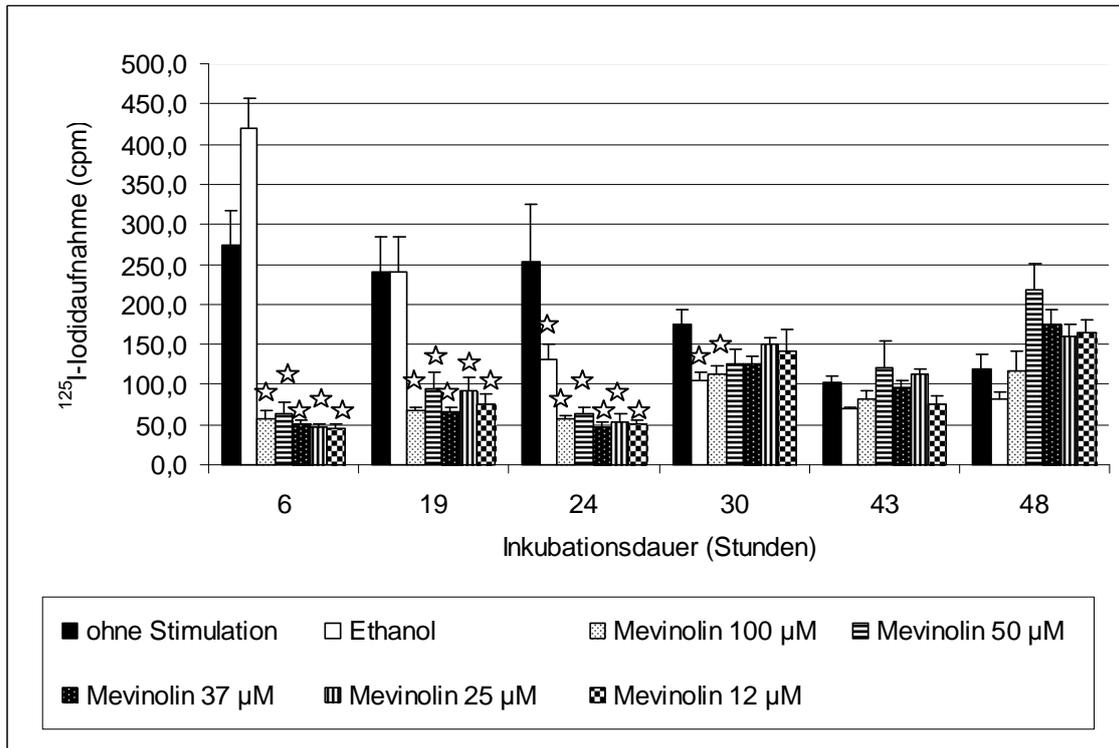


Abbildung 19: Einfluss von Mevinolin (100; 50; 37; 25 und 12 μM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 8 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.6 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Valproinsäure

In Abb. 20 wurde Valproinsäure an den kultivierten Thyreozyten ausgetestet. Als Kontrollgruppen dienten Schilddrüsenzellen die nicht mit Valproinsäure stimuliert wurden. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Dabei zeigten die Konzentrationen 3, 1 und 0,5 mM alle eine signifikante Steigerung der Iodidaufnahme gegenüber der Kontrolle nach 30, 43 und 48 Stunden Inkubation.

In einem Wiederholungsansatz (Abb. 21) konnten signifikant erhöhten Werte des ersten Ansatzes nach 30 und 48 Stunden allerdings nicht wieder erreicht werden. Ein übereinstimmendes Verhalten wurde nur nach 24 Stunden unter 0,5 μM erzielt.

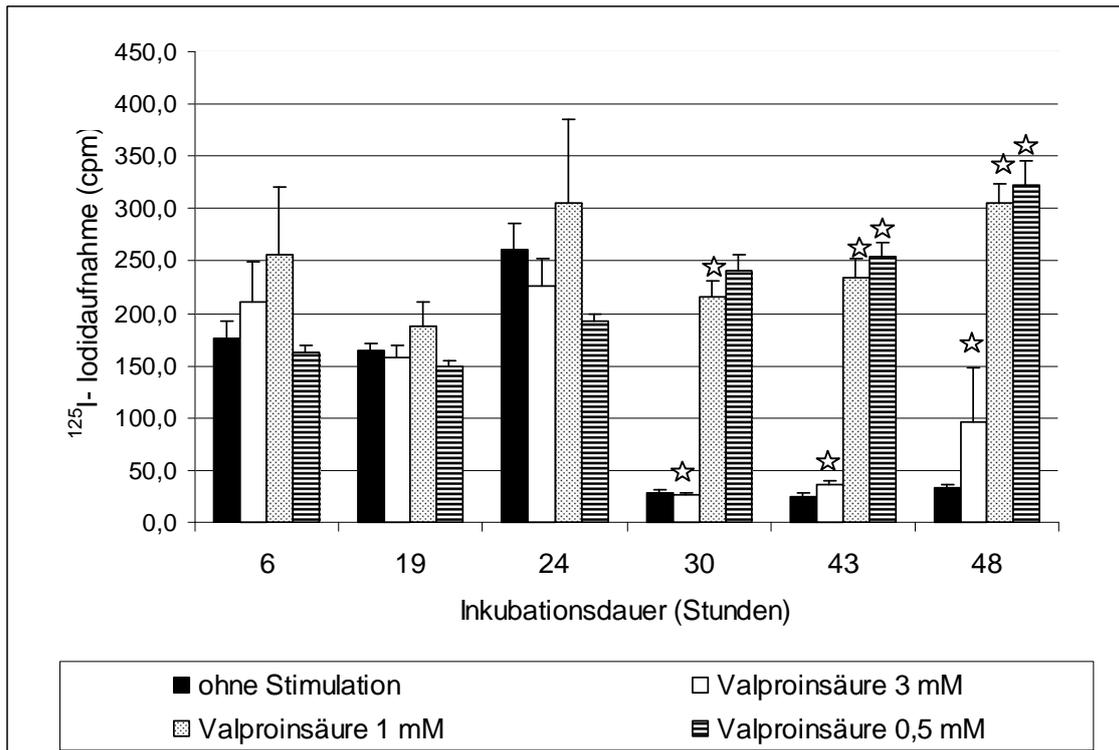


Abbildung 20: Einfluss von Valproinsäure (3; 1 und 0,5 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 9 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

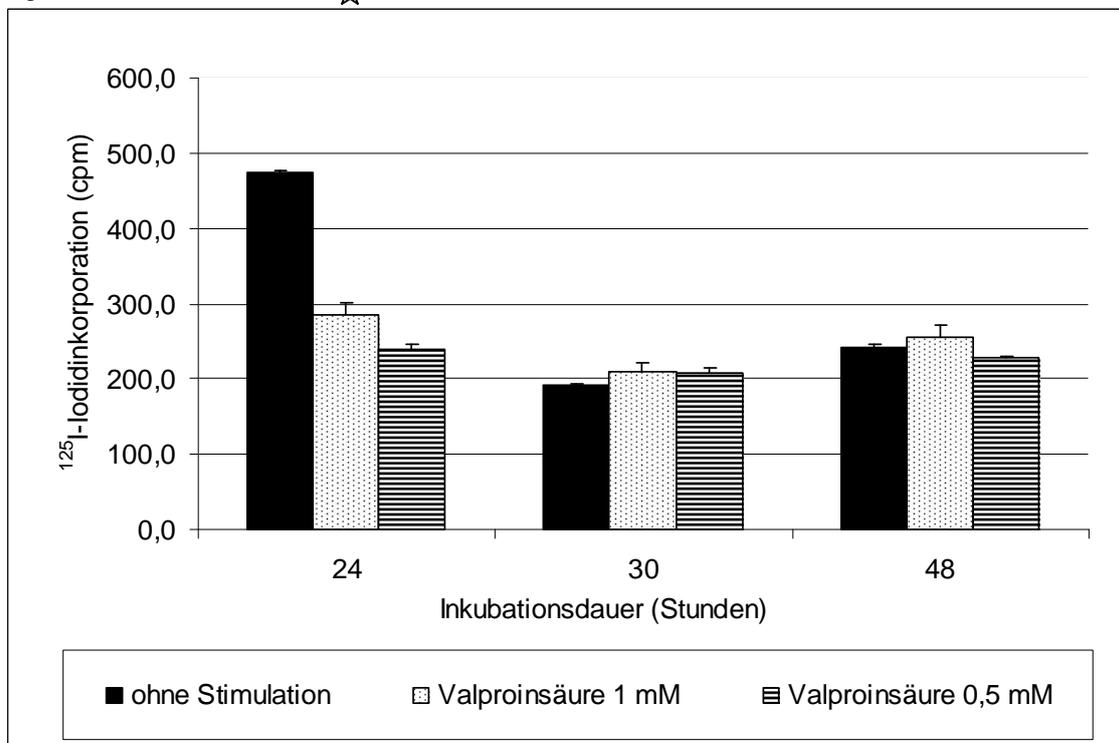


Abbildung 21: Einfluss von Valproinsäure (1 und 0,5 mM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt

t=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 10 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.7 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Apicidin

In Abb. 22 wird Apicidin untersucht. Als Kontrollen dienten Schilddrüsenzellen, die mit DMSO (Lösungsmittel von Apicidin) stimulierten wurden, sowie Zellen ohne jeglichen Zusatz. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach verschiedenen Zeiten gemessen. Dabei kam es nach 6 Stunden kam es zu einer signifikanten Erhöhung der ^{125}I -Iodidaufnahme unter allen Konzentrationen außer der Konzentration 10 nM. Ansonsten wurde bei einer Inkubationszeit von 44 Stunden und der Konzentration von 200 nM, sowie bei der Konzentration von 10 nM und einer Inkubationszeit von 19 Stunden ebenfalls eine signifikant erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahme im Vergleich zur Kontrolle beobachtet.

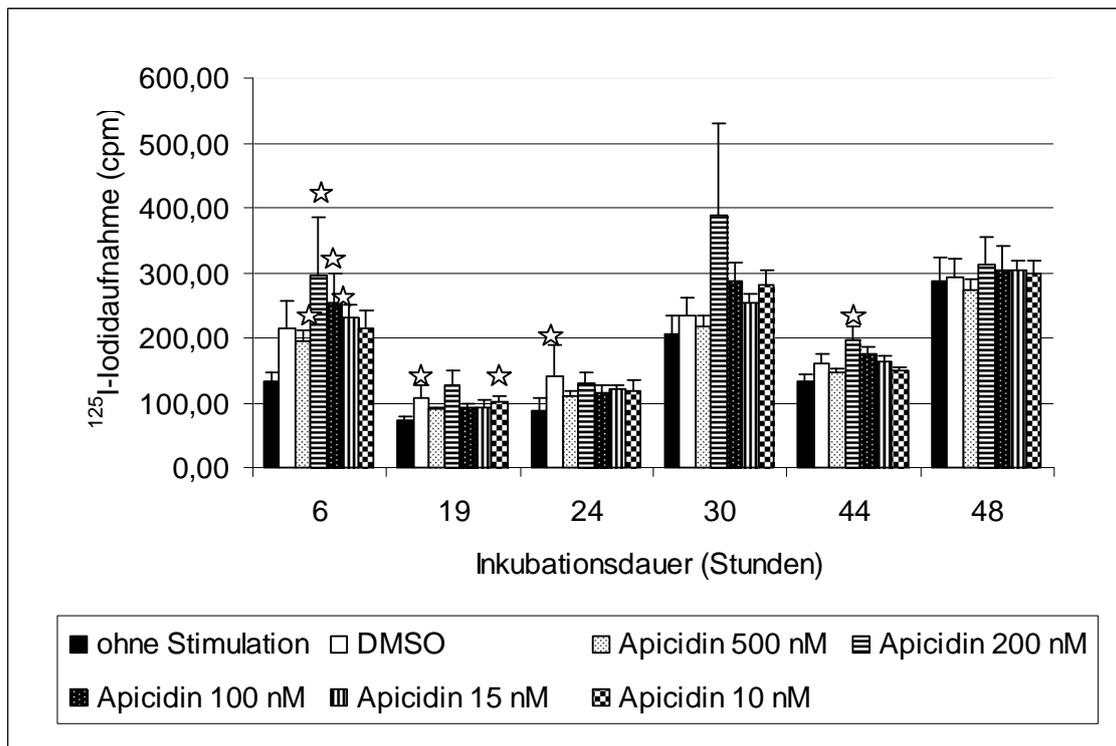


Abbildung 22: Einfluss von Apicidin (500, 200, 100, 15 und 10 nM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 11 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.8 ^{125}I -Iodidaufnahme unter APHA

In Abb. 23 wird APHA in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Als Kontrollen dienten Thyreozyten ohne jegliche Zusatz und solche mit DMSO-Zusatz (Lösungsmittel von APHA). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach verschiedenen Zeiten gemessen. Nach einer Inkubation von 19 Stunden und 44 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten. Die ^{125}I -Iodidaufnahme war nach 30 Stunden unter 0,5 bis 10 μM APHA ebenfalls signifikant gesteigert. Es wurde zu diesem Zeitpunkt die höchste Iodidaufnahme erzielt.

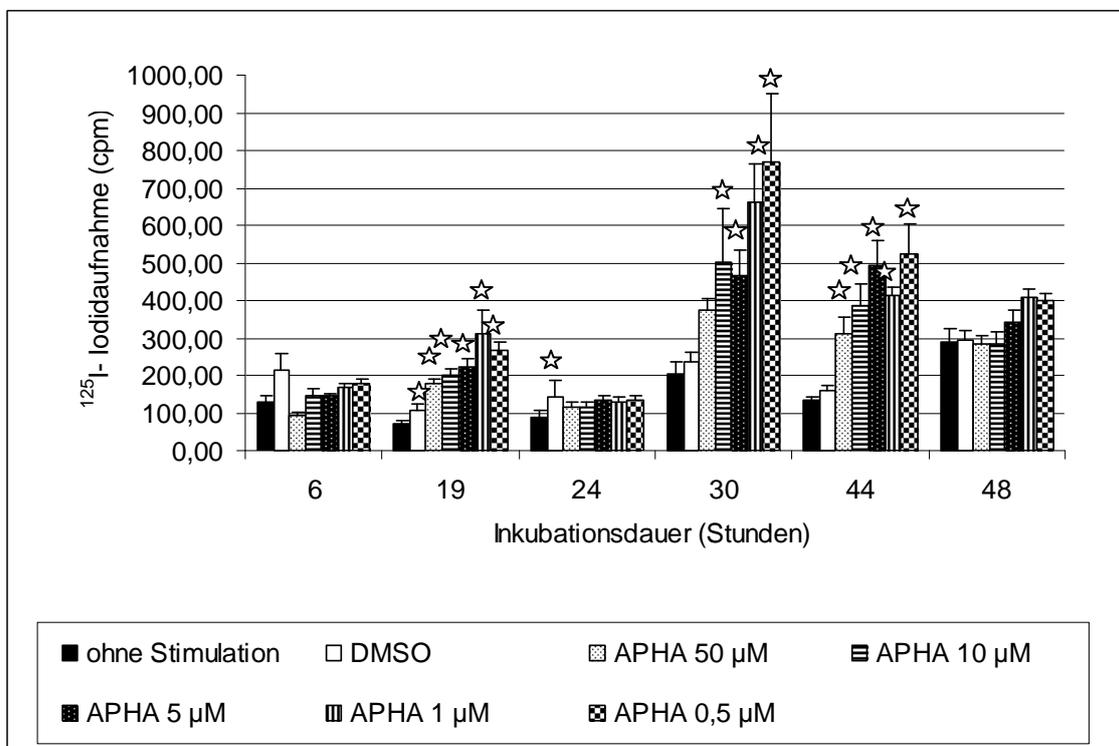


Abbildung 23: Einfluss von APHA (50, 10, 5, 1 und 0,5 μM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 12 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.9 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Troglitazon

In Abb. 24 wird Troglitazon untersucht. Als Kontrollen dienten Schilddrüsenzellen stimuliert mit DMSO (Lösungsmittel von Troglitazon), sowie Thyreozyten

ohne jegliche Stimulation. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach verschiedenen Zeiten gemessen. Dabei kam es bis auf die Endkonzentration $2,5\ \mu\text{M}$ nach 48 Stunden bei allen Inkubationszeiten zu einer erhöhten ^{125}I -Iodidaufnahme in die malignen Thyreozyten. Nach 19 und 44 Stunden Inkubation war diese unter Troglitazon signifikant über jener der unbehandelten Thyreozyten. Nach 24 Stunden kam es unter $2,5\ \mu\text{M}$ und nach 30 Stunden unter $5\ \mu\text{M}$ Troglitazon ebenfalls zu signifikant erhöhten Radioiodinkorporationen.

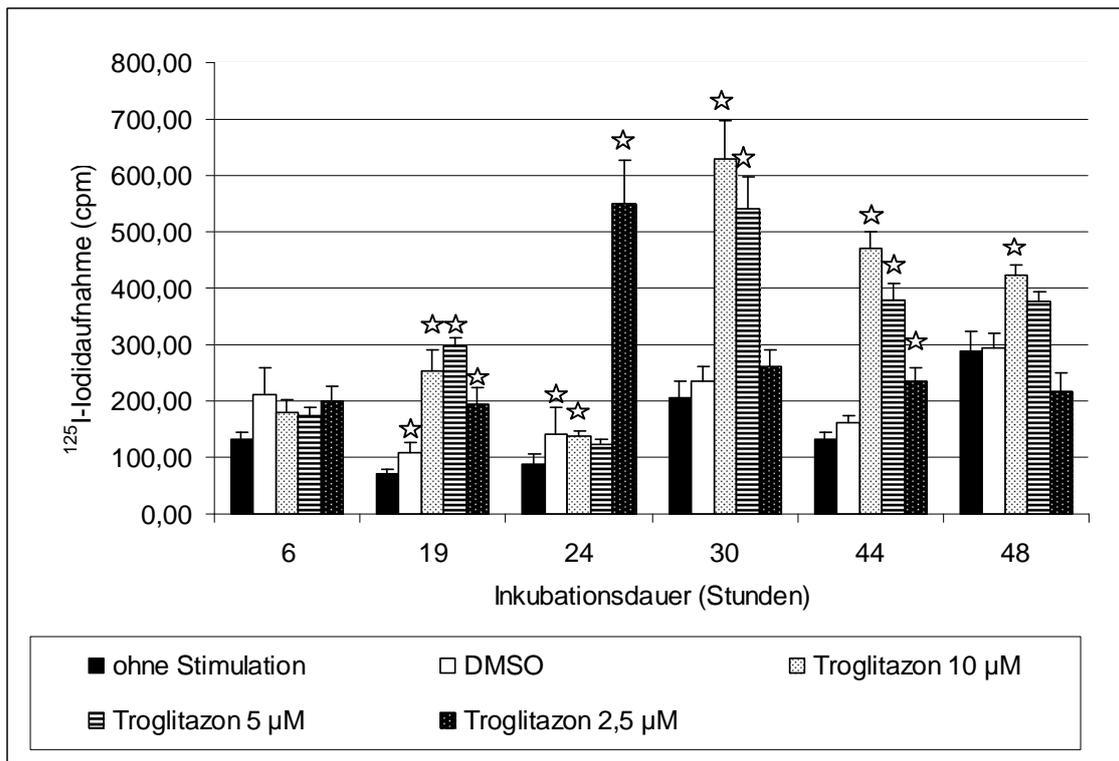


Abbildung 24: Einfluss von Troglitazon (10, 5 und $2,5\ \mu\text{M}$) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 44h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 13 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.10 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Rosiglitazon

Abb. 25 zeigt die Iodaufrate unter Rosiglitazon. Unstimulierte Thyreozyten und mit DMSO (Lösungsmittel von Rosiglitazon) stimulierte dienten als Kontrollen. Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde zu verschiedenen Zeiten gemessen. Dabei kam es überraschenderweise nur nach 28 Stunden zu signifikant unter-

schiedlichen Ergebnissen in der ^{125}I -Iodidaufnahme. Unter $10\ \mu\text{M}$ und $20\ \mu\text{M}$ nahm die ^{125}I -Iodidaufnahme drastisch ab. Signifikant war auch die Abnahme der Iodidaufnahme unter $20\ \mu\text{M}$ Rosiglitazon nach 6 Stunden.

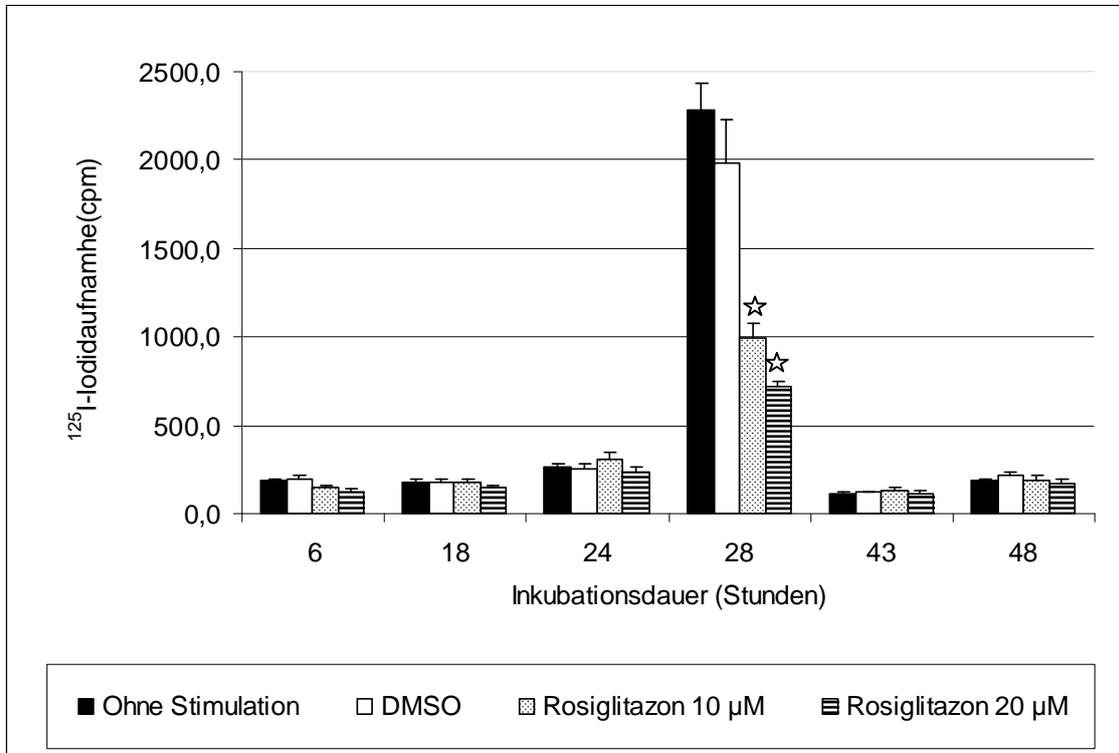


Abbildung 25: Einfluss von Rosiglitazon (20 und $10\ \mu\text{M}$) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 18h, 24h, 28h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=8$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 14 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.11 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Pioglitazon

Abb. 26 zeigt die Iodidaufnahme in die Thyreozyten unter Pioglitazon. Als Kontrolle dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und mit DMSO (Lösungsmittel für Pioglitazon). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach verschiedenen Zeiten gemessen. Dabei kam es nach einer Inkubation von 18 und 48 Stunden zu einer signifikant gesteigerten ^{125}I -Iodidaufnahme bei beiden eingesetzten Konzentrationen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse nach 24 und 28 Stunden. Hier kam es, besonders nach 28 Stunden, zu einem außerordentlich starken Abfall der Iodidaufnahme. Zum Zeitpunkt 6 und 43 Stunden gab es keine signifikanten Unterschiede.

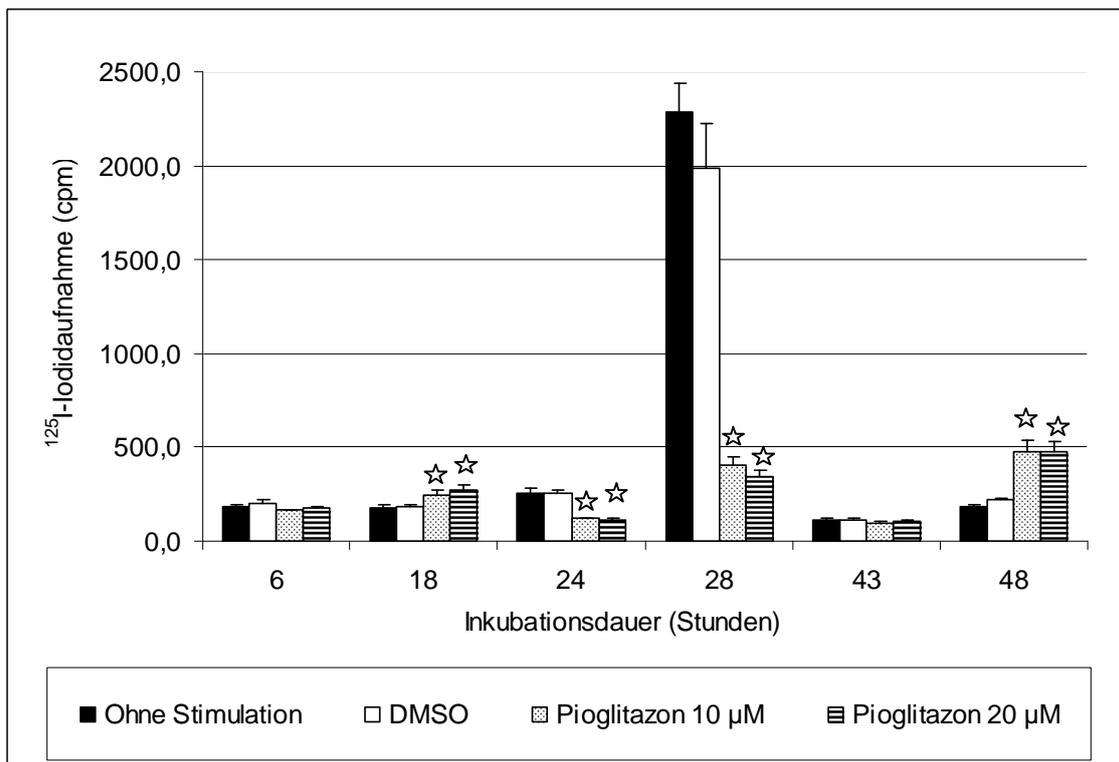


Abbildung 26: Einfluss von Pioglitazon (20 und 10 µM) auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ¹²⁵I-Iodidaufnahme nach 6h, 18h, 24h, 28h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ¹²⁵I-Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 15 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.12 ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter Akt-Inhibitor A mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid

In Abb. 27 bis 30 wurden die Thyreozyten mit Akt-Inhibitor A stimuliert. Bei einem Teil der Zellen wurde nach 2 Stunden Arsentrioxid hinzugefügt. Unstimulierte Schilddrüsenzellen wie auch Thyreozyten stimuliert mit DMSO (Lösungsmittel für Akt-Inhibitor A) dienten als Kontrollgruppen. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen.

Wie in Abb. 27 zu sehen, haben die mit Akt-Inhibitor A behandelten Zellen nach einer Inkubationsdauer von 6, 18 und 24 Stunden eine geringere ¹²⁵I-Iodidaufnahme als die unstimulierten Thyreozyten. Eine signifikante Verminderung der Radioiodaufnahme war nach 18 Stunden unter Akt-Inhibitor A (alle Konzentra-

tionen) sowie unter Akt-Inhibitor A + Arsentrioxid (jeweils alle Endkonzentrationen) zu beobachten, des Weiteren nach 24 Stunden unter 2 µM bei Akt-Inhibitor A. Nach einer 48-Stunden-Inkubation kam es hingegen zu einer signifikant gesteigerten ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter allen Konzentrationen von Akt-Inhibitor A wie auch unter der Kombination von Akt-Inhibitor + Arsentrioxid.

In Abb. 28 ist keine signifikante Steigerung oder Verminderung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme bei den mit Akt-Inhibitor A behandelten Zellen zu beobachten. Der einzige signifikante Unterschied ist bei einer 24-stündigen Inkubation mit 2 µM Arsentrioxid zu sehen.

Abb. 29 zeigt eine signifikant verminderte Iodidaufnahme bei den mit 2 und 5 µM Akt-Inhibitor behandelten und bei den mit Akt-Inhibitor A plus Arsentrioxid (alle Konzentrationen) behandelten Zellen nach 24 Stunden. Nach 30- und 48-stündiger Inkubation waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

Wie in Abb. 30 dargestellt, ist die ¹²⁵I-Iodidaufnahme bei allen Konzentrationen statistisch nicht signifikant erhöht.

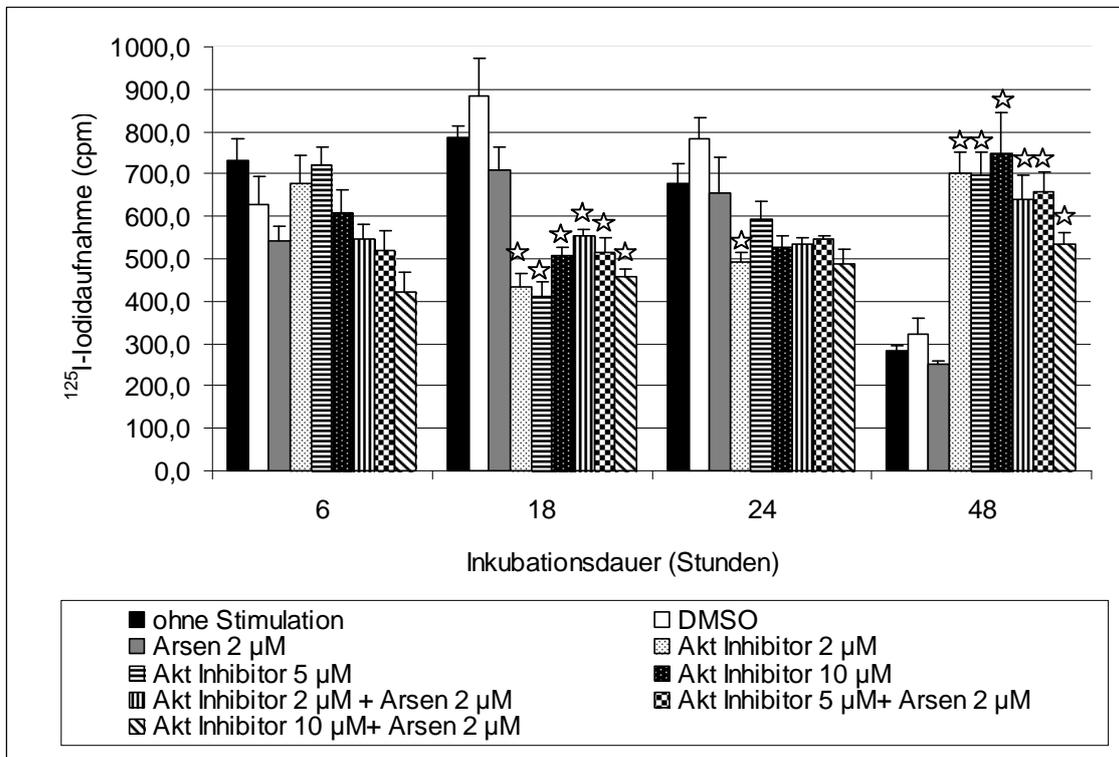


Abbildung 27: Einfluss von Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) und Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) + Arsentrioxid (2 μM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6h, 18h, 24h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=8$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 16 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

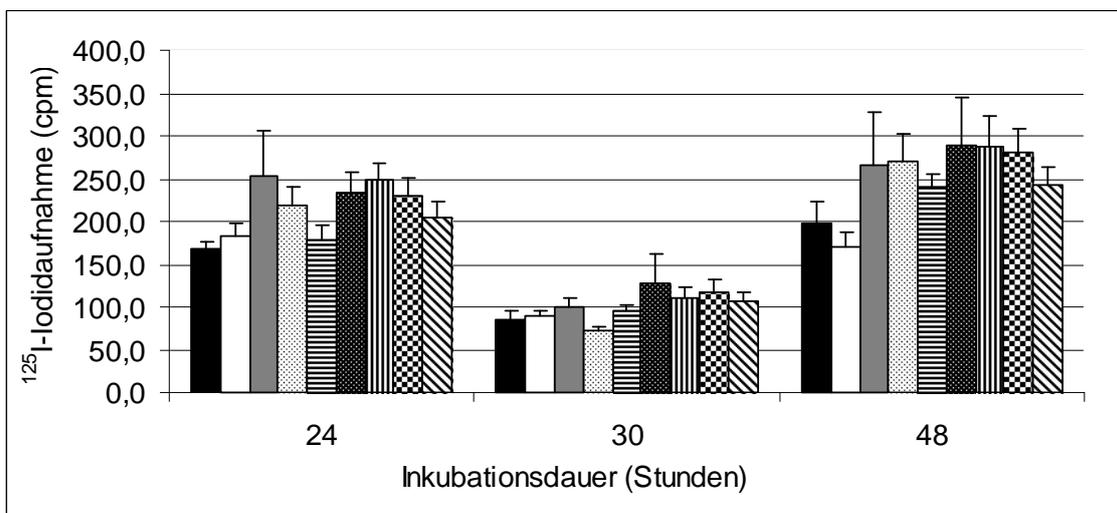
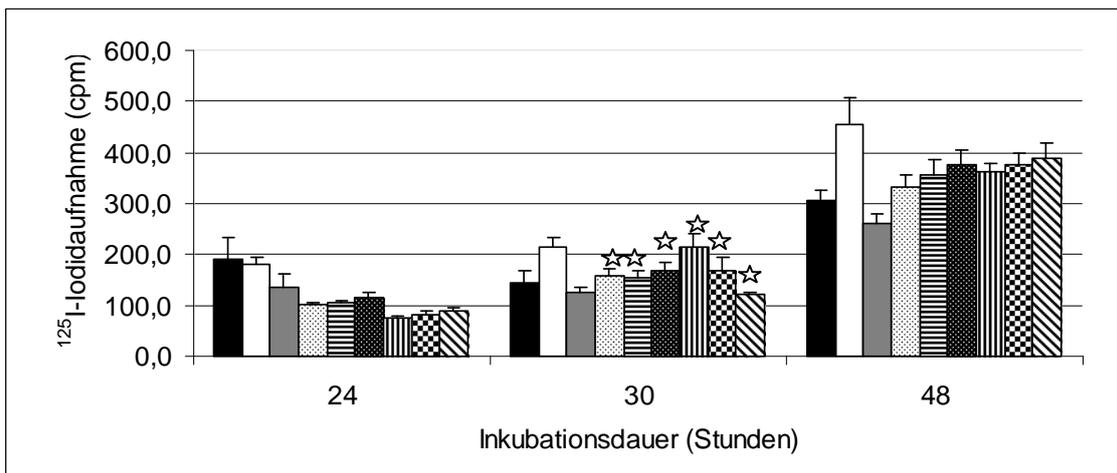
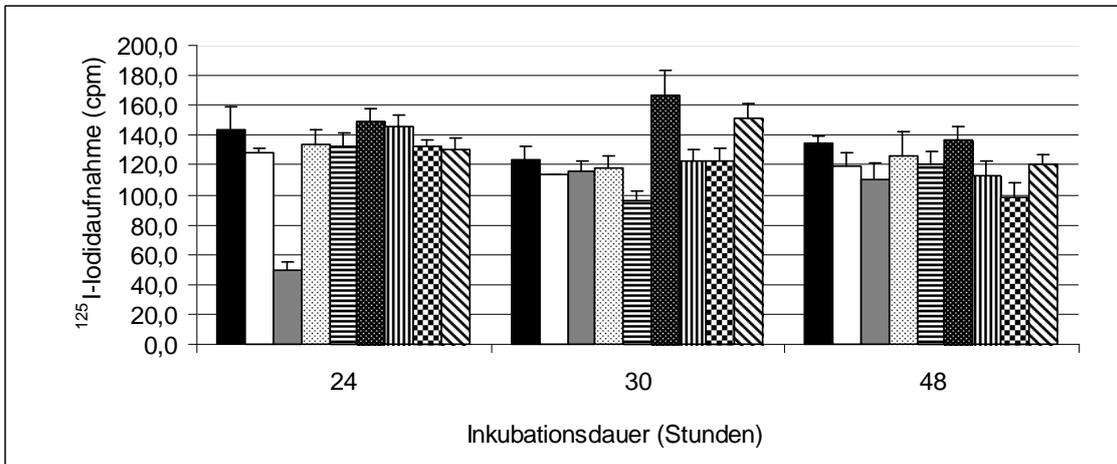
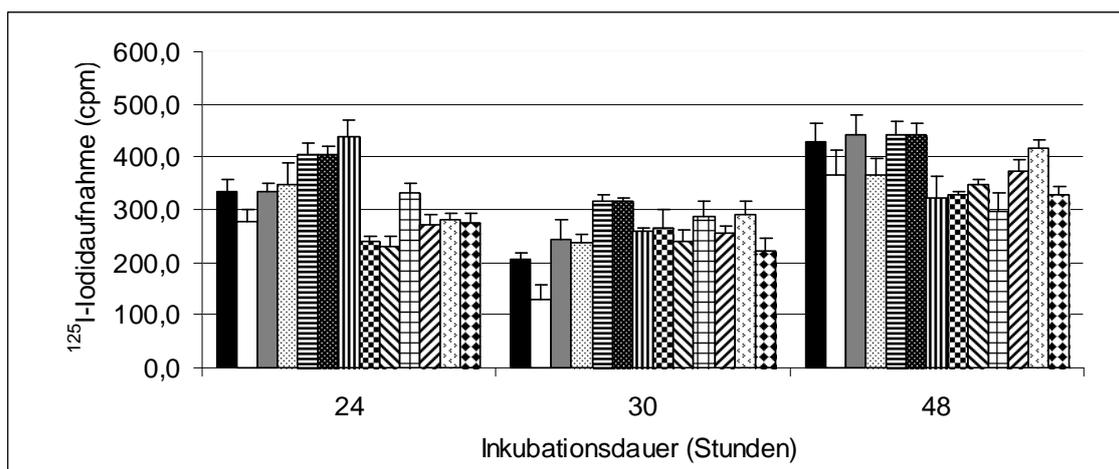


Abbildung 28, 29 und 30: Einfluss von Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) und Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) + Arsentrioxid (2 μM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=6$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 17, 18, und 19 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.1.13 ^{125}I -Iodidaufnahme unter Akt-Inhibitor B (Triciribin) mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid

In Abb. 31 und Abb. 32 (Wiederholungsversuch) wurde die Iodidaufnahme unter Triciribin untersucht. Einem Teil der Zellen wurde nach einer Inkubationsdauer von 2 Stunden Arsentrioxid (2 μM) hinzugefügt. Als Kontrollgruppe dienten unstimulierte Schilddrüsenzellen wie auch mit DMSO stimulierte (Lösungsmittel für Triciribin). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde zu verschiedenen Zeiten gemessen. Wie Abb. 31 zeigt, kam es zu keinen signifikanten Änderungen in der Radioiodaufnahme in die Thyreozyten. In Abb. 32 ist nach 24 Stunden eine signifikant erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahme unter den mit Arsentrioxid behandelten Thyreozyten zu sehen, sowie bei den mit Triciribin plus Arsentrioxid behandelten Zellen. Nach 30 Stunden waren keine signifikanten Unterschiede im Radioiodeinbau zu beobachten. Nach 48 Stunden fand sich dagegen eine signifikante Erhöhung der Iodidaufnahme bei den mit 5 und 1 μM Triciribin behandelten Zellen.



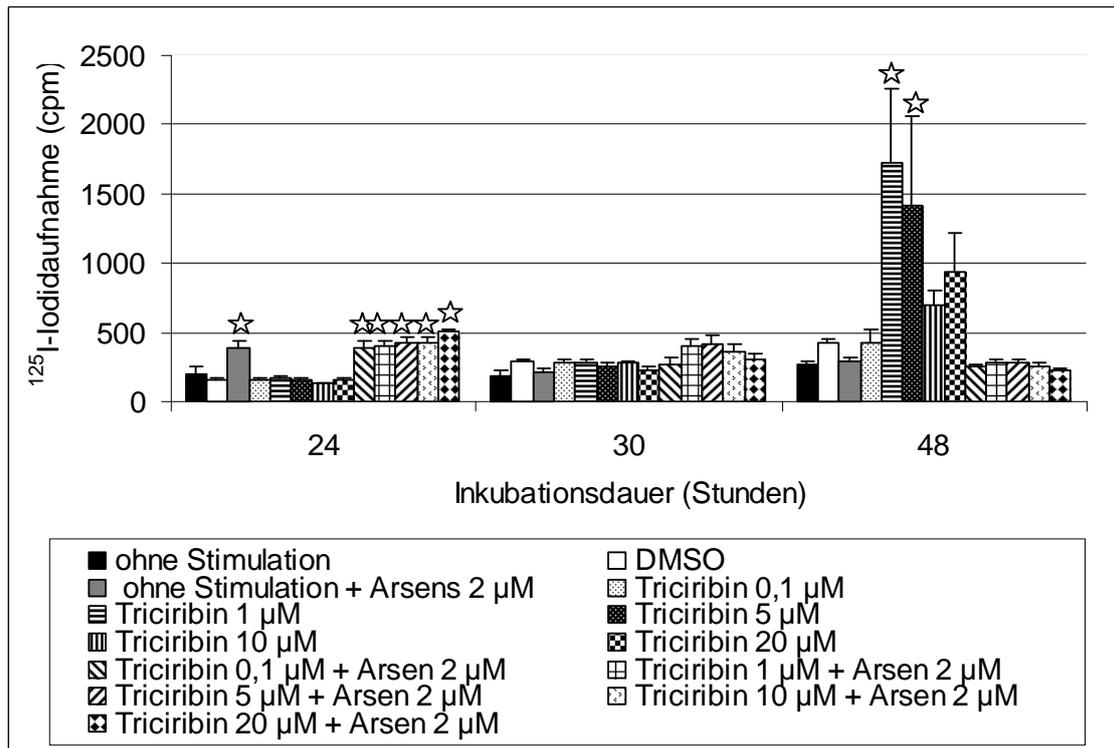


Abbildung 31 und 32: Einfluss von Triciribin (0,1; 1; 5; 10 und 20 µM) und Triciribin (0,1; 1; 5; 10 und 20 µM) + Arsenitoxid (2 µM) auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ¹²⁵I-Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 130 000, ¹²⁵I-Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 20 und 21 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2 ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte maligne humane Thyreozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Redifferenzierungssubstanzen

Den Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 wurden Redifferenzierungssubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen während der Aussaat zugefügt und die ³H-Thymidinaufnahme zu verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Als Kontrollgruppen dienten Thyreozyten, die mit den entsprechenden Lösungsmitteln für die jeweiligen Redifferenzierungssubstanzen versehen wurden, so wie Zellen ohne jegliche Stimulation. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 33-47 dargestellt.

4.2.1 ^3H -Thymidinaufnahme unter Retinol

In Abb. 33 sind die ONCO-DG 1-Zellen mit Retinol (Vitamin A) sowie mit Methanol (Lösungsmittel für Retinol) stimuliert. Nach verschiedenen Zeiten wurden die Zellen geerntet und die ^3H -Thymidininkorporation gemessen. Dabei kam es bei allen Zeiten und bei fast allen Konzentrationen zu einer rückgängigen ^3H -Thymidineinbaurate. Unter 6,5 μM , 3,2 μM und 1,6 μM Retinol war der Rückgang nach 24 und 30 Stunden statistisch signifikant. Signifikant war auch die verminderte ^3H -Thymidinaufnahme unter 3,2 μM Retinol nach 6 Stunden und unter 1,6 μM Retinol nach 19 Stunden.

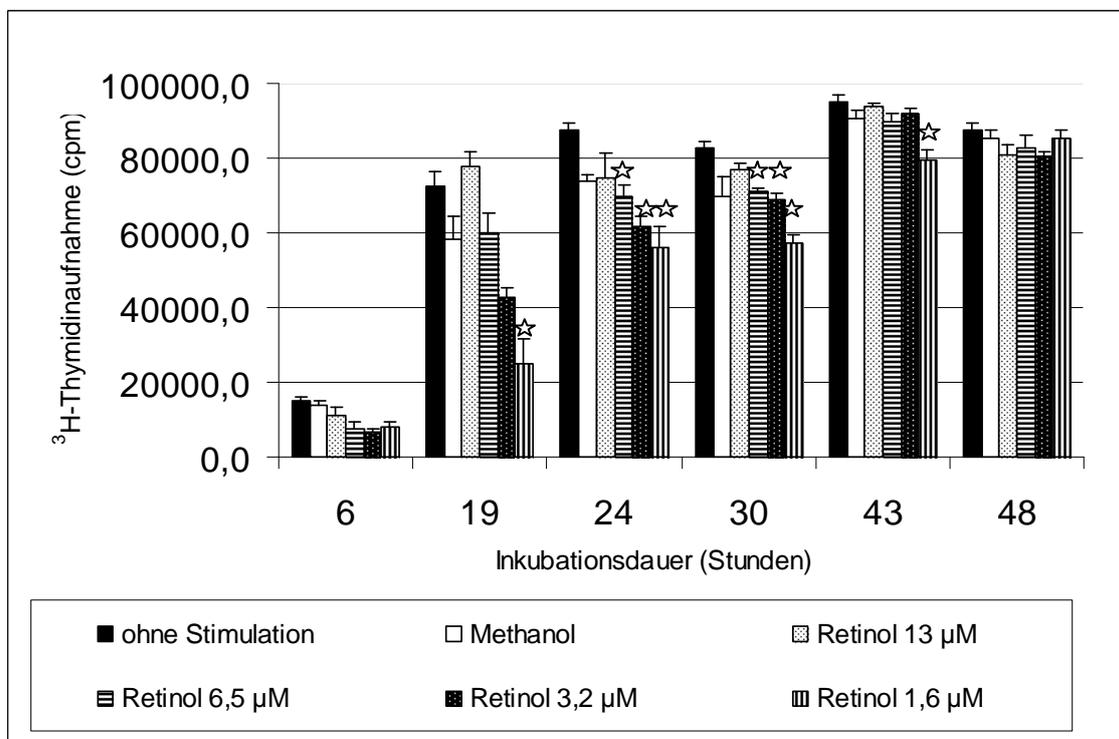


Abbildung 33: Einfluss von Retinol (13; 6,5; 3,2; 1,6 μM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=8$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 22 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.2 ^3H -Thymidinaufnahme unter all-trans-Retinsäure

In Abb. 34 wurde all-trans-Retinsäure getestet. Sein Lösungsmittel Methanol diente als Kontrolle. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die ^3H -Thy-

midinaufnahme gemessen. Dabei kam es unter 0,5 μM all-trans-Retinsäure nach 24, 30, 43 und 48 Stunden zu einem signifikanten Rückgang des ^3H -Thymidineinbaus im Vergleich zur Kontrolle. Eine entsprechende Beobachtung zeigte sich auch unter 1 μM all-trans-Retinsäure nach 30 Stunden.

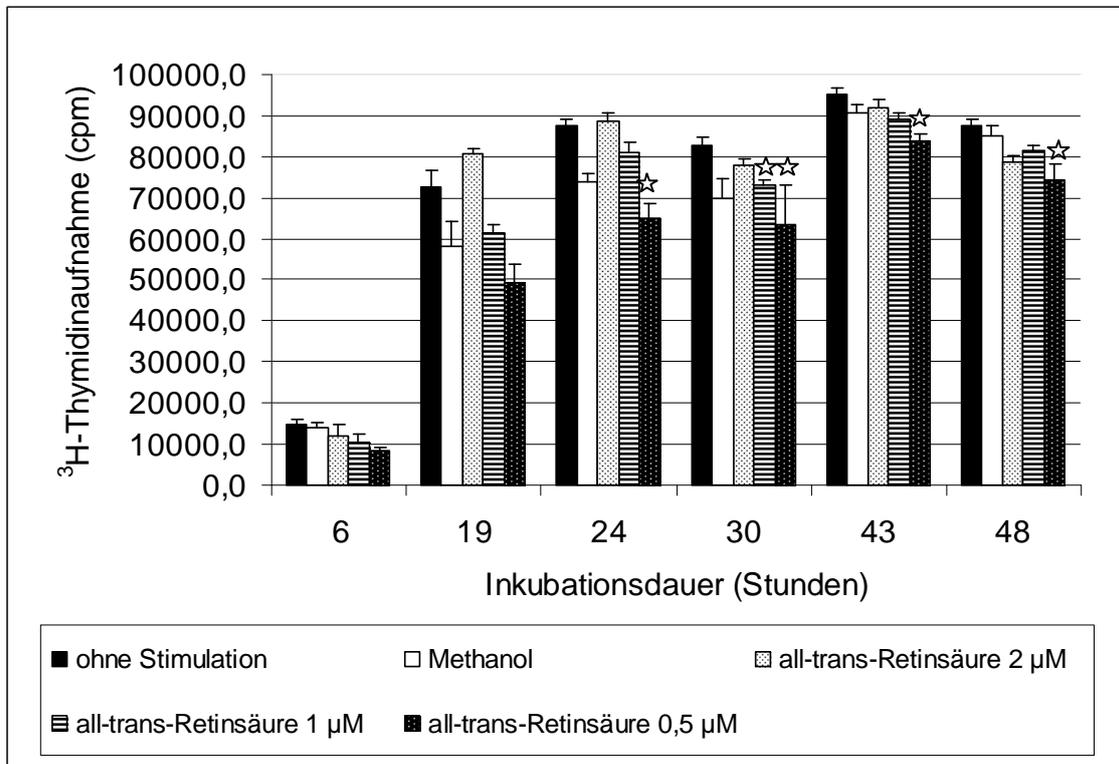


Abbildung 34: Einfluss von all-trans-Retinsäure (2; 1 und 0,5 μM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=8$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.23 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.3 ^3H -Thymidinaufnahme unter 9-cis-Retinsäure

In Abb. 35 wird die Wirkung von 9-cis-Retinsäure geprüft. Als Kontrollen dienten Thyreozyten die ohne und mit Methanol (Lösungsmittel für 9-cis-Retinsäure) stimuliert wurden. Die ^3H -Thymidininkorporation wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen. Im Vergleich zur Kontrolle kam es hier bei allen Messzeiten zu einem erniedrigten Einbau von ^3H -Thymidin. 9-cis-Retinsäure in der Konzentration 2 μM bewirkte nach 24, 30 und 48 Stunden sogar eine signifikant verminderte Thymidinaufnahme.

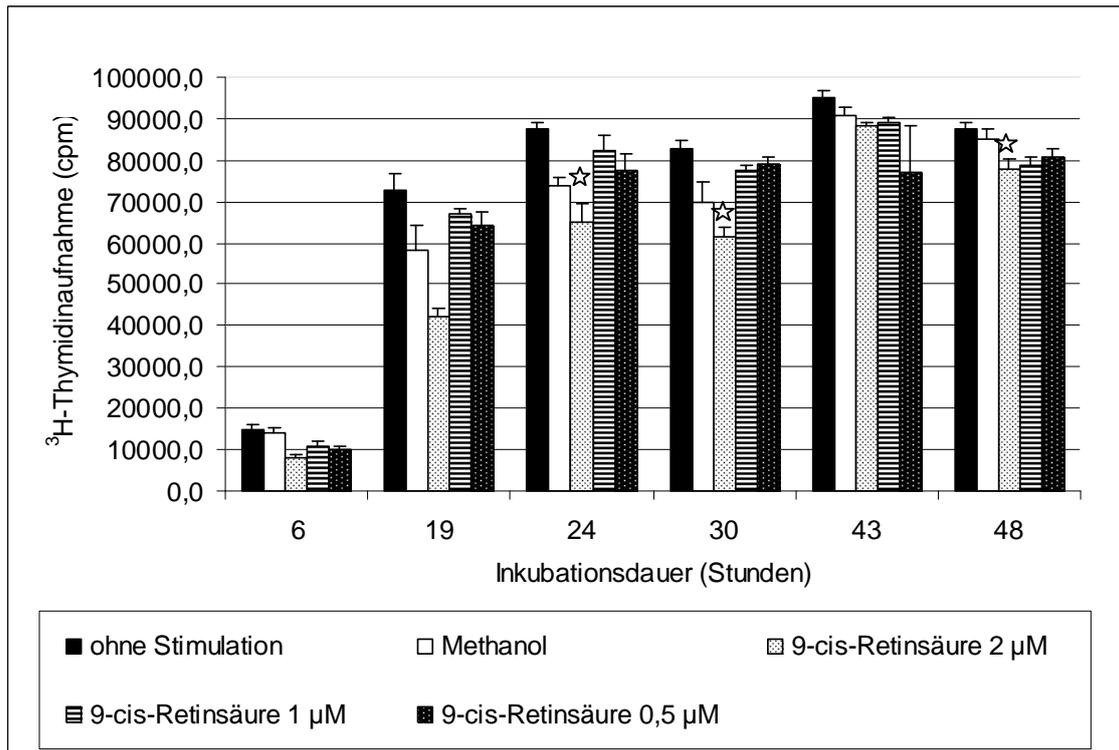


Abbildung 35: Einfluss von 9-cis-Retinsäure (2; 1 und 0,5 µM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=8$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.24 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.4 ^3H -Thymidinaufnahme unter 5-Aza-deoxycytidin

In Abb. 36 sind die Thyreozyten mit 5-Aza-deoxycytidin stimuliert. Als Kontrollen dienten Schilddrüsenzellen, die mit DMSO (Lösungsmittel von 5-Aza-deoxycytidin) stimuliert wurden und solche ohne jeglichen Zusatz. Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde zu verschiedenen Zeiten gemessen. Dabei kam es nach 6 Stunden zu einer signifikanten Abnahme, nach 19, 24, 30, 43 und 48 Stunden dagegen zu einer signifikant erhöhten ^3H -Thymidinaufnahme, mit Ausnahme der Konzentration 5 µM nach 48 Stunden.

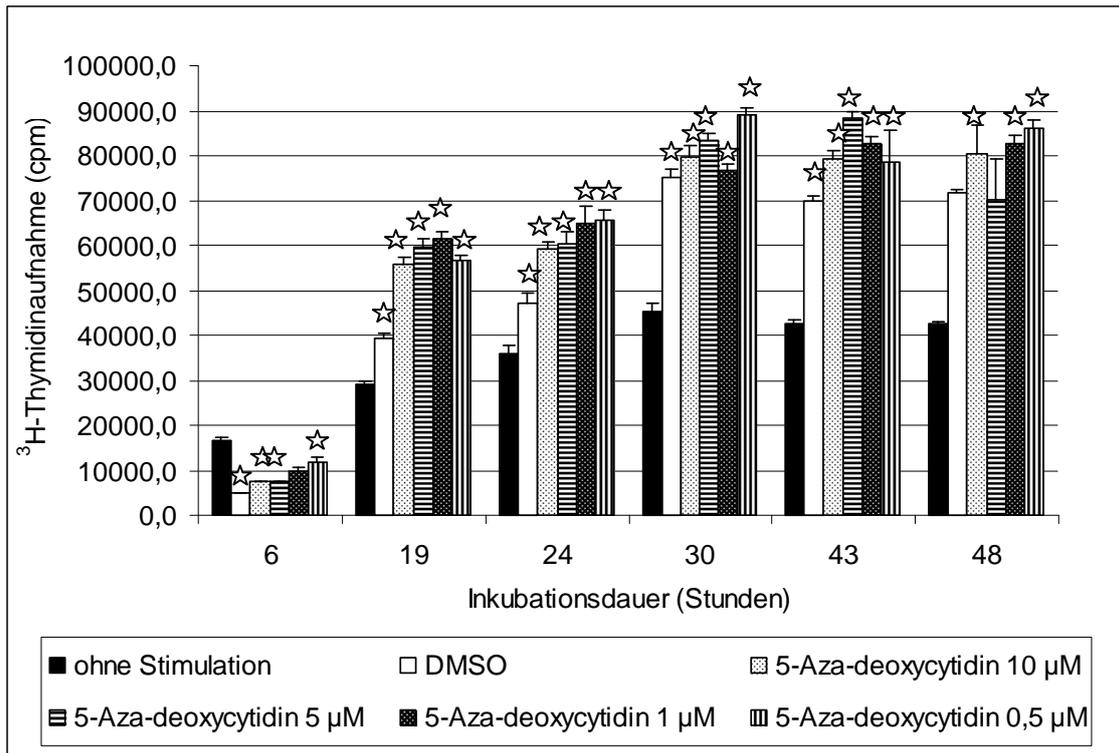


Abbildung 36: Einfluss von 5-Aza-deoxycytidin (10; 5; 1 und 0,5 µM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.25 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.5 ³H-Thymidinaufnahme unter Mevinolin

In Abb. 37 wird Mevinolin untersucht. Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und stimuliert mit DMSO (Lösungsmittel von Mevinolin) erfüllten die Aufgabe als Kontrolle. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurde die ³H-Thymidininkorporation gemessen. Dabei kam es unter 100 µM Mevinolin zu einer signifikanten Abnahme der ³H-Thymidininkorporation bei allen Inkubationszeiten, ausgenommen jener nach 48 Stunden. Unter 50 und 37 µM Mevinolin kam es dagegen zu einer signifikant erhöhten Thymidinaufnahme zwischen 6 bis 43 Stunden. Die Konzentrationen 25 und 12 µM bewirkten bei allen Inkubationszeiten eine signifikant gesteigerte ³H-Thymidininkorporation.

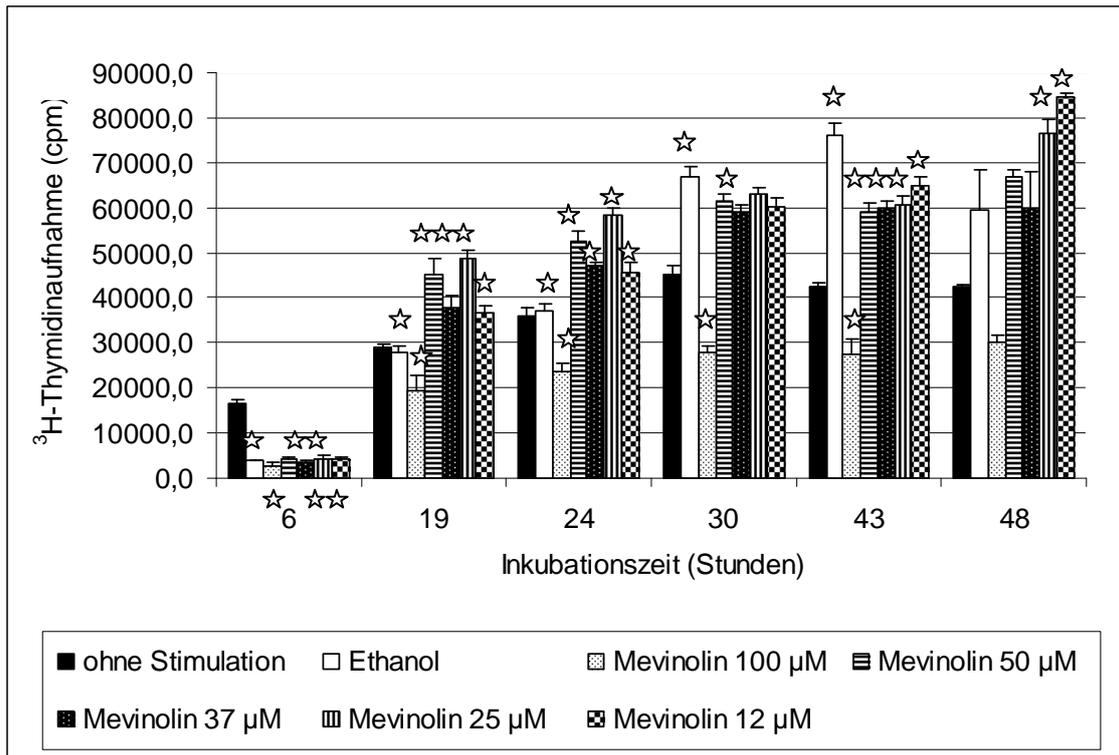


Abbildung 37: Einfluss von Mevinolin (100; 50; 37; 25 und 12 µM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0) . Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.26 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.6 ³H-Thymidinaufnahme unter Valproinsäure

Abb. 38 zeigt die Wirkung von Valproinsäure. Zusätzlich wurden Zellen ohne jegliche Zusätze ausgesät, die als Kontrollen dienten. Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach verschiedenen Inkubationszeiten. Dabei ist nach 24, 30 und 48 Stunden unter den Konzentrationen 1 und 3 mM die ³H-Thymidinaufnahme signifikant erhöht, ebenso nach 19 Stunden unter der Konzentration 3 mM. Eine annähernd gleiche Aufnahmerate wie bei den unstimulierten Thyreozyten ist unter 0,5 mM Valproinsäure zu sehen.

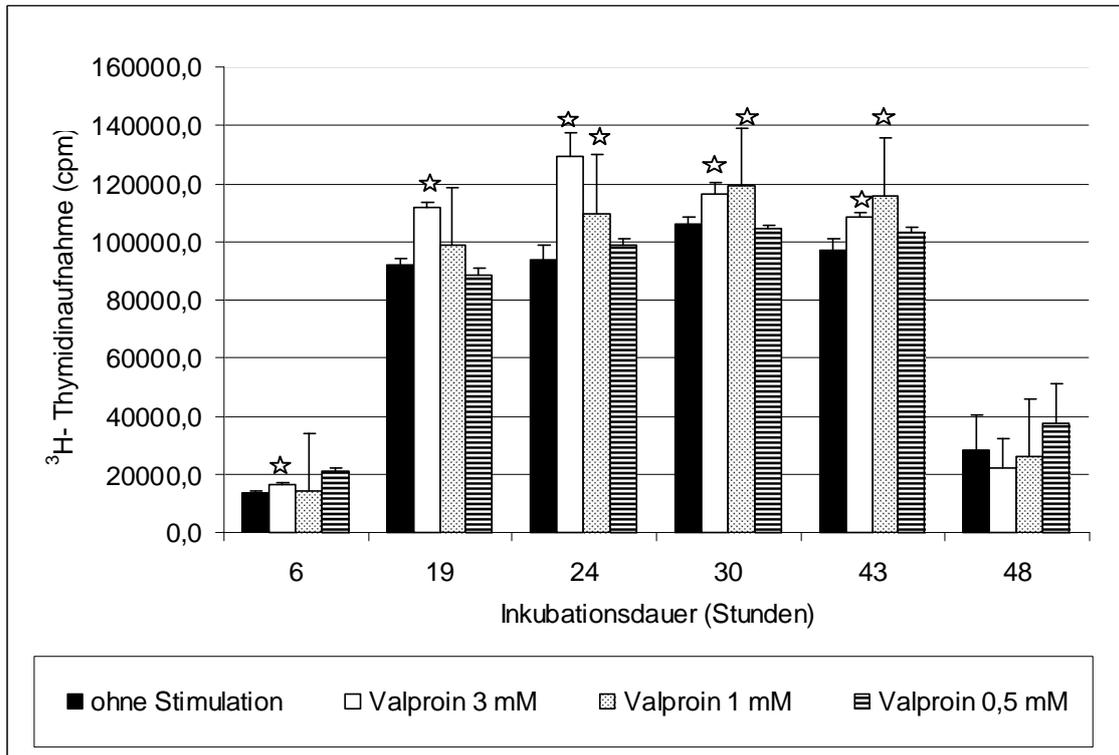


Abbildung 38: Einfluss von Valproinsäure (3;1 und 0,5 mM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0) . Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 6h, 19h, 24h, 30h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.27 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.7 ³H-Thymidinaufnahme unter Apicidin

In Abb. 39 wurde Apicidin ausgetestet. Thyreozyten ohne jegliche Zusätze oder solche mit DMSO (Lösungsmittel von Apicidin) stimuliert dienten als Kontrollen. Gemessen wurde der ³H-Thymidineinbau nach verschiedenen Inkubationszeiten. Dabei ist nach 7 Stunden Inkubation eine signifikant gesteigerte ³H-Thymidinaufnahme unter 500, 15 und 10 nM Apicidin zu beobachten. Unter 200 und 100 nM kam es hingegen zu einer signifikanten Abnahme der ³H-Thymidininkorporation, ebenso nach 44 Stunden unter 100 und 15 nM Apicidin. Nach 48 Stunden kam es unter 100 nM und 10 nM zum Gegenteil, nämlich einer signifikant gesteigerten ³H-Thymidinaufnahme.

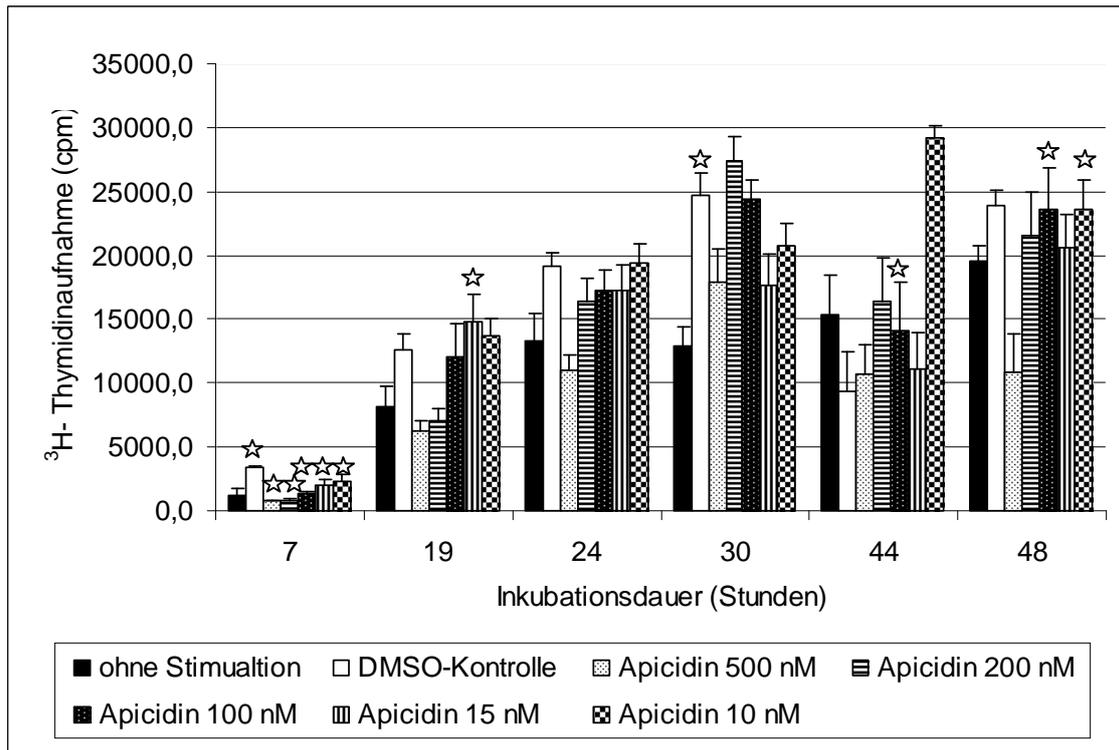


Abbildung 39: Einfluss von Apicidin (500, 200, 100, 15 und 10 nM) auf die ³H- Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0) . Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 7h, 19h, 24h, 30h, 44h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=12. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.28 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.8 ³H-Thymidinaufnahme unter APHA

In Abb. 40 wird APHA ausgetestet. Als Kontrollgruppen dienten Thyreozyten, die mit DMSO stimuliert (Lösungsmittel von APHA) wurden oder Thyreozyten ohne jegliche Stimulation. Gemessen wurde die ³H-Thymidininkorporation nach verschiedenen Zeiten. Dabei kam es schon nach 6 Stunden unter allen Konzentrationen zu einem signifikanten Anstieg des ³H-Thymidineinbaus, ausgenommen die Konzentration mit 50 µM. Darunter kam es erst nach 30 Stunden zu einem Anstieg der ³H-Thymidinaufnahme. Eine signifikant erhöhte Thymidininkorporation wurde nach 30 Stunden auch bei der Konzentration 1 µM beobachtet. Nach 19 Stunden kam es hingegen unter 10 µM APHA zu einem signifikanten Abfall der ³H-Thymidinaufnahme. Auch nach 44 Stunden fand sich eine signifikante Thymidinabnahme unter den Konzentration 5µM, 1µM und 0,5µM und nach 48 Stunden unter der Konzentration 10 µM.

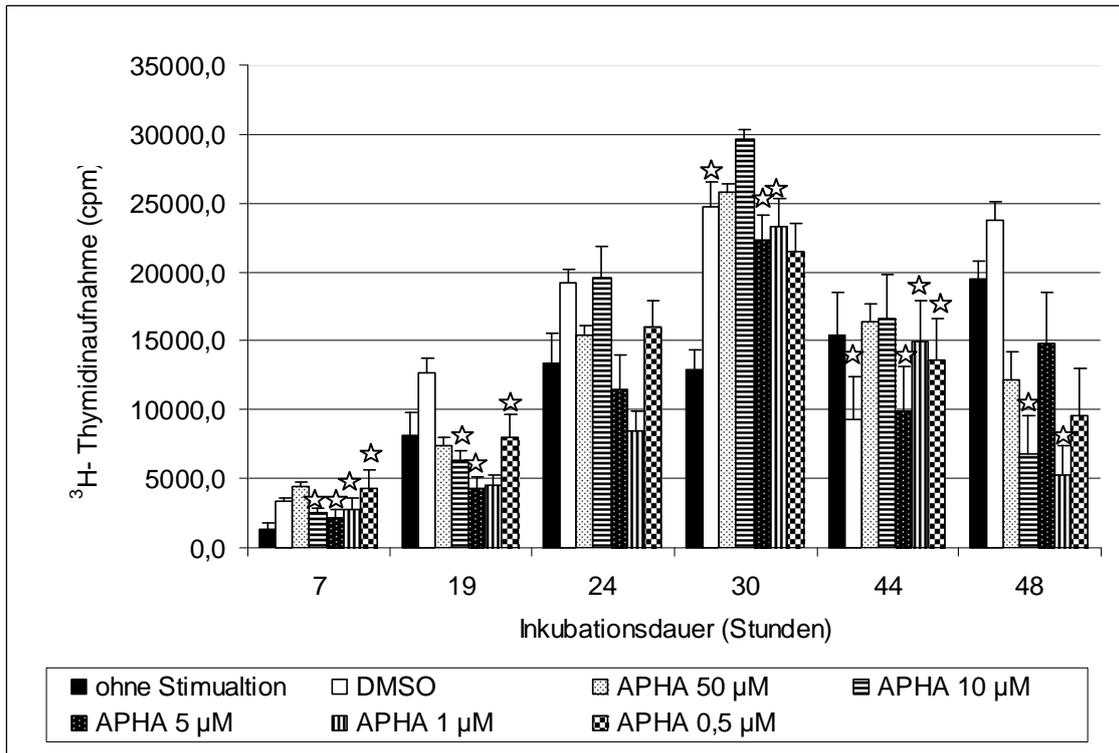


Abbildung 40: Einfluss von APHA (50, 10, 5, 1 und 0,5 µM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 7h, 19h, 24h, 30h, 44h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=12. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.29 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.9 ³H-Thymidinaufnahme unter Troglitazon

In Abb. 41 sind die Thymidinaufnahmeraten unter Troglitazon gezeigt. Als Kontrollgruppen fungierten unstimulierte Schilddrüsenzellen wie auch Thyreozyten stimuliert mit DMSO (Lösungsmittel für Troglitazon). Gemessen wurde die ³H-Thymidininkorporation nach verschiedenen Inkubationszeiten. Dabei zeigte sich zwischen 7 und 44 Stunden Inkubation immer eine erhöhte ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten. Nach 7 Stunden war der Anstieg signifikant, nicht dagegen nach 19 Stunden. Nach 24 Stunden kam es unter 2,5 µM Troglitazon wieder zu einer signifikant gesteigerten Thymidininkorporation. Weitere signifikant gesteigerte Einbauraten waren nach 30 Stunden unter 10 µM zu beobachten. Nach 44 Stunden war der Thymidineinbau nicht gesteigert, wohl aber nach 48 Stunden unter 2,5 µM Troglitazon.

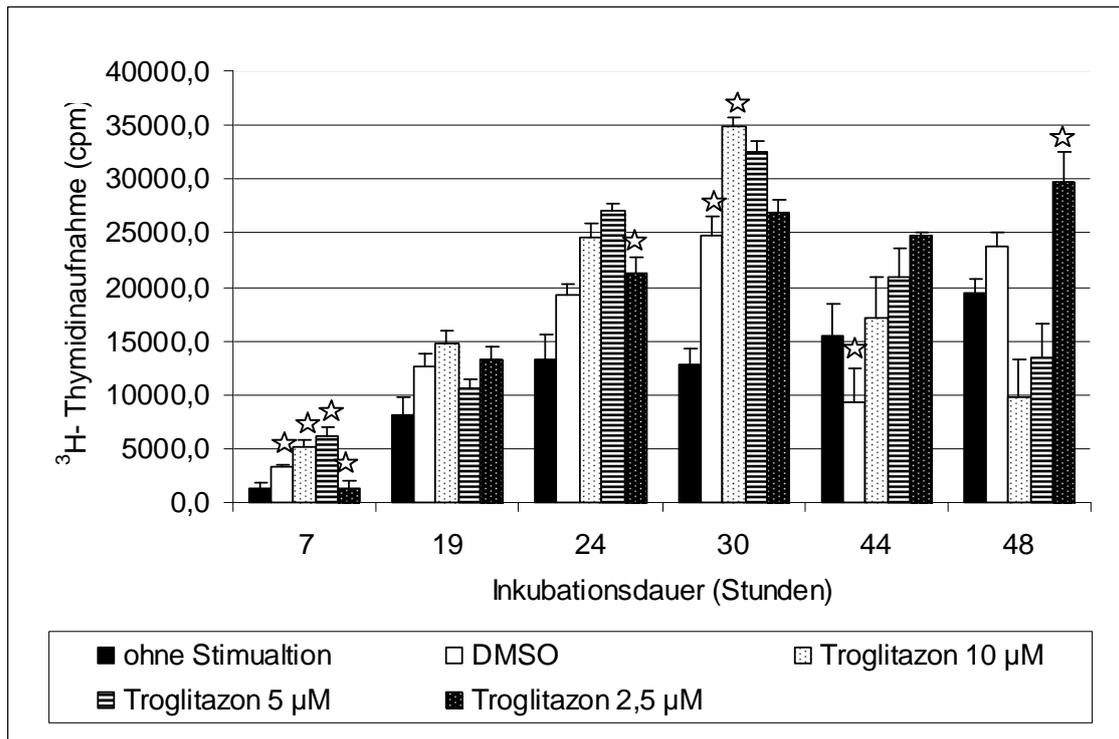


Abbildung 41: Einfluss von Troglitazon (10, 5 und 2,5 µM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 7h, 19h, 24h, 30h, 44h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=12. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.30 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.10 ³H-Thymidinaufnahme unter Rosiglitazon

Abb. 42 zeigt die Thymidinaufnahme unter Rosiglitazon. Als Kontrollen dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und mit DMSO (Lösungsmittel von Rosiglitazon) stimulierte. Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach verschiedenen Zeiten gemessen. Dabei kam es bei den Inkubationszeiten 6 bis 43 Stunden zu einer leicht gesteigerten ³H-Thymidininkorporation im Vergleich zur Kontrolle. Nur nach 48 Stunden fiel die Thymidinaufnahme ab. Jedoch unterschied sich statistisch kein Ergebnis signifikant von der Kontrolle.

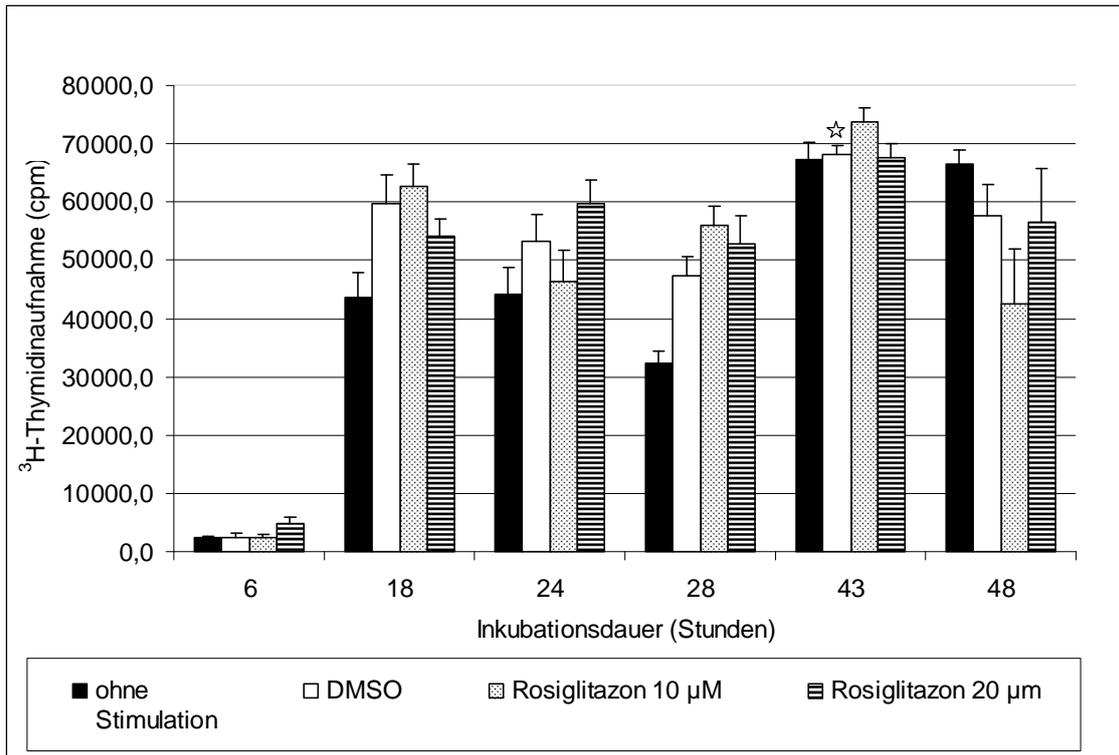


Abbildung 42: Einfluss von Rosiglitazon (20 und 10 µM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 6h, 18h, 24h, 28h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=12. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.31 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.11 ³H-Thymidineinbau unter Pioglitazon

Abb. 43 zeigt den Thymidineinbau unter Pioglitazon. Als Kontrollgruppen dienten Schilddrüsenzellen, die mit DMSO (Lösungsmittel von Pioglitazon) stimuliert wurden und unstimulierte Thyreozyten. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Zellen geerntet und der ³H-Thymidineinbau gemessen. Dabei zeigte sich eine nicht signifikant erniedrigte ³H-Thymidininkorporation unter 20 und 10 µM Pioglitazon nach 6, 18, 43 und 48 Stunden. Die Ergebnisse nach 24 und 28 Stunden zeigten eine nicht signifikant erhöhte Thymidinaufnahme.

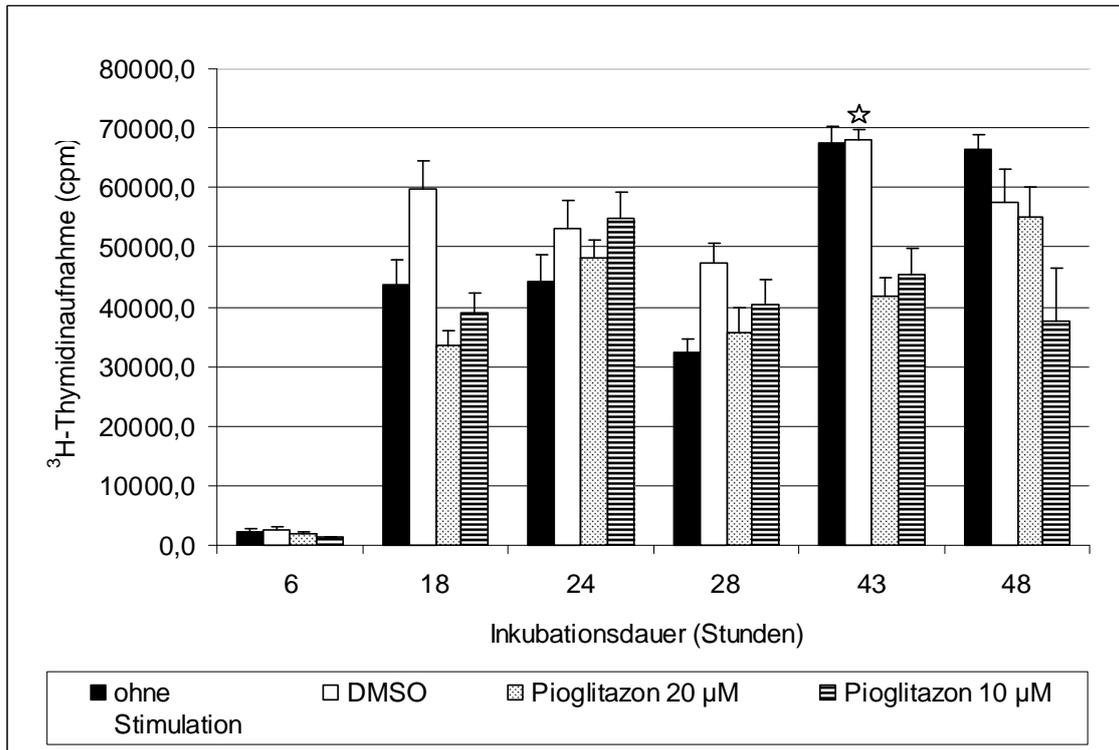


Abbildung 43: Einfluss von Pioglitazon (20 und 10 µM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 6h, 18h, 24h, 28h, 43h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=12. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.32 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.12 ³H-Thymidineinbau unter Akt-Inhibitor A mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid

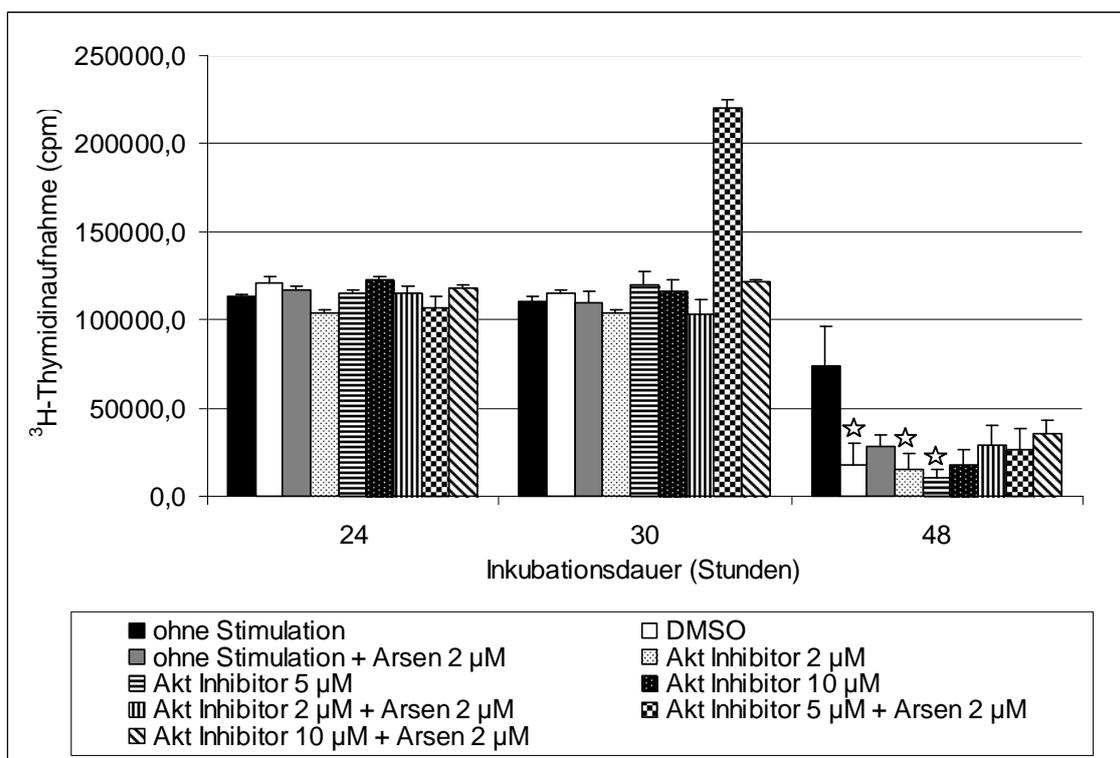
In Abb. 44 bis 46 ist Akt-Inhibitor A den Thyreozyten hinzugefügt worden. Einem Teil der Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden Arsentrioxid (2 µM) hinzu gegeben. Des Weiteren dienten Zellen ohne jegliche Stimulation, und solche mit DMSO (Lösungsmittel für Akt-Inhibitor A) oder mit Arsentrioxid stimuliert, als Kontrollgruppen. Die ³H-Thymidininkorporation wurde nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen.

Wie Abb. 44 zeigt, kam es nach einer Inkubationszeit von 24 und 30 Stunden zu keiner sicheren Differenz in der ³H-Thymidininkorporation zwischen unstimulierten und stimulierten Zellen. Im Gegensatz dazu kam es nach 48 Stunden zu

einem deutlichen Abfall der Thymidinaufnahme. Signifikante Unterschiede zur Kontrolle fanden sich nur unter den Konzentrationen 2 und 5 μM .

Wie Abb. 45 zeigt, ist nach 24 Stunden eine signifikante Abnahme der Thymidininkorporation unter den mit Arsentrioxid behandelten Zellen zu beobachten. Das Gleiche gilt für die Thyreozyten, welche mit Akt-Inhibitor A und Arsentrioxid behandelt wurden. Nach 30 Stunden waren keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Hingegen kam es nach 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg des Thymidineinbaus bei den mit Akt-Inhibitor A und Arsentrioxid behandelten Zellen.

Abb. 46 zeigt sowohl nach einer Inkubationszeit von 24 als auch von 30 Stunden eine minimal gesteigerte nicht signifikante ^3H -Thymidinaufnahme, während es nach einer 48-stündigen Inkubation zu keinem sicheren Unterschied zwischen den unstimulierten und stimulierten Thyreozyten kam.



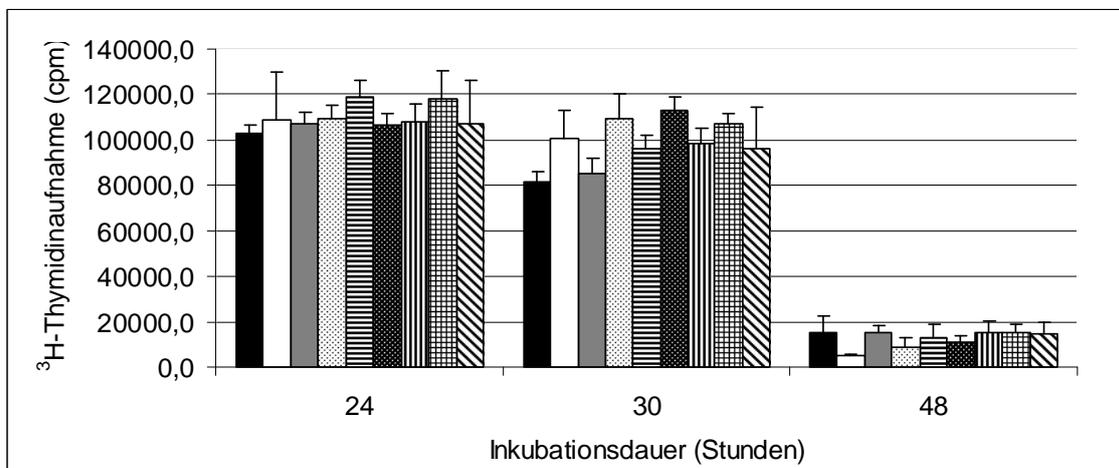
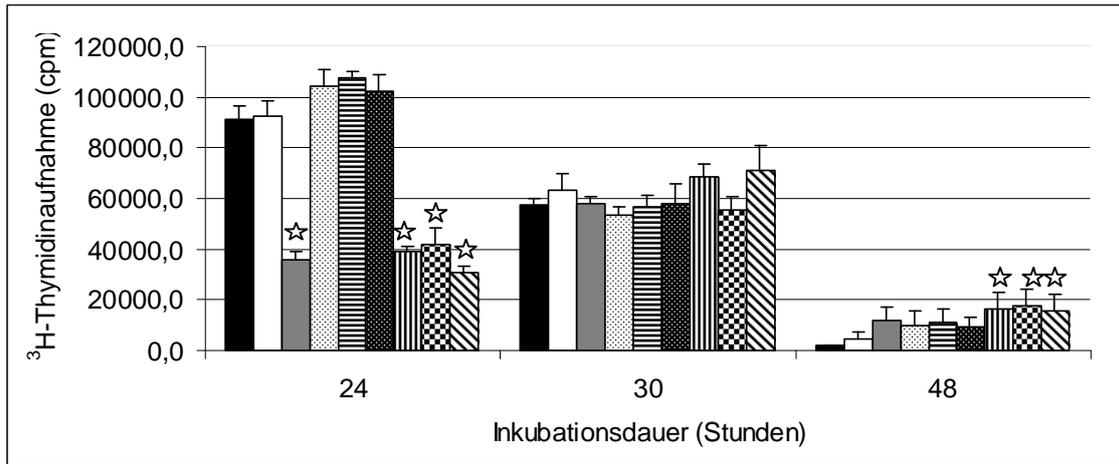


Abbildung 44, 45 und 46: Einfluss von Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) und Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) + Arsenitrioxid (2 μM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=12$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.33, 34 und 35 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.2.13 ^3H -Thymidineinbau unter Akt-Inhibitor B (Triciribin) mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsenitrioxid

In Abb. 47 sind die Thyreozyten mit Triciribin stimuliert. Einem Teil der Zellen wurde nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden Arsenitrioxid (2 μM) hinzugefügt. Als Kontrollgruppen dienten Zellen ohne jegliche Stimulation und solche die mit DMSO (Lösungsmittel für Akt-Inhibitor B) oder Arsenitrioxid stimuliert wurden. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Zellen geerntet und die ^3H -Thymidininkorporation gemessen. Dabei zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation bei den Zellen, die mit 20 μM Triciribin, sowie mit Triciribin alle Kon-

zentrationen plus Arsentrioxid behandelt wurden, eine signifikant verminderte ^3H -Thymidineinbaurate im Vergleich zu den unstimulierten Thyreozyten, ebenso nach 30 und 48 Stunden unter 10 als auch 20 μM Triciribin. Signifikant vermindert war die ^3H -Thymidininkorporation auch nach 48 Stunden bei den mit Triciribin plus Arsentrioxid inkubierten Thyreozyten.

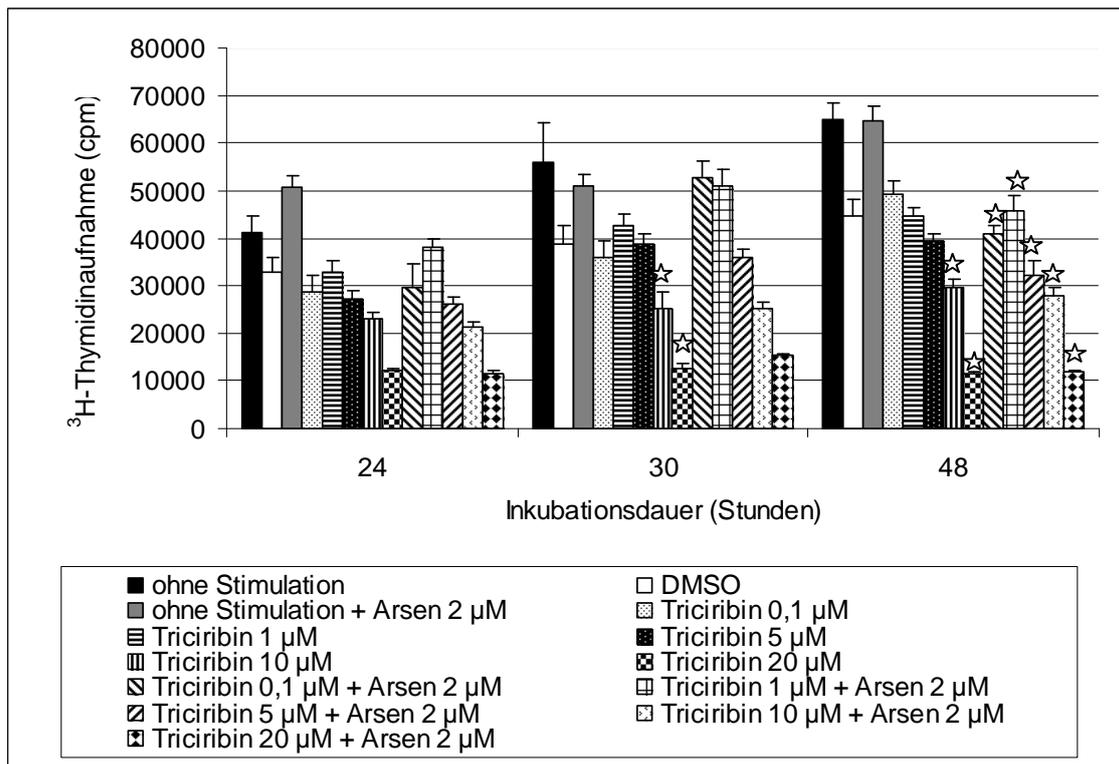


Abbildung 47: Einfluss von Triciribin (0,1; 1; 5; 10 und 20 μM) und Triciribin (0,1; 1; 5; 10 und 20 μM) + Arsentrioxid (2 μM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=8$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.36 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

4.3 Immunzytochemischer Nachweis von NIS und Pendrin

Die Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 wurden mit folgenden Substanzen stimuliert: Retinol 3,2 μM ; Retinsäure 0,5 μM ; Mevinolin 50 μM ; Valproinsäure 1 mM; Troglitazon 10 μM ; Apicidin 200 nm; APHA 5 μM ; Rosiglitazon 10 μM ; Pioglitazon 10 μM ; 5-Aza-deoxycytidin 5 μM ; Arsentrioxid 2 μM ; Akt-Inhibitor A 2 μM ; Akt-Inhibitor A 2 μM + Arsentrioxid 2 μM ; Triciribin 20 μM und Triciribin 20 μM + Arsentrioxid 2 μM . Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte, mit Methanol

(Lösungsmittel für Retinol und Retinsäure), mit Ethanol (Lösungsmittel für Mevinolin) und mit DMSO (Lösungsmittel für Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon, 5-Aza-deoxycytidin, Akt-Inhibitor A und Triciribin) stimulierte Zellen. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Die Ergebnisse sind in den Abb. 48, 49, 50, 51, 52 und 53 zu sehen.

Als zusätzliche Kontrolle dienten unstimulierte Thyreozyten, welche zum Zeitpunkt der Aussaat auf die Objektträger übertragen wurden (Nullwert). Diese Kontrollgruppe war auch die primäre Vergleichsgruppe. Parallel hierzu wurde bei den Thyreozyten, die mit den oben erwähnten Substanzen stimuliert wurden, die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymidinaufnahme nach 6-, 24-, 30- und 48-stündiger Inkubation gemessen. Alle Schilddrüsenzellen entstammen einer Population. Die Ergebnisse in Abhängigkeit von der Konzentration der Stimulanzien und der Inkubationszeit sind in den Abb. 54, 55, 56, 57, 58 und 59 zu sehen.

Nach 24 Stunden kam es bei den mit Arsentrioxid, Triciribin, Troglitazon und APHA stimulierten Thyreozyten zu einer erhöhten NIS-Protein-Expression im Vergleich zum Nullwert (Abb. 48 und 50). Besonders hervorzuheben sind allerdings die Substanzen Retinol, Mevinolin und Valproinsäure, bei denen es sogar annähernd zu einer Verdopplung der NIS-exprimierenden Zellen kam (Abb. 48). Nach 48 Stunden konnte eine leicht gesteigerte NIS-Expression unter Apicidin beobachtet werden (Abb. 51). Mindestens doppelt so viel angefärbte Zellen im Vergleich zum Nullwert konnte bei den Substanzen Retinol, all-trans-Retinsäure, Valproinsäure und Mevinolin gefunden werden (Abb. 49). Unter Akt-Inhibitor A, Triciribin und Rosiglitazon war ebenfalls eine erhöhte NIS-Expression zu sehen (Abb. 51 und 53).

Bei der Pendrin-Expression zeichnete sich schon nach 24 Stunden unter den Substanzen Retinol, all-trans-Retinsäure, Mevinolin und Valproinsäure eine Erhöhung gegenüber der Kontrolle ab, aber erst nach 48 Stunden die Expression unter allen Substanzen eindeutig erhöht (Abb. 48 und 49). Des Weiteren war noch gegenüber dem Nullwert eine gesteigerte Pendrin-Expression bei Pioglitazon (48 Stunden/Abb. 51), Akt-Inhibitor A (24 Stunden/Abb. 52), Triciribin (48 Stunden/Abb.53) zu beobachten.

Abb. 48:

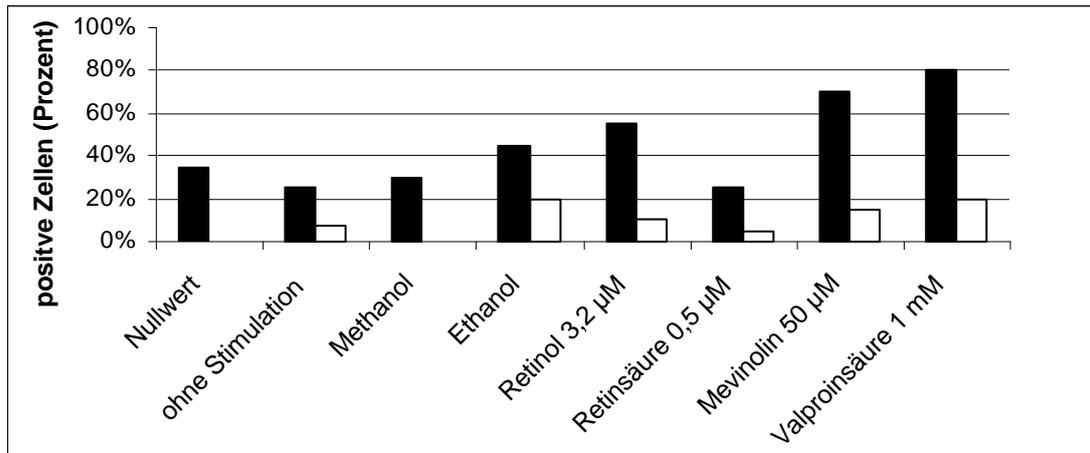


Abb. 49:

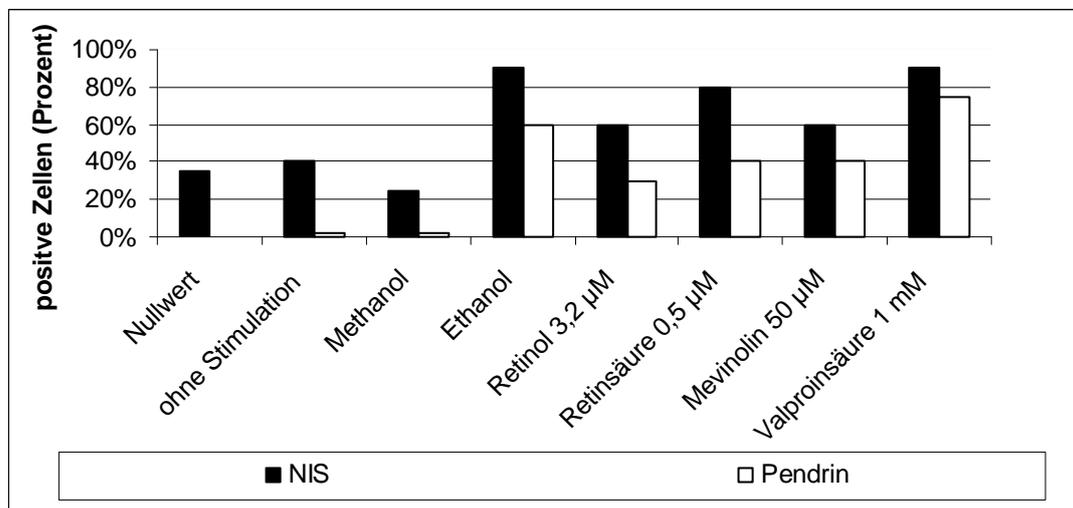


Abbildung 48 und 49: Einfluss von Retinol 3,2 µM, Retinsäure 0,5 M, Mevinolin 50 µM und Valproinsäure 1 mM auf die Expression des NIS-Symporters und des apikalen Iodidtransporter Pendrin nach einer Inkubationszeit von 24 (Abb. 48) und 48 (Abb. 49) Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Dargestellt sind die positiv gewerteten Zellen in Prozent. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 37 und 38 im Anhang).

Abb. 50:

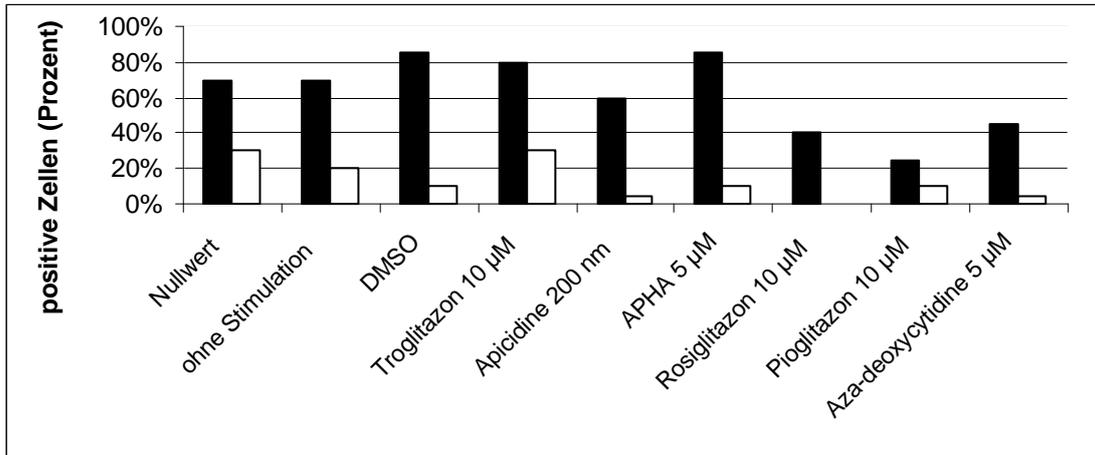


Abb. 51:

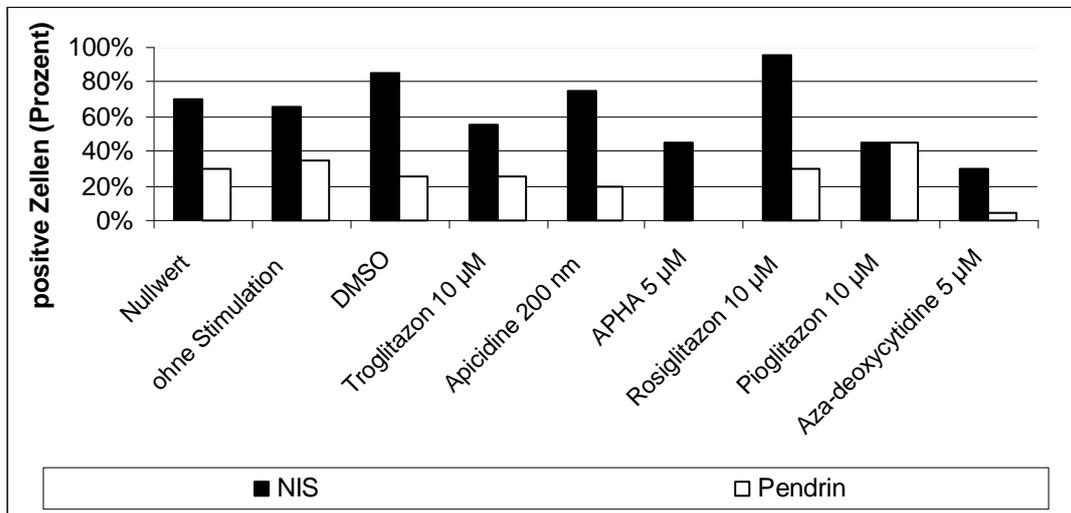


Abbildung 50 und 51: Einfluss von Troglitazon 10 µM, Apicidin 200 nm, APHA 5µM, Rosiglitazon 10 mM, Pioglitazon und 5-Aza-deoxycytidin 5 µM auf die Expression des NIS-Symporters und des apikalen Iodidtransporter Pendrin nach einer Inkubationszeit von 24 (Abb. 50) und 48 (abb. 51) Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Dargestellt sind die positiv gewerteten Zellen in Prozent. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 39 und 40 im Anhang).

Abb. 52:

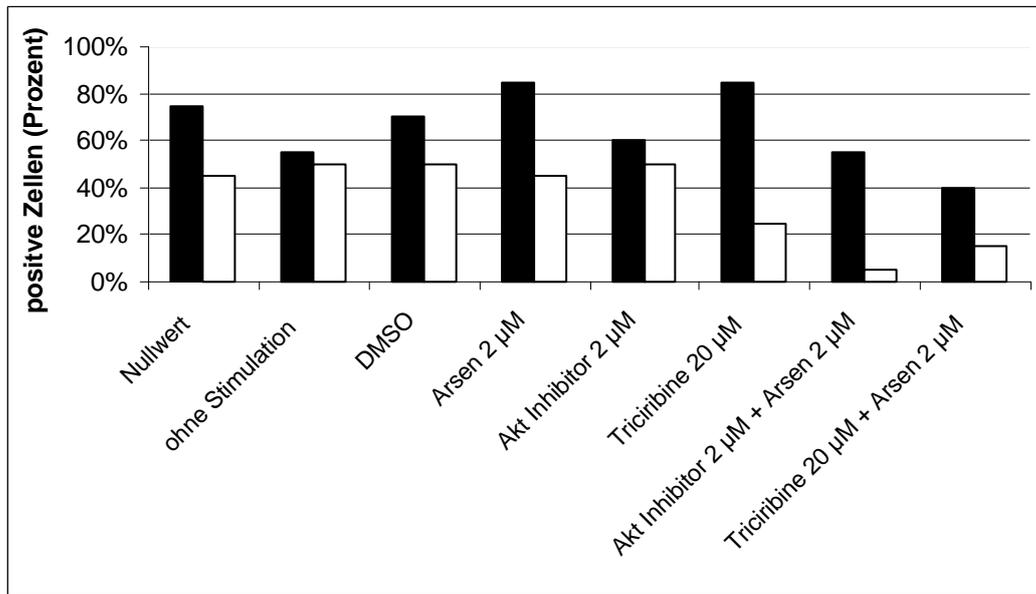


Abb. 53:

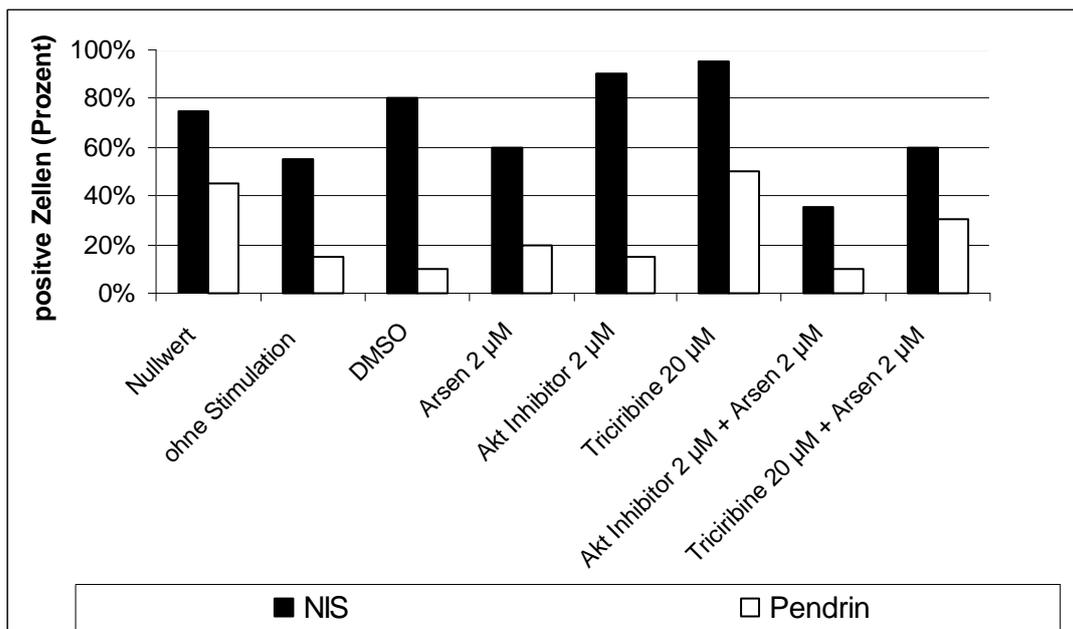


Abbildung 52 und 53: Einfluss von Arsentrioxid 2 µM, Akt-Inhibitor A 2 µM, Triciribin 20 µM, Akt-Inhibitor A 2 µM + Arsentrioxid 2 mM und Triciribin 20 µM + Arsen 2 µM auf die Expression des NIS-Symporters und des apikalen Iodidtransporter Pendrin nach einer Inkubationszeit von 24 (Abb. 52) und 48 (Abb. 53) Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Dargestellt sind die positiv gewerteten Zellen in Prozent. (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 41 und 42 im Anhang).

Wie in Abb. 54 zu sehen, kam es nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden nur unter 50 µM Mevinolin zu einer signifikant erhöhten ¹²⁵I-Iodidaufnahme. Nach 24 Stunden war die ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter all-trans-Retinsäure (0,5 µM), so-

wie nach 48 Stunden auch unter den Substanzen Mevinolin (50 µM) und Valproinsäure (1 mM) signifikant vermindert. Nach 30 Stunden fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Iodidaufnahme.

Abb. 55 zeigt nach einer Inkubationsdauer von 6 Stunden eine signifikant erhöhte ¹²⁵I-Iodidaufnahme unter den Stimulanzen Rosiglitazon 10 µM, Pioglitazon 10 µM, APHA 5 µM und Apicidin 200 nM. Mit zunehmender Inkubationsdauer nahm diese initial gesteigerte ¹²⁵I-Iodidaufnahme jedoch ab und es waren dann keine weiteren signifikanten Unterschiede mehr zu beobachten.

Abb. 56 zeigt nur unter Akt-Inhibitor A 2 µM + Arsentrioxid 2 µM eine signifikante Steigerung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme. Bei allen anderen Stimulanzen kam es zu keinem Messzeitpunkt zu einer sicheren Änderung Iodidaufnahme.

Wie Abb. 57 zeigt, ist nach einer Inkubationszeit von 6, 24 und 30 Stunden ein sehr starker Anstieg der ³H-Thymidinaufnahme bei den mit Valproinsäure behandelten Zellen zu beobachten. Signifikant sind diese Unterschiede zur Kontrolle nach 6 und 30 Stunden. Eine signifikant verminderte Thymidinaufnahme zeigt sich nach 6 und 24 Stunden unter Mevinolin 50 µM, Retinol 3,2 µM und Retinsäure 0,5 µM. Nach einer Inkubationsdauer von 30 Stunden kommen noch Mevinolin 50 µM hinzu und nach 48 Stunden auch Valproinsäure (1 mM).

Wie Abb. 58 zeigt, ist nach einer Inkubation von 6 Stunden ein signifikanter Anstieg des ³H-Thymidineinbaus unter Troglitazon 10 µM, Rosiglitazon 10 µM, Pioglitazon 10 µM und 5-Aza-deoxycytidin 5 µM zu beobachten. Nach 24-stündiger Inkubation kam es nur noch unter APHA 5 µM und 5-Aza-deoxycytidin 5 µM zu einer signifikant gesteigerten ³H-Thymidinaufnahme. Nach 30 Stunden kam es unter allen Stimulanzen, außer APHA 5 µM, zu einer verminderten Thymidinaufnahme. Nach 48 Stunden fand sich nur unter Pioglitazon 10 µM eine Steigerung der ³H-Thymidinaufnahme.

Abb. 59 zeigt weder nach 6 noch nach 24 Stunden Inkubation signifikante Unterschiede in der ^3H -Thymidinaufnahme. Nach einer Inkubation von 30 Stunden kam es nur unter Akt-Inhibitor A $2\ \mu\text{M}$ + Arsentrioxid $2\ \mu\text{M}$ zu einer signifikant gesteigerten Thymidininkorporation. Zu einer signifikant verminderten ^3H -Thymidinaufnahme kam es nur nach 48 Stunden unter der Substanz Triciribin $20\ \mu\text{M}$.

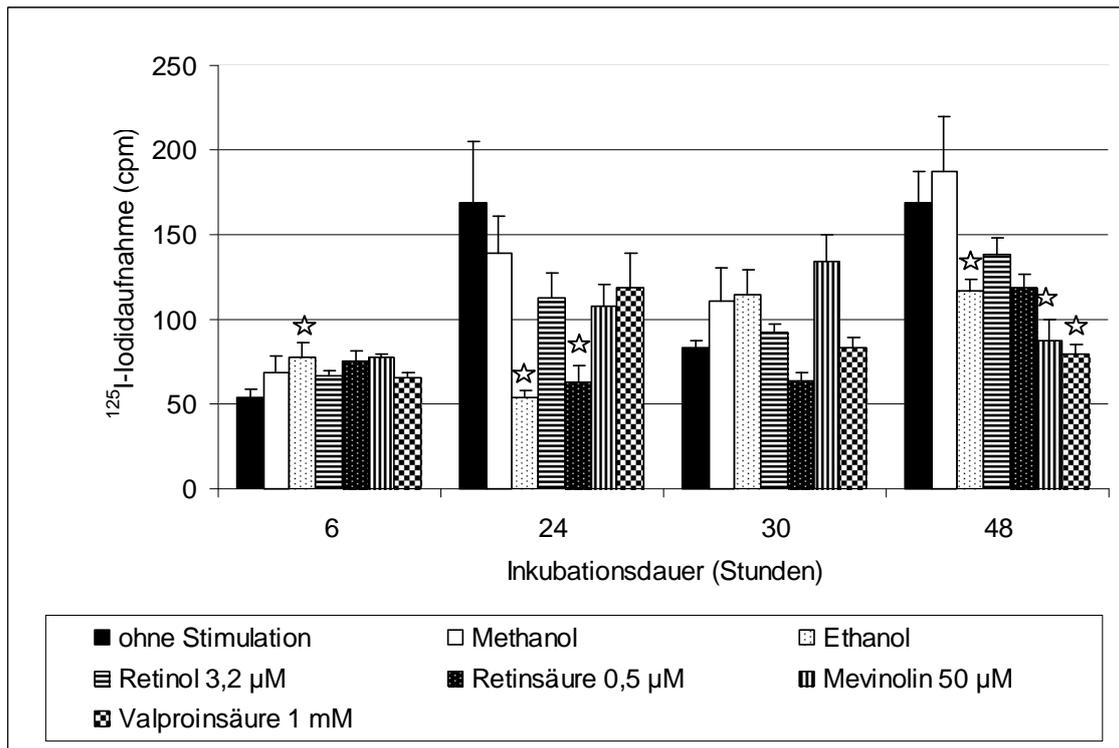


Abbildung 54: Einfluss von Retinol $3,2\ \mu\text{M}$, Retinsäure $0,5\ \mu\text{M}$, Mevinolin $50\ \mu\text{M}$ und Valproinsäure $1\ \text{mM}$ auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt $t=0$). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, $n=8$. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 133 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 43 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

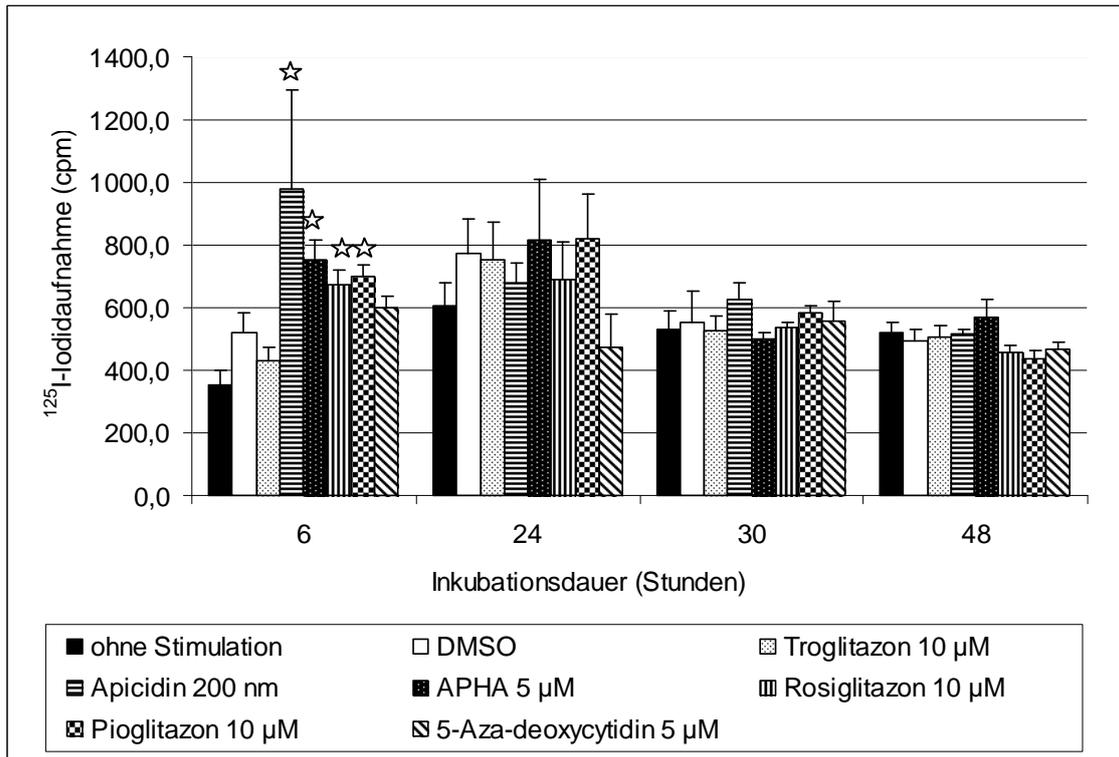


Abbildung 55: Einfluss von Troglitazon 10 µM, Apicidin 200 nm, APHA 5 µM, Rosiglitazon 10 µM, Pioglitazon 10 µM und 5-Aza-deoxycytidin 5 µM auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ¹²⁵I-Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 133 000, ¹²⁵I-Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 44 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

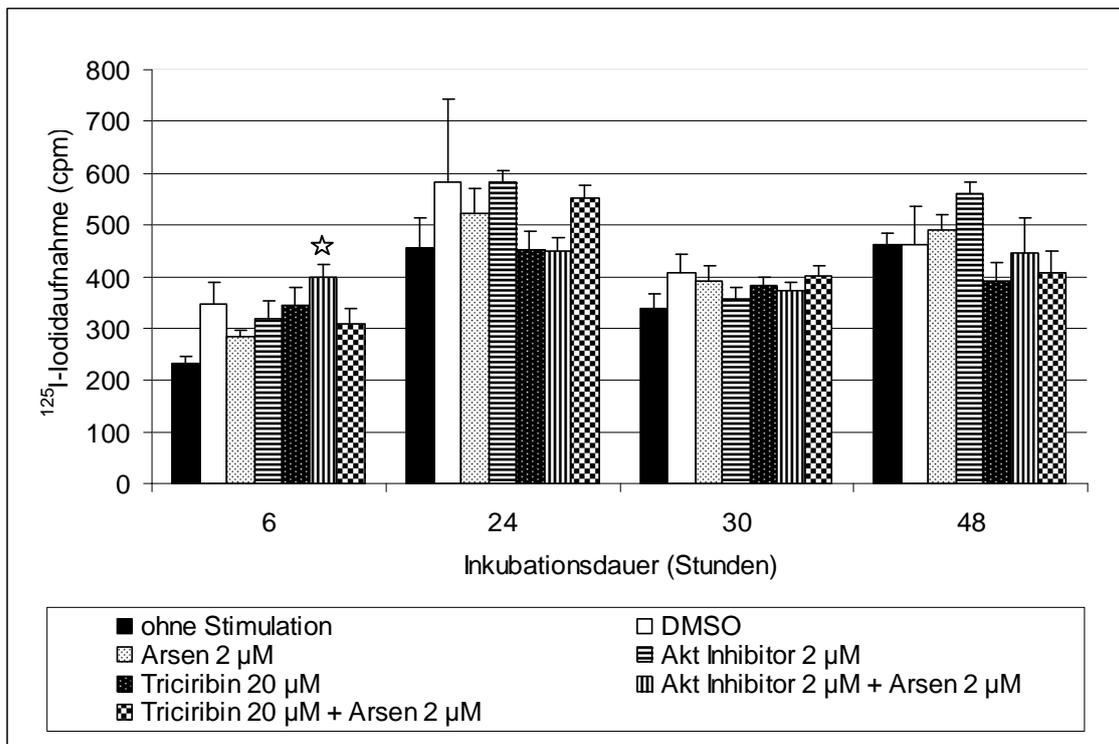


Abbildung 56: Einfluss von Arsentrioxid 2 μM , Akt-Inhibitor A 2 μM , Triciribin 20 μM , Akt-Inhibitor A 2 μM + Arsentrioxid 2 μM und Triciribin 20 μM + Arsen 2 μM auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 133 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 45 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

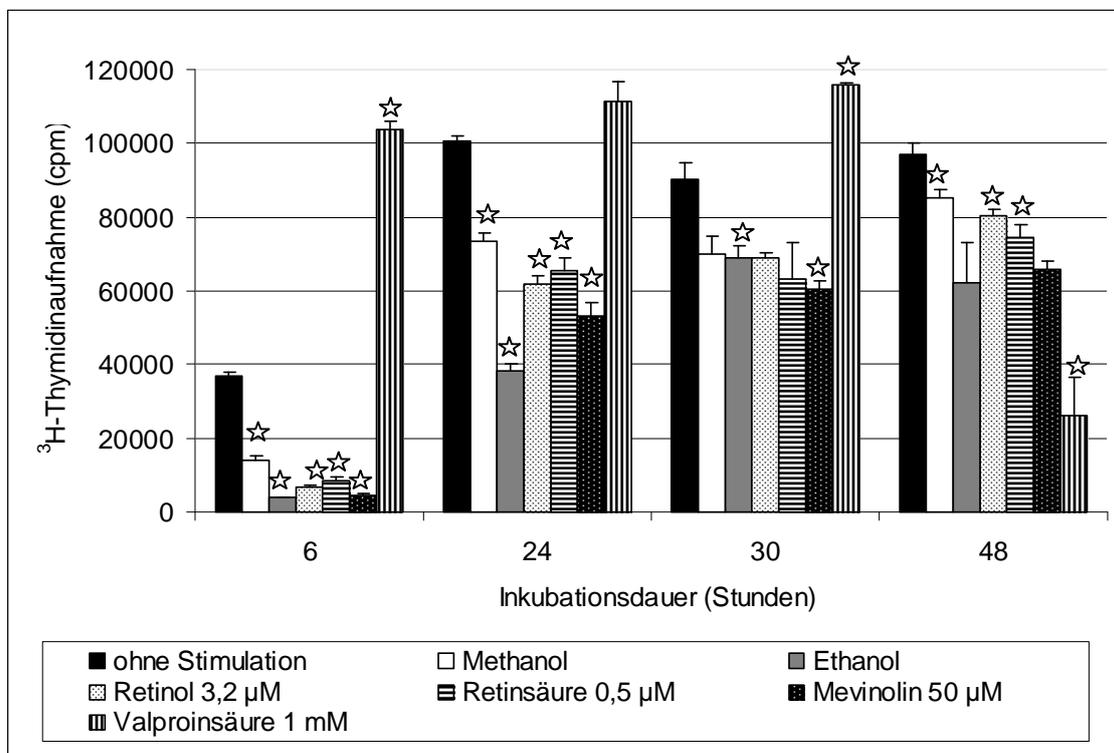


Abbildung 57: Einfluss von Retinol 3,2 μM , Retinsäure 0,5 μM , Mevinolin 50 μM und Valproinsäure 1 mM auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 46 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

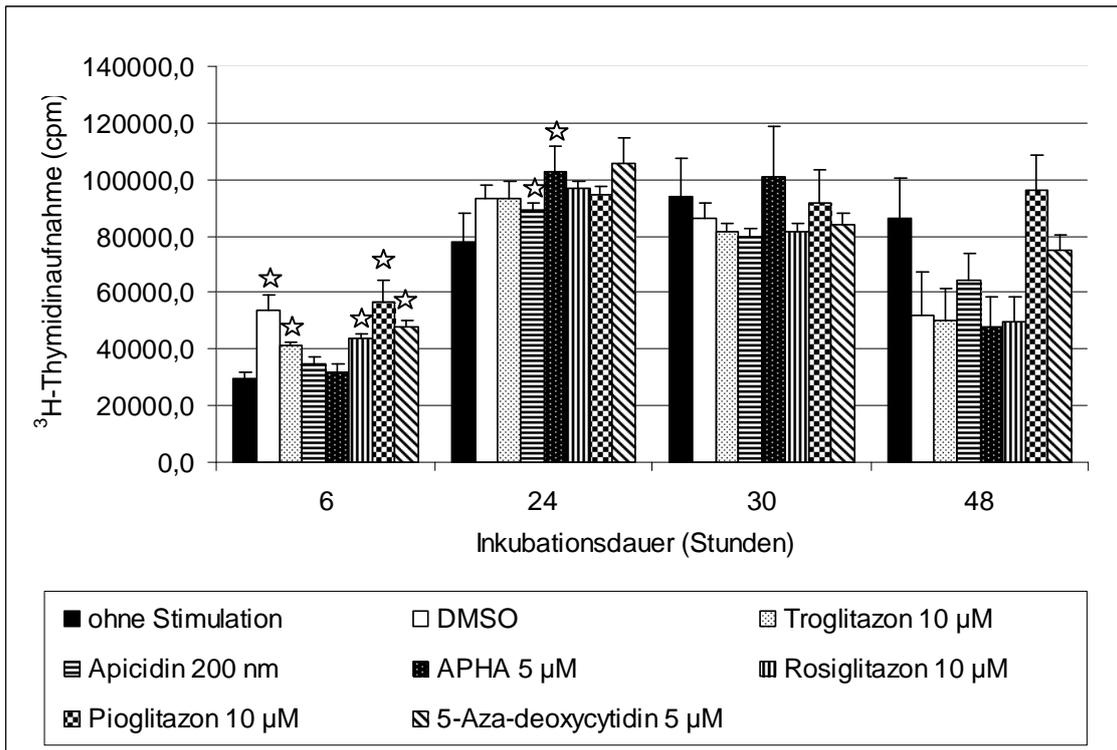


Abbildung 58: Einfluss von Troglitazon 10 µM, Apicidin 200 nm, APHA 5 µM, Rosiglitazon 10 mM, Pioglitazon 10 µM und 5-Aza-deoxycytidin 5 µM auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0). Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.47 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

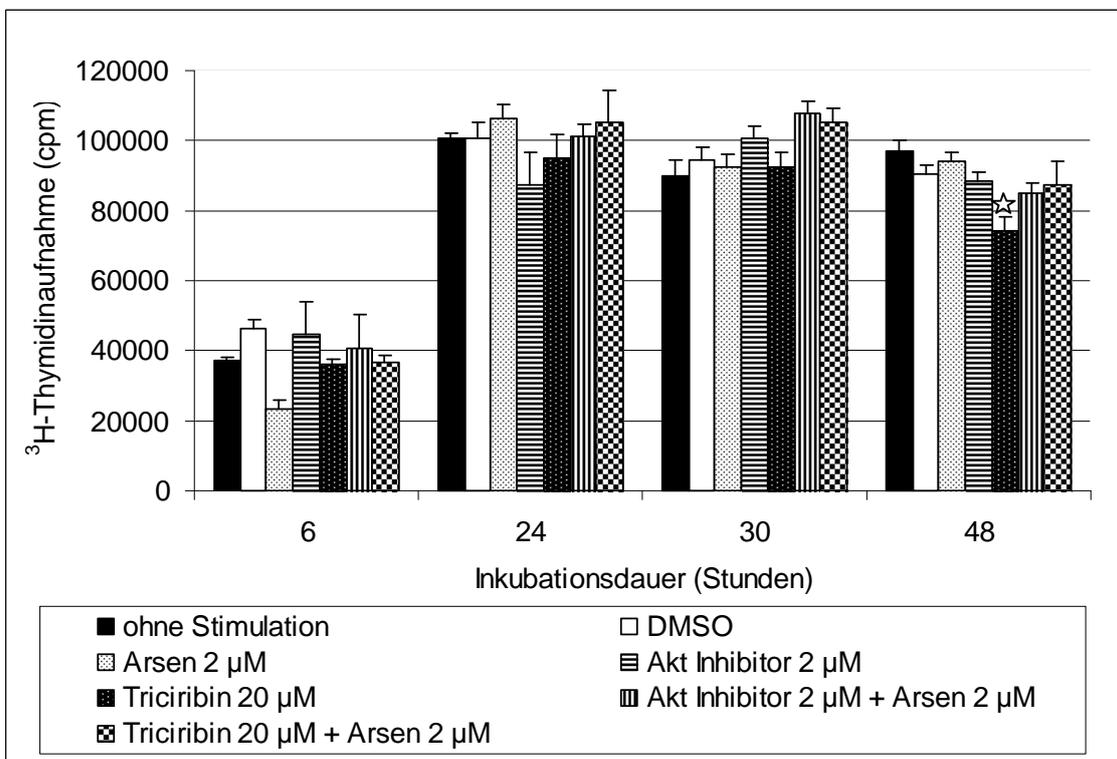


Abbildung 59: Einfluss von Arsentrioxid 2µM, Akt-Inhibitor A 2 µM, Triciribin 20 µM, Akt-Inhibitor A + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM und Triciribin + Arsentrioxid 20 µM und 2 µM auf die ³H-Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt t=0) . Gemessen wurde die ³H-Thymidinaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ³H-Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 48 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

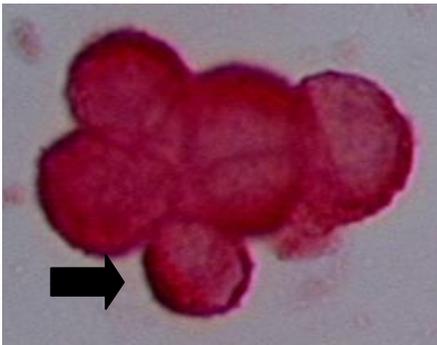


Abbildung 60: NIS-Färbung von Valproinsäure-stimulierten malignen Thyreozyten nach 48 Stunden Inkuabtion

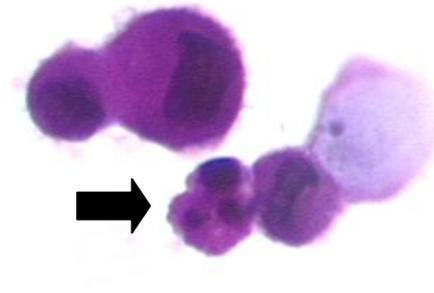


Abbildung 61: apoptotischer Thyreozyt nach 48 Stunden Inkubation mit Retinsäure 0,5 µM (HE-Färbung)

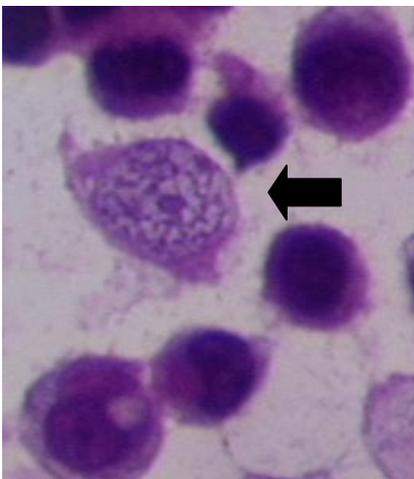


Abbildung 62: nekrotischer Thyreozyt nach 48-stündiger Inkubation ohne jegliche Stimulation (HE-Färbung)



Abbildung 63: Pendrin-Färbung von Retinol-stimulierten Thyreozyten nach 24 Stunden Inkubation

4.4 Nachweis von NIS-Symporter und Pendrin-Transporter mittels Westernblot

Die kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit den Substanzen Retinol 3,2 μM , all-trans-Retinsäure 0,5 μM , Mevinolin 50 μM , 5-Aza-deoxycytidin 5 μM und Arsentrioxid 2 μM stimuliert und für 24, 30 und 48 Stunden inkubiert. Zum Beweis, dass es sich bei den nachgewiesenen Proteinen um NIS und Pendrin handelt, wurden Westernblots durchgeführt, welche die angefärbten Proteine im richtigen Molekulargewichtsbereich zeigen. Hierfür musste als Molekulargewichtsmarker, ein sogenannter High Molecular Weight Marker mitlaufen. Dieser enthält verschiedene Markerproteine, welche in ihrem Molekulargewicht den nachzuweisenden Proteinen ähneln und somit zum Vergleich herangezogen werden können. So entspricht NIS mit einem Molekulargewicht von 80 000-90 000 Dalton dem Markerprotein Transferrin (Molekulargewicht: 76 000 Dalton) und Pendrin mit einem Molekulargewicht von 110-115/ 120-140 kDalton dem Markerprotein α -Galaktosidase (116 000 Dalton). Die Veränderungen durch die Substanzen wurden nicht quantifiziert, sondern nur per Auge beurteilt. Sowohl nach 24 als auch nach 30 Stunden konnte keine Bandenbildung bei 80-90 kDalton (NIS) detektiert werden. Erst nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden (Abb. 64a und 64b) kam es bei den Thyreozyten unter all-trans-Retinsäure 0,5 μM zu stärkeren Bande bei 80-90 kDalton. Die beobachteten Anstiege in der Bandenintensität stehen im Einklang mit den immunzytochemischen Daten.

Beim Pendrin-Nachweis mittels Westernblot konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden.

Zahlenwerte:

1	ohne Stimulation	2	Ethanol
3	Methanol	4	DMSO
5	Retinol 3,2 μM	6	Retinsäure 0,5 μM
7	Mevinolin 50 μM	8	5-Aza-deoxycytidin 5 μM
9	Arsen 2 μM		

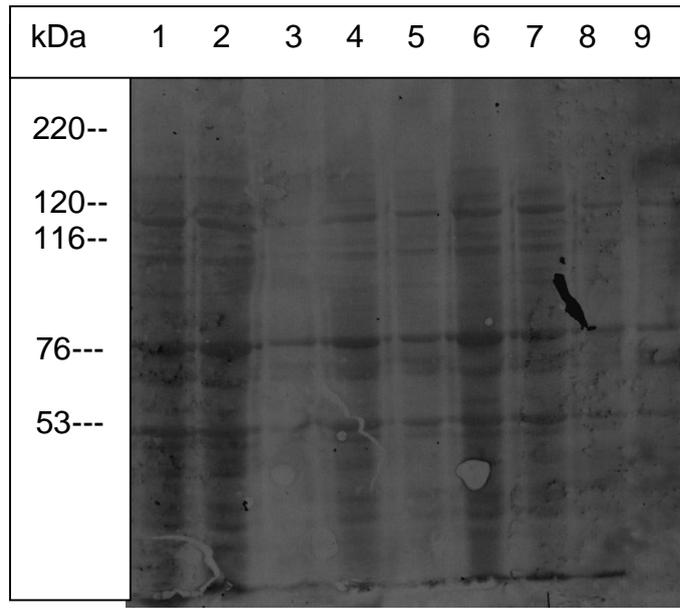


Abb. 64a: Einfluss von Retinol 3,2 μ M, all-trans-Retinsäure 0,5 μ M, Mevinolin 50 μ M, 5-Aza-deoxycytidin 5 μ M und Arsentrioxid 2 μ M auf die Expression des NIS-Proteins bei kultivierten kanzerogenen humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden. Zugabe der Stimulanzen beim Aussäen. Darstellung von Blots einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels Ponceaurot-Färbung. Es wurde jeweils 30 μ g Protein pro Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese lief 120 min bei 80 mV, danach wurde das Blotting bei 80 mA 120 min lang durchgeführt. Als Marker lief ein High Molecular Weight Marker mit.

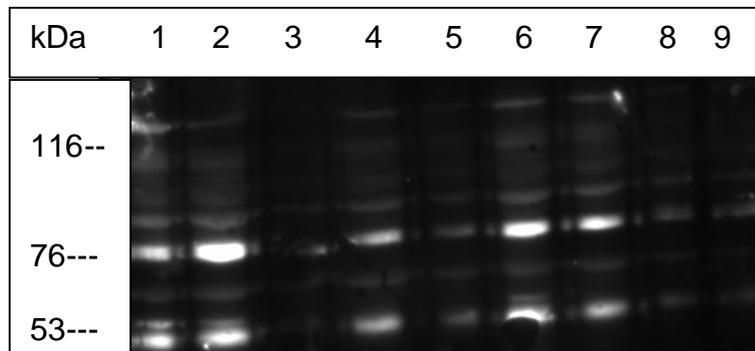


Abb. 64b: Einfluss von Retinol 3,2 μ M, all-trans-Retinsäure 0,5 μ M, Mevinolin 50 μ M, 5-Aza-deoxycytidin 5 μ M und Arsentrioxid 2 μ M auf die Expression des NIS-Protein bei kultivierten kanzerogenen humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden. Zugabe der Stimulanzen beim Aussäen. Darstellung von Blots einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels ECL-Entwicklung. Es wurde jeweils 30 μ g Protein pro Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese lief 120 min bei 80 mV, danach wurde das Blotting bei 80 mA 120 min lang durchgeführt. Als Marker lief ein High Molecular Weight Marker mit.

4.5 Beeinflussung der Apoptose rate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene Differenzierungssubstanzen

Die Zelllinie ONCO-DG 1 wurden mit den folgenden Differenzierungssubstanzen stimuliert: Retinol 3,2 μ M; all-trans-Retinsäure 0,5 μ M; 5-Aza-deoxycytidin 5

μM ; Mevinolin $50 \mu\text{M}$; Akt-Inhibitor A $2 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ sowie Akt-Inhibitor A $2 \mu\text{M}$, $5 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ + Arsentrioxid $2 \mu\text{M}$. Danach wurde die Apoptoserate der Schilddrüsenzellen im Durchfluss-Zytometer nach 24- und 48-stündiger Inkubation gemessen. Als Kontrollgruppen fungierten unstimulierte Zellen, wie auch Zellen, die mit Staurosporin oder mit H_2O_2 stimuliert wurden. Abbildung 65a und 66a zeigt die Apoptoseraten in Abhängigkeit von der Zellzahl und der Inkubationsdauer (Statistik im Anhang Tab. 49,50, 53 und 54).

Zu Abbildung 65a:

Wurden die malignen Thyreozyten mit Mevinolin $50 \mu\text{M}$ stimuliert, war nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate (22,5%) im Vergleich zu den unstimulierten Schilddrüsenzellen (Apoptoserate: 10,5%) zu beobachten. Auch bei den Stimulanzen Retinol $3,2 \mu\text{M}$ und 5-Aza-deoxycytidin $5 \mu\text{M}$ war eine leicht erhöhte Apoptoserate zu vermerken.

Nach 48-stündiger Inkubationszeit zeigt sich eine deutlich signifikante Steigerung der Apoptoserate bei Mevinolin $50 \mu\text{M}$ (82,9%; Kontrolle: 22,8%). Eine weitere allerdings nur marginale Steigerung kam bei den mit 5-Aza-deoxycytidin $5 \mu\text{M}$ inkubierten Zellen zum Vorschein (Apoptoserate: 23,8%). Wurden die Thyreozyten mit all-trans-Retinsäure $0,5 \mu\text{M}$ stimuliert kam es zu einer signifikanten Verminderung der Apoptoserate (7,5%) im Vergleich zu den unstimulierten Zellen (Apoptoserate: 22,8%). Bei der Substanz Retinol $3,2 \mu\text{M}$ kam es ebenfalls zu einer leicht verminderten Apoptoserate (21,5%; Kontrolle: 22,8%).

Des Weiteren wurde zu den untersuchten Stimulanzen auch die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymidinaufnahme nach 24-, 30- und 48-stündiger Inkubation gemessen. Alle Zellen entstammten einer Population. Die Darstellung der Ergebnisse in Abhängigkeit von den Konzentrationen der Stimulanzen und der Inkubationszeit ist in Abb. 65b und 65c zu sehen (Statistik im Anhang Tab. 50 und 51).

Wie in Abb. 65b zu sehen, kam es nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der ^{125}I -Iodidaufnahme unter den Substanzen all-trans-Retinsäure $0,5 \mu\text{M}$ und 5-Aza-deoxycytidin $5 \mu\text{M}$. Nach 30 und 48

Stunden stellte sich eine verminderte Iodidaufnahme bei den behandelten Zellen ein. Diese Unterschiede sind bis auf die 48 Stunden lang mit Mevinolin 50 μM behandelten Zellen jedoch nicht signifikant.

Abb. 65c zeigt nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Steigerung der ^3H -Thymidinaufnahme unter Retinol 3,2 μM und 5-Aza-deoxycytidin 5 μM . 5-Aza-deoxycytidin 5 μM bewirkte auch noch nach 30 Stunden eine signifikante Steigerung der Thymidinaufnahme. Mevinolin 50 μM bewirkte in der ganzen Beobachtungszeit eine signifikante Verminderung der Thymidininkorporation.

Zu Abbildung 66a:

Hier kam es nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden zu signifikant erniedrigten Apoptoseraten unter allen eingesetzten Substanzen Arsentrioxid: 7,9%; Akt-Inhibitor A 2 μM : 5,3%; Akt-Inhibitor A 5 μM : 7%; Akt-Inhibitor A 10 μM : 10%; Akt-Inhibitor A 2 μM + Arsentrioxid 2 μM : 8,5%; Akt-Inhibitor A 5 μM + Arsentrioxid 2 μM : 9,7%; Akt-Inhibitor A 10 μM + Arsentrioxid 2 μM : 7,2%; Valproinsäure 1 mM: 5,3%; Valproinsäure 0,5 mM: 5% im Vergleich zur Kontrolle (Apoptoserate: 14,3%).

Auch nach 48-stündiger Inkubation kam es zu signifikant erniedrigten Apoptoseraten unter allen eingesetzten Stimulanzien (Arsentrioxid 2 μM : 28%; Akt-Inhibitor A 2 μM : 16,4%; Akt-Inhibitor A 5 μM : 17,9%; Akt-Inhibitor A 2 μM + Arsentrioxid 2 μM : 28,6%; Akt-Inhibitor A 5 μM + Arsentrioxid 2 μM : 31,8%; Akt-Inhibitor A 10 μM + Arsentrioxid 2 μM : 20,2%; Valproinsäure 1 mM: 13,6% und Valproinsäure 0,5 mM: 18,9%) mit Ausnahme des Akt-Inhibitor A 10 μM . Hier kam es zu einer signifikant gesteigerten Apoptoserate (41,6%) im Vergleich zur Kontrolle (Apoptoserate: 35%).

Des Weiteren wurde zu den untersuchten Stimulanzien auch die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymidinaufnahme nach 24-, 30- und 48-stündiger Inkubation gemessen. Alle Zellen entstammten einer Population. Die Ergebnisse in Abhängigkeit von den Stimulationskonzentrationen und der Inkubationszeit sind in Abb. 66b und 66c zu sehen.

Abb. 66b zeigt keine signifikante Steigerung oder Verminderung der ^{125}I -Iodid-aufnahme bei den mit Akt-Inhibitor behandelten Zellen. Unter Arsentrioxid $2\ \mu\text{M}$ war der Thymidineinbau nach 6 Stunden allerdings signifikant vermindert.

In Abb. 66c kommt es nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zu keinem sicheren Unterschied zwischen den unstimulierten und der stimulierten Zellen in der ^{125}I -Iodidaufnahme. Dasselbe war auch nach der 30-Stunden-Inkubation der Fall. Im Gegensatz dazu kam es jedoch nach einer Inkubation von 48 Stunden zu einem deutlichen Abfall der Iodidaufnahme. Signifikant waren hier der Abfall unter Akt-Inhibitor 2 und $5\ \mu\text{M}$.

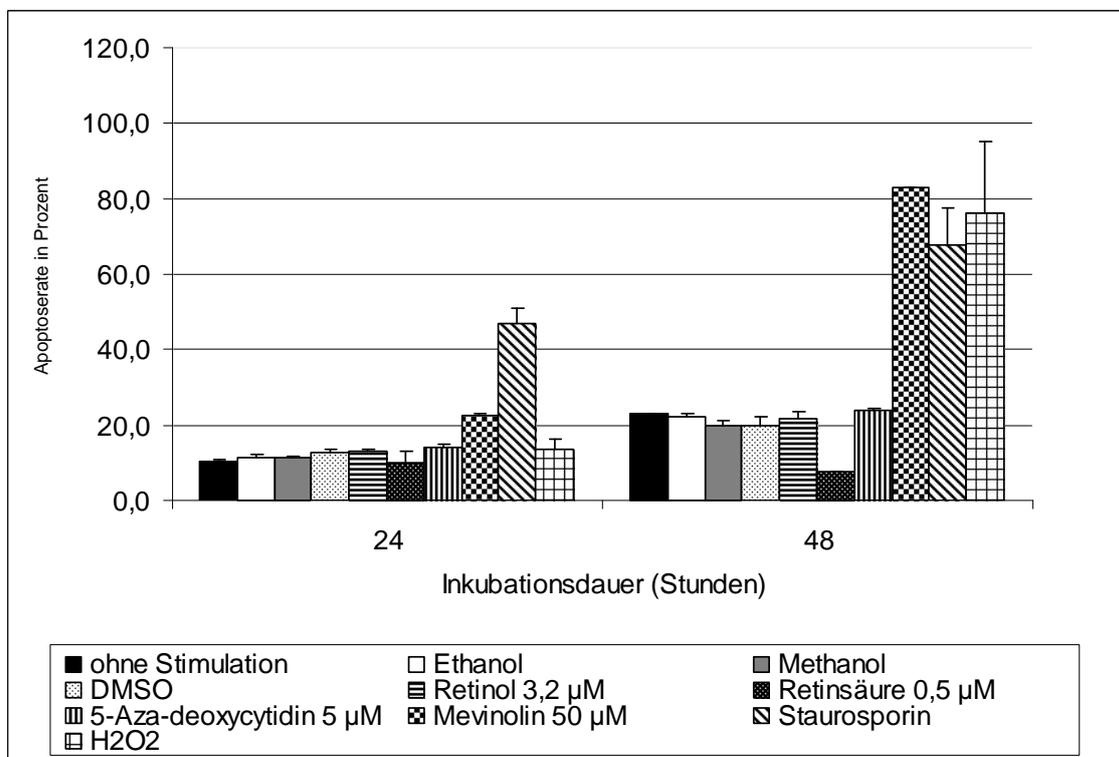


Abbildung 65a: Einfluss von Retinol $3,2\ \mu\text{M}$, Retinsäure $0,5\ \mu\text{M}$, 5-Aza-deoxycytidin $5\ \mu\text{M}$ und Mevinolin $50\ \mu\text{M}$ auf die Apoptoserate der Zelllinie ONCO-DG 1. Zugabe der Stimulantien erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Gemessen wurde die Apoptoserate nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte angegeben in Prozent, $n=3$. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Thyreozyten, sowie Thyreozyten, die mit Staurosporin oder H_2O_2 stimuliert wurden (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 49 und 50 im Anhang).

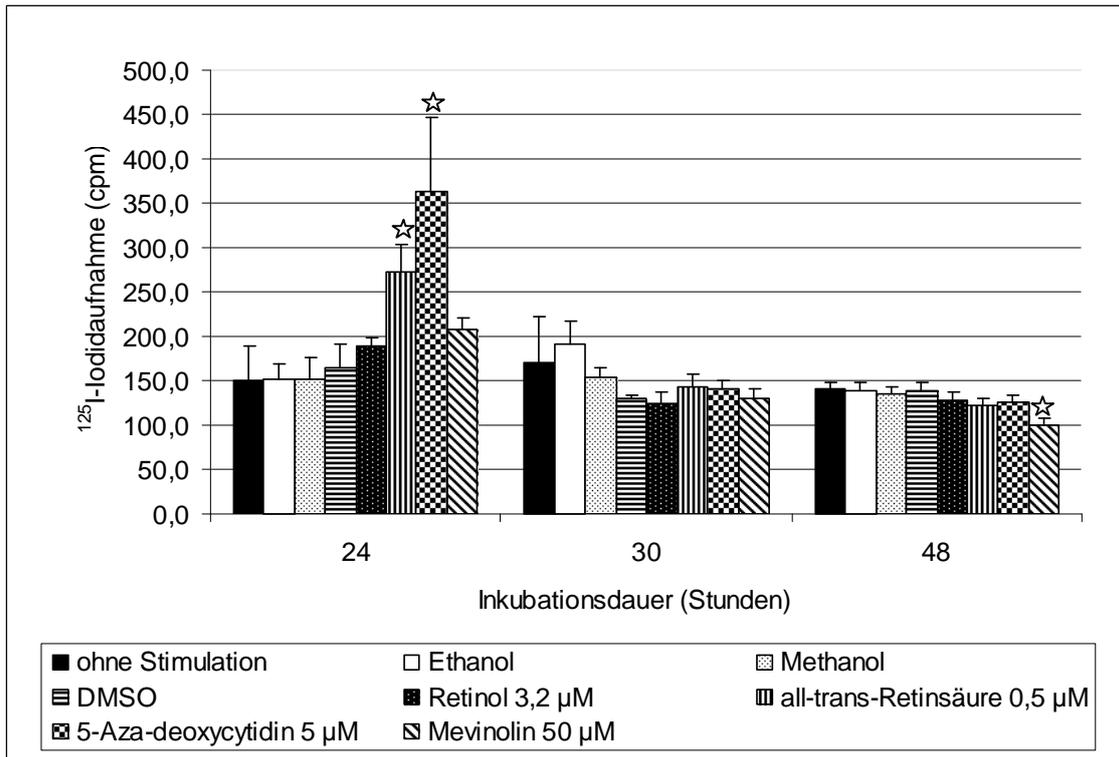


Abbildung 65b: Einfluss von Retinol 3,2 μM , Retinsäure 0,5 μM , 5-Aza-deoxycytidin 5 μM und Mevinolin 50 μM auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 133 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 51 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

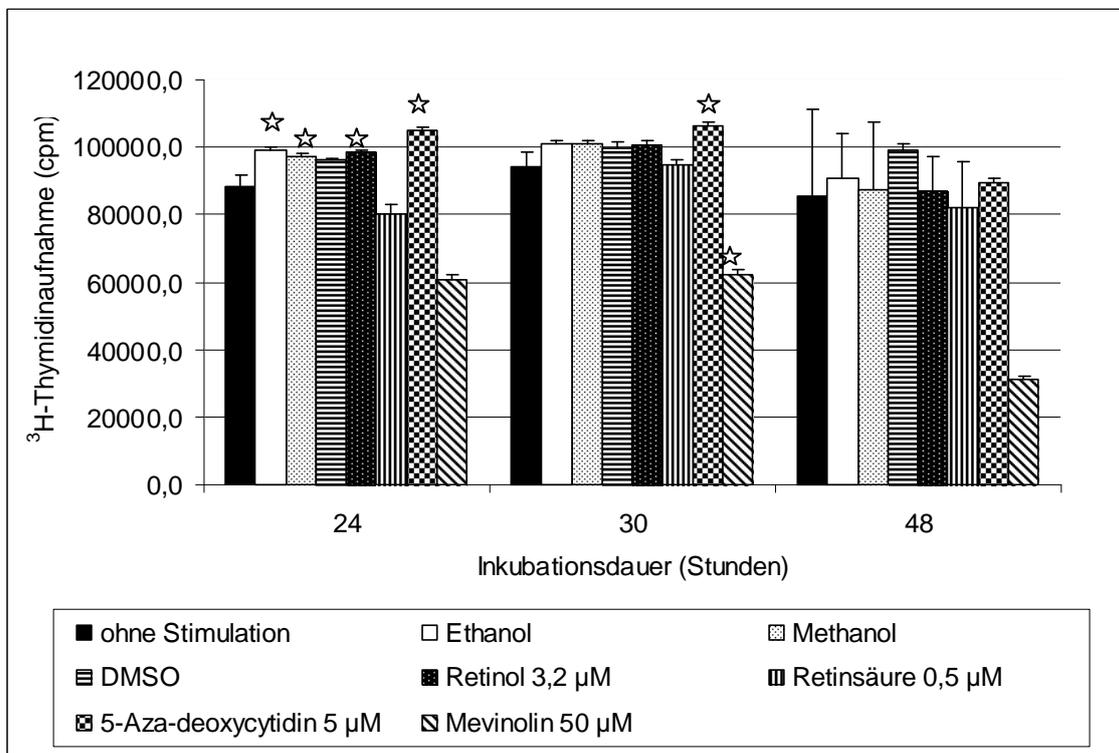


Abbildung 65c: Einfluss von Retinol 3,2 μM , Retinsäure 0,5 μM , 5-Aza-deoxycytidin 5 μM , Mevinolin 50 μM und Arsentrioxid 2 μM auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt=0). Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 52 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

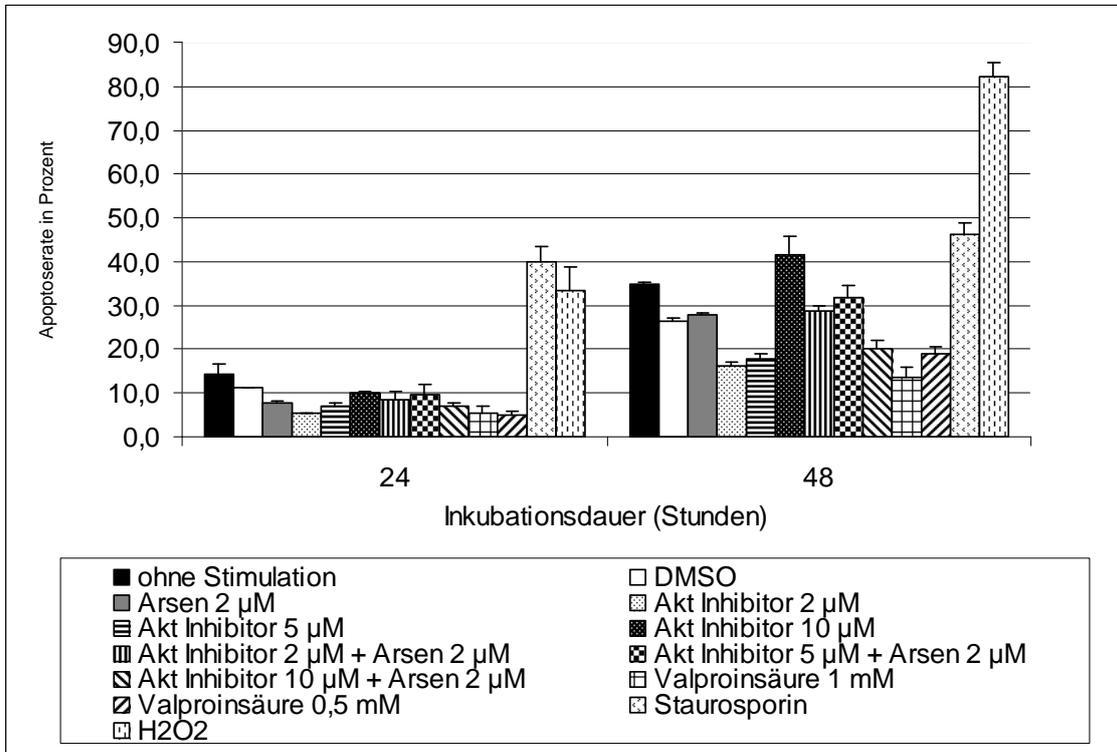


Abbildung 66a: Einfluss von Valproinsäure (1 mM und 0,5 mM), Arsentrioxid 2 μM , Akt-Inhibitor A (2 μM , 5 μM und 10 μM) und Akt-Inhibitor A (2 μM , 5 μM und 10 μM) + Arsentrioxid 2 μM auf die Apoptoserate der Zelllinie ONCO-DG 1. Zugabe der Stimulanzen erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Gemessen wurde die Apoptoserate nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte angegeben in Prozent, n=3. Als Kontrollgruppen dienen unstimulierte Thyreozyten, sowie Thyreozyten, die mit Staurosporin oder H₂O₂ stimuliert wurden (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 53 und 54 im Anhang).

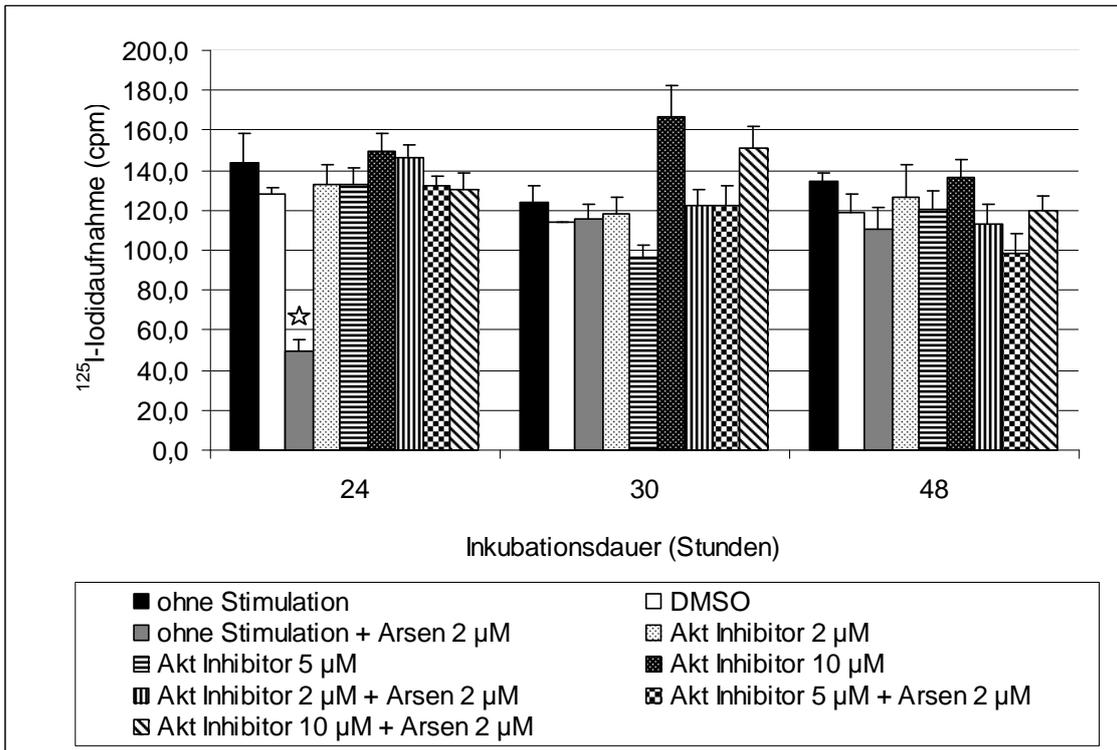


Abbildung 66b: Einfluss von Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) und Akt-Inhibitor B (2, 5 und 10 μM) + Arsentrioxid (2 μM) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt=0). Gemessen wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 133 000, ^{125}I -Iodidzugabe: 4kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 55 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

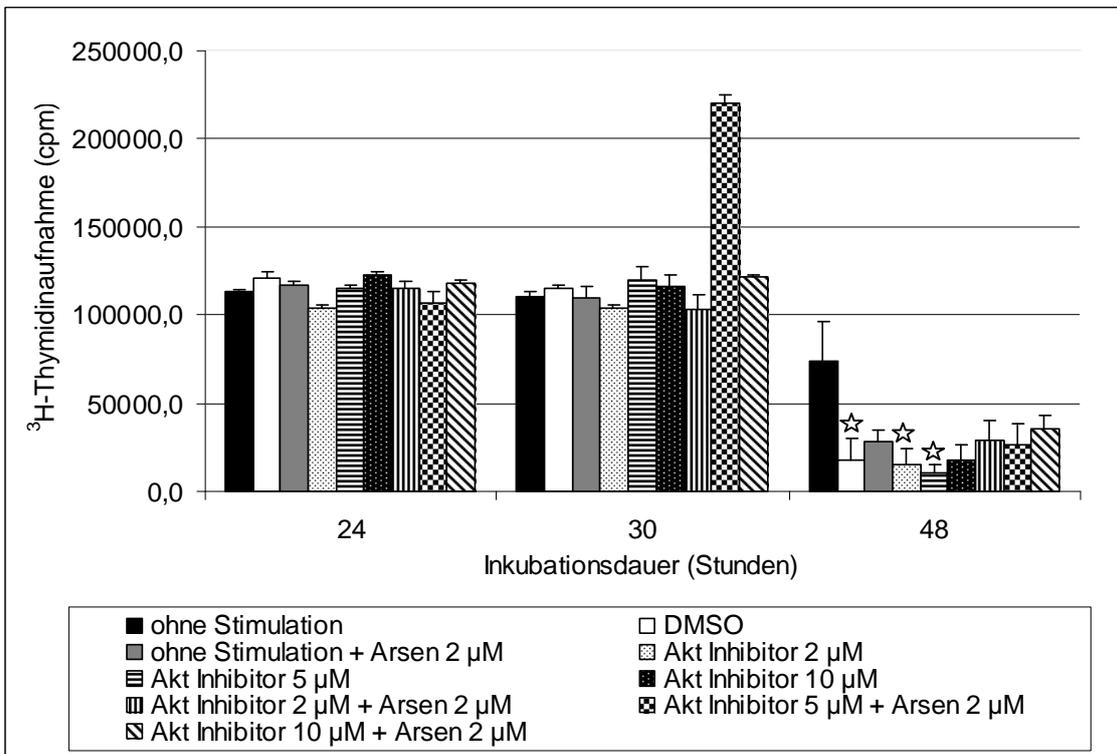


Abbildung 66c: Einfluss von : Einfluss von Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) und Akt-Inhibitor A (2, 5 und 10 μM) + Arsenitoxid (2 μM) auf die ^3H -Thymidinaufnahme in humane maligne Thyreozyten. Stimulation der Thyreozytenkulturen bereits bei der Aussaat (Zeitpunkt=0) . Gemessen wurde die ^3H -Thymidinaufnahme nach 24h, 30h und 48h Inkubationsdauer. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Eingesetzte Zellzahl pro Kulturloch: 65 000, ^3H -Thymidinzugabe: 6kBq (Zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab. 56 im Anhang). Signifikante Werte sind mit ☆ markiert.

5. Diskussion

5.1 Methoden

Es wurde der Einfluss verschiedener Redifferenzierungssubstanzen (s. Kap. 3.8) auf den Stoffwechsel und auf die Iodspeicherung von karzinogenen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 untersucht. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Zellen eines gut differenzierten, azidophilen, papillären Schilddrüsenkarzinoms einer 49-jährigen Frau. Da bei Zelllinien nur in-vitro-Merkmale getestet werden können, ist kein direkter Vergleich mit in-vivo-Eigenschaften möglich.

Da es sich bei den kultivierten malignen humanen Thyreozyten um Klone einer Zelllinie handelt, besitzen sie alle dasselbe genetische Erbgut. Ein Nachteil der Kultivierung ist allerdings das Altern der Klone, wodurch wichtige Erbinformationen verloren gehen können.

Bei der Therapie maligner Schilddrüsentumore werden das entartete Gewebe oder meist die gesamte Schilddrüse sowie die von Tumorzellen befallenen Lymphknoten entfernt. Der abfallende Schilddrüsenhormonspiegel im Blut zieht eine gesteigerte TSH-Sekretion nach sich. Das ist ein Vorteil für die nachfolgende Radioiodtherapie. Durch eine vermehrte Radioiodaufnahme in die restliche Schilddrüse und die verbleibenden Metastasen können durch Bestrahlung von innen die Langzeitüberlebensrate und die Prognose des Patienten verbessert werden. Andererseits haben jedoch karzinogene Thyreozyten die Fähigkeit zur Iodaufnahme meistens verloren (Klutmann et al, 2001). Es stellt sich nicht nur ein geringer intrazellulärer Iodgehalt ein, der eine Proliferation der Schilddrüsenzellen durch die Wachstumsfaktoren EGF und IGF-1 triggern kann (Jockenhövel, 1993; Gärtner, 1992), sondern die malignen Schilddrüsenzellen per se werden auch unzugänglicher für eine Radioiodtherapie. Dadurch wird eine Ausschaltung von Restschilddrüsengewebe nach der Operation, eine Zerstörung nicht operabler Resttumoren und Metastasen mittels Radioiodtherapie erschwert (Reinwein, 1993; Kumar et al., 2003). Eine Verbesserung der Radioiod-

aufnahme lässt sich durch den Einsatz geeigneter Redifferenzierungssubstanzen erzielen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurde die spezifische Leistung der maligne entarteten Thyreozyten unter den eingesetzten Redifferenzierungssubstanzen durch die gemessene ^{125}I -Iodidaufnahme kontrolliert.

Des Weiteren wurde der Einbau von ^3H -Thymidin in die Schilddrüsenzellen untersucht. Die Thymidinaufnahme ist Voraussetzung für das Zellwachstum. Fraglich ist zunächst allerdings, ob das ^3H -Thymidin in die DNS eingebaut oder nur ins Zytosol aufgenommen wird. Bei Untersuchungen an Schweinethyreozytenkulturen konnte gezeigt werden, dass es zu einem Einbau in die DNA kommt (Wahl, 1991). Somit kann die gemessene ^3H -Thymidinaufnahme als Wachstumsparameter gesehen werden.

Bei unseren Untersuchungen wurde die Expression der membranständigen Transporterproteine NIS und Pendrin mittels Immunhistochemie überprüft. NIS ist für den Transport von Iod in die Schilddrüse und Pendrin wahrscheinlich für den Transport von Iod in das Follikellumen entscheidend. Es wurde zunächst angenommen, dass die für Schilddrüsenkrebs typisch erniedrigte Iodidaufnahme mit einer verminderten NIS-Expression zusammenhängt. Im Gegensatz dazu standen allerdings mehrere Berichte, wonach Schilddrüsenkarzinome eine Überexpression von NIS aufwiesen (Aturi et al, 2000; Lazar et al, 1999; Saito et al, 1998). 2001 kamen Dohán et al zu dem Schluss, dass das Protein nicht richtig in die Plasmamembran eingelagert werden kann und somit seine eigentliche Funktion nicht entfalten kann.

Für die Hormonproduktion muss das Iodid in das Follikellumen. Als möglicher Iodidtransporter wird das Pendrin diskutiert. Pendrin gehört zu der Gruppe der Chlorid-Iodid-Transporter (Scott et al, 1999; Bidart et al, 2000) und benötigt im Gegensatz zum NIS keine weitere Energiequelle.

5.2 Wirkung von Retinoiden auf die ^{125}I -Iodidaufnahme, ^3H -Thymidinaufnahme und Apoptoserate der ONCO-DG 1-Zellen

Die Retinoide umfassen eine Reihe natürlicher und synthetischer Verbindungen mit ähnlicher chemischer Struktur bei teils unterschiedlichen Wirkungen. Über die nukleären Rezeptoren RAR und RXR beeinflussen die Retinoide die Differenzierung und das Zellwachstum. Eine Reihe von Studien konnte ihre Wirkung auf die Expression von NIS und Thyreoglobulin, sowie den antiproliferierenden Effekt bestätigen (Filetti et al, 1999; Schmutzler et al, 1997; van Herle et al 1990; Kurebayashi et al, 2000).

Es gibt 6 verschiedene Unterformen dieser Rezeptoren (RAR α , β , γ und RXR α , β , γ). Haugen et al fanden 2004 heraus, dass vor allem die Unterformen RAR α und RXR α in malignen Schilddrüsenzellkulturen exprimiert werden und somit für eine Redifferenzierungstherapie mit Retinoiden zugänglich sein sollten.

Bei den mit all-trans-Retinsäure behandelten Schilddrüsenzellen der Zelllinie ONCO-DG 1 wurde nach 24 Stunden bei allen Konzentrationen eine Steigerung der Iodaufnahme beobachtet. Unter der Konzentration 0,5 μM kam es nach 30- und 48-stündiger Inkubationsdauer zu einer signifikanten Steigerung der ^{125}I -Iodidaufnahme zugleich aber nach 30 Stunden zu einem signifikanten Rückgang der ^3H -Thymidinaufnahme unter der Konzentration 1 μM . Passend zur gesteigerten ^{125}I -Iodidaufnahme war die Steigerung der NIS-Expression auf 80% gegenüber der Kontrolle mit 35% und der Pendrin-Expression, auf 40% gegenüber der Kontrolle mit 0%. Dies belegen auch andere Studien. Sowohl an entarteten Schilddrüsenzellen (Schmutzler et al, 1997), wie auch an anderen malignen Zelllinien (Kogai et al, 2000; Spitzweg et al, 2003) eine vermehrte NIS-Expression und -Aktivität beobachtet werden konnte.

Auch die mit 9-cis-Retinsäure stimulierten Thyreozyten zeigten einen signifikanten Anstieg der ^{125}I -Iodidaufnahme bei fast allen Konzentrationen und Inkubationszeiten in Gegenüberstellung zu den unbehandelten Thyreozyten. Ge-

messen an der Thymidinaufnahme insbesondere unter 2 μM war das Wachstum der malignen Thyreozyten nach 24, 30 und 48 Stunden reduziert. Auch in anderen Studien (Schmutzler et al, 2004; Hoang-Vu et al, 1999) wurde eine Abnahme der Thymidinaufnahme in Thyreozyten unter Retinsäure beschrieben. Bei der mit Retinol behandelten Zelllinie ONCO-DG 1 konnte eine gesteigerte ^{125}I -Iodidaufnahme nach 24 Stunden nachgewiesen werden, welche voraussichtlich auf die Re-Expression von NIS zurück zu führen ist, denn dies deckt sich mit den Ergebnissen der Immunzytochemie. Hier kam es sowohl nach 24 (55%) als auch nach 48 Stunden (60%) zu einer erhöhten Darstellung von NIS-Proteinen im Vergleich zur Kontrolle (nach 24 und 48 Stunden bei 35%). Des Weiteren bewirkte Retinol (6,5 μM , 3,25 μM und 1,6 μM) nach 24 und 30 Stunden eine erniedrigte ^3H -Thymidinaufnahme. Auch nach 6 und 19 Stunden zeigte sich unter 3,25 und 1,6 μM eine erniedrigte Thymidinaufnahme, die zu einer verminderten Proliferation führt. Es ist erstaunlich, dass auch unter dem Alkohol Retinol ganz analoge Effekte zu den eingesetzten Retinsäuren gefunden wurden, zumal die Kernrezeptoren nur auf Retinsäure ansprechen. Entweder wirkt Retinol über seinen Metaboliten Retinsäure oder es gibt noch andere nicht näher identifizierte Stoffwechselwege.

Bei unseren Untersuchungen konnte sowohl unter Retinol (3,2 μM) wie auch unter all-trans-Retinsäure (0,5 μM) keine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden, obwohl dies in der Literatur beschrieben ist (Gratzl et al, 2002). Vermutlich konnte keine richtige Reaktion der malignen Thyreozyten erzielt werden.

5.3 Wirkung von 5-Aza-deoxycytidin auf die ^{125}I -Iodidaufnahme, ^3H -Thymidinaufnahme und Apoptoserate

Bei fast jeder Neoplasie kommt es zu epigenetischen Mutationen in Form von Hyper- oder Hypomethylierungen. Hierbei wird anstelle des C-Atoms der Stelle 5 des Cytosinbausteins eine Methylgruppe eingebaut. Diese Hyper- bzw. Hypomethylierung hat Einfluss auf die Transkription von bestimmten Genen wie z. B. dem DNA-Reparatur-Gen MGMT (O^6 -Methylguanin-DNA-Methyltransferase)

oder dem zellzyklusregulierendem, cyclinabhängigen Kinase-Inhibitor 2B (CDKN2B) (Jones et al, 2002).

5-Aza-deoxycytidin ist eine Derivat des Nukleosidbausteins Cytidin. Es kann, wenn im Überschuß vorhanden, während der DNA-Synthese anstelle der Base Cytosin in die DNA eingebaut werden. Ihm selbst ist es aus sterischen Gründen nicht möglich methyliert zu werden und führt so nach dem Einbau in zuvor methylierte Regionen zur Demethylierung. Hierbei kommt es auch zu einer Reaktivierung von Genen (Wozniak et al, 2006). Dies wurde an verschiedenen kultivierten malignen Zelllinien (z.B. Brust-, Ösophaguskarzinomzelllinie), Tiermodellen, aber auch an Patienten (Leukämie, Myeloplastisches Syndrom) getestet (Momparker, 2005; Wozniak, 2006; Liu et al, 2005). Des Weiteren wurde auch eine Wachstumshemmung bei malignen Brustkrebszelllinien beobachtet (Liu et al, 2005).

Bei unseren Untersuchungen bewirkte 5-Aza-deoxycytidin keine gesteigerte ¹²⁵I-Iodidaufnahme. Es kam sogar zu einer signifikant erniedrigten Iodidaufnahme im Vergleich zu den Kontrollen. Dies konnte auch immunzytochemisch bestätigt werden, zumal es weder nach 24 noch nach 48 Stunden Inkubation zu einer höheren NIS-Expression als bei den Kontrollen kam. Dafür konnte aber zunächst nach einer Inkubation von 6 Stunden eine signifikant verminderte initiale Thymidinaufnahme bei allen eingesetzten Konzentrationen von 5-Aza-deoxycytidin beobachtet werden, während bei den übrigen Inkubationszeiten die ³H-Thymidininkorporation dann signifikant erhöht war.

Bei den mit 5-Aza-deoxycytidin stimulierten Thyreozyten kam es zu vermehrt apoptotischen Prozessen. Im Vergleich zu den Ergebnissen der unbehandelten Thyreozyten kam es nach 24 Stunden zu einer Steigerung um ca. 30% (14%; Kontrolle: 10,5%), nach 48 Stunden allerdings nur um 4% (23,8%; Kontrolle: 22,8%).

5.4 Wirkung von Mevinolin auf die ^{125}I -Iodidaufnahme, ^3H -Thymidinaufnahme und die Apoptoserate

Mevinolin gehört pharmakologisch zu den Statinen. Daher auch sein zweiter Name Lovastatin. Die Statine gehören der Familie der -HMG-Reduktase-Inhibitoren an. Es handelt sich somit vor allem um ein Cholesterinspiegel-senkendes Medikament. Durch eine reduzierte Produktion von LDL-Proteinen (Low density lipoproteins) in der Leber reguliert es den Cholesterinhaushalt und dadurch den Blutfettgehalt. Die Substanzgruppe der Statine besitzt weiter antithrombische, antiproliferierende und antientzündliche Eigenschaften, so wie auch Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System.

Schon in den 80er Jahren konnte gezeigt werden, dass Lovastatin neben den genannten Eigenschaften auch antitumoröse Eigenschaften besitzt (Maltese et al, 1985). Besonders zu nennen ist hierbei die Wirkung auf die Ras-Proto-Onkogen-Familie, welche die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kodiert. Diese kontrollieren Wachstum und Differenzierung von Zellen und sind somit auch von Bedeutung bei der Krebsentstehung. Mutationen im Ras-Gen können dazu führen, dass es dem Rezeptor nicht möglich ist sich abzuschalten, wodurch es zu einer unkontrollierten Proliferation der Zellen kommt. Die -HMG-Reduktase-Inhibitoren verhindern eine Isoprenylation von diesen Ras-Proteinen, wodurch sich diese nicht mehr an Zellmembranen verankern können. In einer Studie an Darmkarzinomzellen kam es darunter zu einer verminderten Proliferation und erhöhten Apoptoserate (Agarwal, 1999). Weitere Studien an anderen Krebszelllinien wie auch an Tiermodellen kamen ebenfalls zu dem Ergebnis einer Wachstumsinhibition, Apoptose- und Differenzierungssteigerung (Maltese et al, 1985; Park et al, 2001; Depasquale et al, 2006; van de Donk, 2002) .

Bei den mit Mevinolin stimulierten malignen humanen Thyreozyten kam es erst nach längerer Inkubationsdauer (ab 24 Stunden) zu einer Steigerung der ^{125}I -Iodidaufnahme durch vermehrte NIS-Expression, wie die Immunzytochemie zeigt und zwar sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden auf 70 bzw. 60% (Kontrolle: 35% sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden). Auch der immu-

zytochemische Nachweis von Pendrin ergab nach 48 Stunden eine Steigerung der Expression (40%, Kontrolle: 0%).

Der ^3H -Thymidineinbau war nur bei der Konzentration 100 μM signifikant erniedrigt, während sich bei niedrigeren Konzentrationen signifikante Aufnahmesteigerungen zeigten und so eine erhöhte Wachstumsrate ermöglichten. Allerdings kam es bei den nachfolgenden Versuchen des ^3H -Thymidineinbaus unter Mevinolinstimulation zu signifikant verminderten Werten. Es könnte möglich sein, dass der Versuch der Konzentrationsaustestung nicht aussagekräftig ist. Unter der Konzentration 100 μM war auch die ^{125}I -Iodidaufnahme signifikant vermindert, so dass es sich bei dieser Konzentration möglicherweise um eine für die Zellen bereits toxische Konzentration handelt.

Die Wirkung von Mevinolin auf die Apoptose war stark ausgeprägt. Schon nach 24-stündiger Inkubation kam es zu einer Verdopplung der Apoptoserate und nach 48 Stunden sogar zu einer Verdreifachung. Diese enorme Steigerung der apoptotischen Prozesse könnte allerdings auch von der vorausgegangenen gesteigerten ^3H -Thymidinaufnahme, d.h. von einer erhöhten Wachstumsrate, herühren. Auch Graaf et al. (2004) beschreiben unter Mevinolin eine Apoptoseinduktion.

5.5 Wirkung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Valproinsäure, Apicidin und APHA) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme, den ^3H -Thymidineinbau und die Apoptoserate

Bei der Transkription von DNA ist eine Acetylierung der Histonproteine durch Histon-Acetyltransferasen unausweichlich. Hierbei wird die Ladung der Histone (Teil des Chromatins) durch Acetylierung der Aminogruppen des Lysins von negativ auf positiv verändert. Den Histonen ist es dadurch nicht mehr möglich an die DNA zu binden und die Transkription kann starten. Es handelt sich hierbei um eine reversible Aktion. Die Histone können durch Histon-Deacetylasen deacetyliert werden. Das Lysin der Histone wird wieder positiv geladen. Dies erhöht die Affinität des Histonendes für das negativ geladene Phosphatgerüst der DNA. Die DNA wird für Transkriptionsfaktoren blockiert. Bei entarteten Zellen

kommt es auf Grund von veränderter HDAC-Aktivität zu veränderten Genexpressionen (de Ruijter et al, 2003). Des Weiteren besitzen diese Enzyme Verbindungen zu Onkogenen und Tumorsuppressorgenen (Cress et al, 2000; Timmermann et al, 2001). Bei promyelozytärer Leukämie zum Beispiel kam es zu Differenzierung und erhöhter Proliferation der Zellen auf Grund einer Hyperacetylierung. In einer Vielzahl von Studien kam es durch die Behandlung mit Histon-Deacetylase-Inhibitoren zu Apoptose, Differenzierung und Wachstumsinhibition (Schuchmann et al, 2005; Noh et al; 2006; Jung, 2001). Valproinsäure bewirkte in einer Studie mit kultivierten malignen Thyreozyten eine erhöhte Iodaufnahme durch gesteigerte NIS-Expression (Fortunati et al, 2004).

Valproinsäure induzierte nur in der Konzentration 3 mM eine signifikante Steigerung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme nach einer Inkubationsdauer von 43 und 48 Stunden. Bei den Konzentrationen 0,5 und 1 mM zeigten sich dagegen keine signifikanten Unterschiede. Unter 1 mM Valproinsäure kam es allerdings zu einer erhöhten immunzytochemisch nachgewiesenen NIS-Expression. Schon nach 24 Stunden lag diese bei 80% und nach 48 Stunden bei 90% (Nullwert nach 24 und 48 Stunden: 35%). Diese Ergebnisse passen allerdings nicht mit der ¹²⁵I-Iodidaufnahme zusammen, da es hier weder nach 24 noch nach 48 Stunden zu einer signifikant erhöhten Aufnahme kam. Möglicherweise wurde das NIS-Protein nicht zur Plasmamembran transportiert, sondern ist im Zytosol liegen geblieben. Auch die Pendrinexpression war immunzytochemisch gesteigert. Nach 24 Stunden waren 20% der Zellen angefärbt, nach 48 Stunden sogar 75% (Kontrolle: 0% nach 24 und 48 Stunden).

Die ³H-Thymidinaufnahme unter Valproinsäure war eher gesteigert. Nach einer Inkubationszeit von 24, 30 und 44 Stunden wurden erhöhte Aufnahmeraten bei den Konzentrationen 1 und 3 mM gemessen, nach 19 Stunden auch unter der Konzentration 3 mM.

Trotz der in der Literatur beschriebenen Apoptose-induzierten Wirkung von Valproinsäure (Catalano et al, 2005) nahm dieser HDAC-Inhibitor keinen Einfluss auf die Apoptoserate der Thyreozyten.

Bei den malignen humanen Thyreozyten, die mit Apicidin behandelt wurden, fanden sich unter 10 und 20 nM signifikant und nicht signifikant gesteigerte ^{125}I -Iodidaufnahmeraten. Diesen gesteigerten Einbauraten steht eine leicht gesteigerte NIS-Expression (nachgewiesen für 200 nM Apicidin nach 48 Stunden) gegenüber.

Der ^3H -Thymidineinbau war bei den einzelnen Apicidinkonzentrationen ebenfalls gesteigert. Dies konnte vor allem bei den Konzentrationen 10 nM, 15 nM und 500 nM nach einer Inkubation von 7 Stunden, wie auch bei den Konzentrationen 10 nM und 100 nM nach 48-stündiger Inkubation beobachtet werden. Die einzig negativ signifikanten Werte der ^3H -Thymidinaufnahme waren nach 7-stündiger Inkubation bei 100 und 200 nM und nach einer Inkubationsdauer von 44 Stunden unter 15 und 100 nM zu sehen.

Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die malignen humanen Thyreozyten wurde unter Einfluss von APHA insbesondere nach 19 und 44 Stunden gesteigert. Auch nach einer Inkubationszeit von 30 Stunden kam es bei den Konzentrationen 0,5 und 10 μM zu einer signifikanten Steigerung der Iodidaufnahme. Eine gesteigerte Expression des Natrium-Iodid-Symporters konnte allerdings nur nach 24 Stunden Inkubation festgestellt werden (85%, im Vergleich zur Kontrolle: 70%), nicht mehr nach 48 Stunden.

Ein verminderter ^3H -Thymidineinbau wurde nach 19- und 48-stündiger Inkubation bei allen Konzentrationen beobachtet. Ebenso nach 44 Stunden Inkubationsdauer unter 5 μM , 1 μM und 0,5 μM . In wenigen Fällen fanden sich auch signifikant gesteigerte Einbauraten.

Unter Berücksichtigung des Quotienten aus Iodidaufnahme/Thymidinaufnahme war der Histon-Deacetylase-Inhibitor APHA am wirkungsvollsten. Hier kam es nicht nur zu einer gesteigerten ^{125}I -Iodidaufnahme sondern auch zu einer verminderten ^3H -Thymidinaufnahme. Bei Valproinsäure und Apicidin wurde neben der gesteigerten Iodidaufnahme auch eine gesteigerte Thymidinaufnahme beobachtet. Dies könnte ebenfalls Grund für eine Erhöhung der ^{125}I -Iodidaufnahme sein, da durch eine gesteigerte Wachstumsrate vermehrt Zellen Iod aufnehmen können.

5.6 Wirkung von Thiazolidindionen/ Glitazonen (Troglitazon, Rosiglitazon und Pioglitazon) auf die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidinaufnahme

Die zu der Familie der Insulinsensitizer (Antidiabetika) gehörende Gruppe der Glitazone entfaltet ihre Wirkung über den peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). Der PPAR gehört zu den nukleären Rezeptoren und greift in physiologische und pathologische Prozesse ein. Hierzu zählen die Lipid- und Glukosestoffwechselwege, Entzündungen und Karzinogenese (Winczyk et al, 2005). Des Weiteren kann PPAR als Komplex mit dem nukleären Rezeptor RXR Einfluss auf die Genexpression nehmen.

Bei Diabetes mellitus Typ II ist die Reaktion der Zelle auf Insulin eingeschränkt. Dies kommt durch Insulinresistenzen der Zielzellen zustande. Glitazone setzen den Widerstand herab und bewirken eine Insulinsensitivierung.

Glitazone zeigen auch in der experimentellen Tumorthherapie Wirkung. So kam es unter Glitazonen bei kultivierten malignen Thyreozyten (Fröhlich et al, 2005) und anderen malignen Zellkulturen (Kitamura et al, 1999; Demetri, 1999; Müller et al, 2000) zu einer Redifferenzierung. Weitere Effekte der Glitazone konnte durch Wachstumsinhibition (humane Magenkrebszellen/Takeuchi et al, 2002; Endothel von Tumorgefäßen/Panigraphy, 2003) und durch Steigerung der Apoptose in einer Vielzahl von neoplastischen Zellen beobachtet werden (Koefler et al, 2003). Manche Tumorzellen haben einen Resistenzmechanismus gegen ihre Vernichtung durch den programmierten Zelltod. Troglitazon zum Beispiel umgeht diese Resistenz und induziert Apoptose (Schultze et al, 2006). Diese Form der Apoptose wird durch Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) übermittelt, welcher an die transmembranen death receptor 4 (DR4 = TRAIL-R1) und death receptor 5 (DR5 = TRAIL-R2) bindet (Mérino et al, 2006).

Troglitazon bewirkte in allen Konzentrationen nach 19 und 44 Stunden Inkubation eine signifikant gesteigerte ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die malignen humanen Thyreozyten. Mit der gesteigerten ¹²⁵I-Iodidaufnahme geht eine gesteigerte NIS-

Expression, die nach 24 Stunden gemessen wurde, einher (nach 24 Stunden: 80%, nach 48 Stunden: 55%; Kontrolle nach 24 und 48 Stunden: 70%).

Beim ^3H -Thymidineinbau wurde bis auf die Ausnahme unter $2,5\ \mu\text{M}$ nach 7 Stunden und $5\ \mu\text{M}$ und $10\ \mu\text{M}$ nach 48 Stunden, keine erniedrigte Aufnahme erreicht gegenüber der Kontrolle erzielt.

Bei den mit Rosiglitazon behandelten Schilddrüsenkarzinomzellen fiel die ^{125}I -Iodidaufnahme nach 7 und nach 28 Stunden unter allen Konzentrationen signifikant ab. Unabhängig davon war eine Steigerung der NIS-Expression nach 48 Stunden ersichtlich (95%; Kontrolle: 70%). Des Weiteren bewirkte Rosiglitazon eine gesteigerte Aufnahme von ^3H -Thymidin. Erst nach 48 Stunden kam es zu einer gegenüber der Kontrolle verminderten Thymidinaufnahme.

Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten, die mit Pioglitazon behandelt wurden, war nach einer Inkubationsdauer von 18 und 48 Stunden signifikant gesteigert. Allerdings lag dazwischen nach 24 und 28 Stunden ein signifikanter Abfall, der auch durch den verminderten zytochemischen NIS-Nachweis bestätigt wurde. Bei der Expression des Pendrins kam es dagegen nach 48 Stunden zu einer leichten Steigerung mit 45% (Kontrolle: 30%). Unter der Behandlung mit Pioglitazon zeigte sich keine signifikante Steigerung in der ^3H -Thymidinaufnahme.

5.7 Wirkung von Akt-Inhibitoren (Akt-Inhibitor A und Akt-Inhibitor B/Triciribin) auf die ^{125}I -Iodidaufnahme, die ^3H -Thymidinaufnahme und die Apoptoseraten mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid

Das Enzym Proteinkinase B/ Akt ist eine Serin-/Threoninkinase, die in unzählige physiologische Stoffwechsel eingreift. Es transferiert Phosphatgruppen (meistens von ATP stammend) auf Seitenketten der Aminosäuren Serin und Threonin und nimmt somit Einfluss auf die Homöostase, Apoptose, Proliferation und Stoffwechsel von Zellen. In verschiedenen Tumoren wurden Regulationsstörungen des Akt-/PI3K-Signalweges beobachtet. Dies ist auf eine erhöhte Ex-

pression und Aktivität des PIK3C- und Akt-Gens durch Mutationen zurück zu führen (Osaki et al, 2004). Genau hier greifen die Akt-Inhibitoren ein. Es kommt zu einer Hemmung des Akt-/PI3K-Signalwegs. Bei kanzerogenen Thyreozyten kam es somit zu einer Steigerung der Apoptoserate und einer verminderten Zellproliferation (Mandal et al, 2005). Des Weiteren war bei Untersuchungen an Leberkrebs eine minimierte Metastasierung nach Behandlung mit Akt-Inhibitoren zu bemerken (Nakanishi et al, 2002). Forschungen an humanen Leukämiezellen ergaben eine erhöhte Sensitivität für Apoptose-induzierende Medikamente, sowie einen Abfall der antiapoptotischen Proteine c-IAP1, cIAP2 und cFLIP_L (Martelli et al, 2003).

Es ist bekannt, dass zwischen Akt-Inhibitoren und Arsentrioxid sowie zwischen Arsentrioxid und den Retinoiden (Huang, 2000; Au et al., 2002; Zheng, 2005) ein Synergismus besteht. Allerdings wurden in verschiedenen Studien, in denen der Akt-Inhibitor in Kombination mit Arsentrioxid angewendet wurde, unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Apoptoserate festgestellt (Ramos et al., 2005; Liu et al., 2001).

Arsentrioxid kam schon Mitte des 19. Jahrhunderts (damals als Fowlersche Lösung bekannt) zum Einsatz in der Therapie von Tumoren und Leukämie. Seine Wirkung besteht unter anderem darin, Apoptose in Tumorzellen auszulösen. Dies wurde vor allem an Leukämiezellen beobachtet. Hier kommt es durch Hemmung der Expression der Bcl2-Proteine zur Aktivierung von Caspase-Kaskaden und somit zur Apoptose (Kim et al, 2005; Ghobrial et al, 2005). Des Weiteren entsteht bei der Promyelozytenleukämie das Fusionsprotein PML/RAR, welches die Reifung der weißen Blutkörperchen beeinträchtigt. Durch Arsentrioxid kommt es zu einem Abbau, bzw. zu einer Schädigung dieses Proteins (Chou et al, 2005).

Die mit Akt-Inhibitor A stimulierten Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 zeigten bei allen verwendeten Konzentrationen erst nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden erhöhte ¹²⁵I-Iodidaufnahmeraten. Dieses Verhalten wurde auch unter Simultanstimulation mit Arsentrioxid beobachtet. Parallel hierzu konnte eine Steigerung der Expression von NIS und Pendrin unter Akt-Inhibitor-Stimu-

lation nach 48 Stunden nachgewiesen werden (NIS: 90%, Kontrolle: 75%). Die Kombination Akt-Inhibitor A plus Arsentrioxid auf die NIS-/Pendrin-Expression wurde nicht untersucht. Bei der Messung des ^3H -Thymidineinbaus fand sich nach 48 Stunden im Vergleich zu den Vorwerten nach 24 und 30 Stunden bei allen verwendeten Konzentrationen eine verringerte Aufnahme in die Zellen. Die mit Akt-Inhibitor A plus Arsentrioxid stimulierten Zellen zeigten schon nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden eine niedrigere Thymidinaufnahme als die Thyreozyten, die nur mit Akt-Inhibitor A stimuliert wurden. Die Aufnahmeraten lagen auch unter denen der Kontrolle.

Dass es zu einer gesteigerten Apoptoserate durch Synergismus von Akt-Inhibitor A und Arsen kommt, kann hier nicht bestätigt werden. Nur nach 48 Stunden kam es unter Stimulation mit 10 μM -Akt-Inhibitor A zu einer gering erhöhten Apoptoserate.

Bei den Schilddrüsenkarzinomzellen, die mit Arsentrioxid oder mit Triciribin plus Arsentrioxid behandelt wurden, kam es schon nach 6 Stunden Inkubation gegenüber den unstimulierten und den nur mit Triciribin stimulierten Thyreozyten zu einem signifikanten Anstieg der Iodidaufnahme. Hiermit geht die immunzytochemische NIS-Darstellung nach 24 Stunden einher. Die Expression des Natrium-Iodid-Symporters betrug 85% (Kontrolle für Arsen: 75%).

Die Stimulation der Thyreozyten nur mit Triciribin (Akt-Inhibitor B) verursachte im Vergleich zu den unstimulierten, den nur mit Arsentrioxid versehenen und den mit Triciribin plus Arsentrioxid stimulierten Thyreozyten nach 30 Stunden Inkubationszeit eine Steigerung der ^{125}I -Iodidaufnahme, insbesondere unter 1 und 5 μM . Die reine Triciribin-Stimulation induzierte nach 24 Stunden (85%) und 48 Stunden (95%) auch eine immunzytochemisch nachgewiesene gesteigerte NIS-Expression im Vergleich zur Kontrolle (24 und 48 Stunden: 75%). Auch die Pendrin-Expression war mit 50% im Vergleich zur Kontrolle (45%) gering gesteigert.

Nach 48 Stunden Inkubation fiel die ^3H -Thymidinaufnahme bei den mit 20 μM Triciribin stimulierten Thyreozyten sowie bei den mit Triciribin plus Arsentrioxid behandelten Zellen gegenüber der Kontrolle signifikant ab. Auch nach 24 und

30-stündiger Inkubation war ein verminderter Einbau von ^3H -Thymidin bei den mit 20 μM und 10 μM Triciribin stimulierten Thyreozyten zu beobachten.

5.8 Anschließende Bewertung der untersuchten Substanzen

Die Untersuchungen verschiedener differenzierungssteigernder Substanzen an der Zelllinie ONCO-DG 1 lassen sich folgendermaßen bewerten:

Substanz	^{125}I - Iodidaufnahme	^3H - Thymidinaufnahme	Apoptose	NIS	Pendrin
Retinol	+	-	+	+	+
All-trans- Retinsäure	+	-	-	++	++
9-cis-Retinsäure	++	-	-	nicht bestimmt	nicht bestimmt
5-Aza-deoxycytidin	-	++	+	-	-
Mevinolin	-	+	++	++	++
Valproinsäure	0	0	--	++	++
APHA	++	0	nicht bestimmt	+	-
Apicidin	+	0	nicht bestimmt	0	-
Troglitazon	++	+	nicht bestimmt	+	0
Rosiglitazon	--	+	nicht bestimmt	+	-
Pioglitazon	0	-	nicht bestimmt	-	+
Akt-Inhibitor A	0	0	--	+	0
Akt-Inhibitor A + Arsentrioxid	0	0	-	-	-
Triciribin	+	-	nicht bestimmt	+	-
Triciribin + Arsentrioxid	0	-	nicht bestimmt	-	-
Arsentrioxid	-	0	-	+	0

Tab. 3: abschließende Bewertung der verschiedenen differenzierungssteigernden Substanzen.

Zeichenerklärung: ++ → deutlich erhöhte Werte im Vergleich zum Nullwert
 + → erhöhte Werte im Vergleich zum Nullwert
 0 → keine bemerkenswerte Änderung im Vergleich zum Nullwert
 - → verminderte Werte im Vergleich zum Nullwert
 -- → deutlich verminderte Werte im Vergleich zum Nullwert

Hieraus wird ersichtlich, dass sich insbesondere mit den Retinoiden die gewünschten Reaktionen wie erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahme und verminderte ^3H -Thymidinaufnahme erzielen ließen. Unter den Retinoiden war auch die NIS- und Pendrin-Expression gesteigert. Auch mit den Histon-Deacetylase-Inhibitoren wurde eine gesteigerte ^{125}I -Iodidaufnahme (ausgenommen Valproinsäure) erzielt. Allerdings kam es bei keinem HDAC-Inhibitor zu einer verminderten ^3H -Thymidinspeicherung. Unter Valproinsäure war insbesondere die NIS- und Pendrin-Proteinexpression gesteigert. Unklar blieb dabei die ausbleibende Steigerung der Iodidaufnahme. Des Weiteren ist Troglitazon zu nennen. Hier kam es neben einer erhöhten ^{125}I -Iodidaufnahme auch zu einer gesteigerten NIS-Expression. Zusätzlich wurde eine erhöhte Thymidinaufnahme beobachtet, welche über ein vermehrtes Wachstum ebenfalls eine Erklärung für die erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahme sein könnte.

6. Zusammenfassung

Die Routinetherapie bei differenzierten Schilddrüsen-Malignomen ist die Operation und die anschließende Radioiodtherapie mit ^{131}I -Iod, um zurückgebliebene Schilddrüsenreste und Metastasen auszuschalten. Die Iodaufnahme in entartetes Schilddrüsengewebe ist somit von großer Bedeutung. Bei den meisten entarteten Schilddrüsenzellen ist eine Iodaufnahme nur eingeschränkt oder nicht mehr möglich. Bei unseren Untersuchungen wurde nach Substanzen gesucht, die eine Re-Differenzierung des entarteten Gewebes ermöglichen. Als potentielle Redifferenzierungssubstanzen wurden untersucht: Retinol, all-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure, Troglitazon, Rosiglitazon, Pioglitazon, Apicidin, APHA, Valproinsäure, 5-Aza-deoxycytidin, Mevinolin, Arsentrioxid, Akt-Inhibitor A und Akt-Inhibitor B (Triciribin).

Die Untersuchungen wurden an kultivierten humanen malignen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 durchgeführt. Die ^{125}I -Iodidaufnahme diente als Differenzierungsparameter, die ^3H -Thymidinaufnahme als Proliferationsparameter. Ergänzende Untersuchungen waren die Messung an der Protein-Expression von NIS und Pendrin und die Erfassung der Apoptoserate.

Die Retinoide führten zu einer gesteigerten ^{125}I -Iodidaufnahme. Die Konzentration $0,5\ \mu\text{M}$ bei all-trans-Retinsäure und $3,25\ \mu\text{M}$ bei Retinol stellten sich als besonders effektiv heraus. Der Iod-Uptake ging mit einer gesteigerten Expression des NIS-Transporterproteins einher. Die ^3H -Thymidinaufnahme nahm ab. Die Apoptose war hierfür allerdings nicht die Ursache, da sie sich nicht steigern ließ. Bei den mit Retinol stimulierten Zellen kam es zu einer Expression des Pendrins.

5-Aza-deoxycytidin beeinflusste die ^{125}I -Iodidaufnahme negativ. Die ^3H -Thymidinaufnahme war signifikant erhöht. Anstelle das Wachstum zu verlangsamen, beschleunigte das Cytidin-Derivat die Proliferation. Nach 24 Stunden war allerdings die Apoptose verstärkt. Eine Expression von NIS und Pendrin kann nicht bestätigt werden.

Der -HMG-Reduktase-Inhibitor Mevinolin führte erst nach 48 Stunden Inkubationszeit zu einer Steigerung der ^{125}I -Iodaufnahme. Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde signifikant gesteigert. Bei der Apoptoserate war nach 24 Stunden eine Verdopplung und nach 48 Stunden eine Verdreifachung zu beobachten. Es kam auch zu einer Expression von NIS und Pendrin.

Bei den Histon-Deacetylase-Inhibitoren war die ^{125}I -Iodidaufnahme besonders nach längerer Inkubationszeit erhöht. Die Thyreozyten nahmen unter Apicidin (500 μM) und unter APHA nur vermindert ^3H -Thymidin auf. Nur Valproinsäure steigerte die ^3H -Thymidinaufnahme. Sowohl nach 24 (80%) als auch nach 48 Stunden (90%) kam es unter Valproinsäure (1 mM) zu einer gesteigerten Expression von NIS im Vergleich zum Nullwert (35%). APHA bewirkte ebenfalls eine Steigerung der NIS-Expression nach 24 Stunden (85%), sowie Apicidin nach 48 Stunden (75%) (Kontrolle: 70%). Kein Histon-Deactelase-Inhibitor beeinflusste die Apoptoserate.

Von den untersuchten Thiazolidindione bewirkte nur Troglitazon, besonders in der Konzentration 10 μM , eine erhöhte Iodidaufnahme. Unter Troglitazon und Rosiglitazon war ein Rückgang der ^3H -Thymidinaufnahme erst nach 48 Stunden zu sehen. Diese beiden Glitazone hatten auch einen positiven Einfluss auf die Expression des NIS.

Unter dem Akt-Inhibitor A kam es meistens erst nach 30 Stunden zu einem erhöhten ^{125}I -Iodiduptake in die Thyreozyten. Parallel nahm die NIS-Protein-Expression zu. Beim ^3H -Thymidineinbau wurden nach 48 Stunden Inkubation erniedrigte Einbauraten gemessen, insbesondere in der Konzentration 2 μM und zwar sowohl mit als auch ohne gleichzeitige Stimulation mit Arsentrioxid. Die Apoptoserate erhöhte sich.

Der Akt-Inhibitor B, Triciribin, bewirkte nur ohne simultane Stimulation mit Arsentrioxid eine gesteigerte Iodidaufnahme die mit einer gesteigerten NIS- und Pendrin-Expression einherging. Die Proliferationsrate nahm unter 20 μM sowohl mit als auch ohne gleichzeitige Stimulation mit Arsentrioxid enorm ab.

Am stärksten differenzierungssteigernd wirkten die Retinoide und die Histon-Deacetylase-Inhibitoren.

7. Anhang

Tab. 4 zu Abb. 15. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	19h	24h	30h	43h	48h
ohne Stimulation	30,7	145,1	94,1	49,2	73,3	217,9
SD	4,3	40	20,7	12,4	16,6	93,7
SEM	1,8	16,3	8,5	5,1	6,8	38,2
Methanol	34,4	140,4	132,7	56,2	62,4	331,5
SD	7,1	65,1	45,3	21,6	10	230,4
SEM	2,9	26,6	18,5	8,8	4,1	94
signifikant			*			
Retinol 13 μM	41,5	131,1	136,8	51,1	104,3	316,2
SD	13,1	26,4	28,9	16,5	19,2	116,9
SEM	5,3	10,8	11,8	6,7	7,8	47,7
signifikant			*			
Retinol 6,5 μM	35,3	140,9	135,6	39,9	88,5	588
SD	9,8	44,1	22,5	8,7	17,8	420
SEM	4	18	9,2	3,5	7,3	171,5
signifikant			*			
Retinol 3,25 μM	40,8	236	135	52,4	61,1	430,6
SD	5,1	212,4	29	16,8	16	207,1
SEM	2,1	86,7	11,8	6,9	6,5	84,5
signifikant	*		*			
Retinol 1,6 μM	38	202,7	139,3	41,7	60,2	370,6
SD	11,8	87,8	8,6	4,8	11	170
SEM	4,8	35,8	3,5	1,9	4,5	69,4
signifikant			*			

Tab. 5 zu Abb. 16. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Ohne Stimulation	30,7	145,1	94,1	49,2	73,3	217,9
SD	4,3	40	20,7	12,4	16,6	93,7

SEM	1,8	16,3	8,5	5,1	6,8	38,2
Methanol	34,3	140,4	132,7	56,2	62,4	331,5
SD	7,1	65,1	45,3	21,6	10	230,4
SEM	2,9	26,6	18,5	8,8	4,1	94
signifikant			*			
All-trans-Retinsäure 2 µM	34,6	167,4	166,1	46,8	70,4	445,5
SD	6,2	39,7	26,6	13,3	5,9	126
SEM	2,5	16,2	10,9	5,4	2,4	51,4
signifikant			*			
All-trans-Retinsäure 1 µM	43,3	157,5	146,2	45,4	68,1	335
SD	7,1	38,4	37,5	6,5	8,1	170,6
SEM	2,9	15,7	15,3	2,6	3,3	69,7
signifikant			*			
All-trans-Retinsäure 0,5 µM	37,3	181,6	164,9	103,7	128,5	779,9
SD	4,1	78,5	30,2	25,1	43,2	751,5
SEM	1,7	32	12,3	10,3	17,7	306,8
signifikant			*	*		*

Tab. 6 zu Abb. 17. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	30,7	145,1	94,1	49,2	73,3	217,9
SD	4,3	40	20,7	12,4	16,6	93,7
SEM	1,8	16,3	8,5	5,1	6,8	38,2
Methanol	34,4	140,4	132,7	56,2	62,4	331,5
SD	7,1	65,1	45,3	21,6	10	230,4
SEM	2,9	26,6	18,5	8,8	4,1	94
signifikant			*			
9-cis-Retinsäure 2 µM	40,6	324,2	201,2	145,2	176,5	656,3
SD	10,1	270,4	43,8	106,4	80,6	342,2
SEM	4,1	110,4	17,9	43,4	32,9	139,7
signifikant			*	*	*	*
9-cis-Retinsäure 1 µM	51	301,2	204,1	137,6	178,8	602,6
SD	22	73,7	12,4	24,3	49,6	229,1
SEM	9	30,1	5,1	9,9	20,2	93,5
signifikant	*	*	*	*	*	*

9-cis-Retinsäure 0,5 µM	33,9	314,4	189,6	140,8	363,3	806,5
SD	5,1	76,3	19,4	21,7	334,2	231,1
SEM	2,1	31,1	7,9	8,8	136,5	94,4
signifikant		*	*	*	*	*

Tab. 7 zu Abb. 18. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Ohne Stimulation	273,5	241,2	253,5	175,2	102,4	118,7
SD	107,8	106,8	174,4	42,6	21,4	46,9
SEM	44	43,6	71,2	17,4	8,7	19,2
DMSO	479,7	259,8	129,1	109,8	67,3	88,4
SD	153,5	130,2	27	16,9	9,6	7
SEM	62,7	53,1	11	6,9	3,9	2,8
signifikant		*	*			
5-Aza-deoxycytidin 10 µM	425,6	143,7	116,5	151	58,3	100,6
SD	268,2	95,1	48,9	114,1	24,6	58,5
SEM	109,5	38,8	20	46,6	10	23,9
signifikant					*	
5-Aza-deoxycytidin 5 µM	432,3	132	107,5	137,7	74,1	106
SD	205,4	62,4	40,8	38,7	10,9	27,8
SEM	83,9	25,5	16,6	15,8	4,5	11,3
signifikant			*			
5-Aza-deoxycytidin 1 µM	222,7	146	140,6	143,1	74,5	151
SD	122,5	81,6	56,7	56,7	18,4	34,2
SEM	50	33,3	23,1	21	7,5	14
signifikant						
5-Aza-deoxycytidin 0,5 µM	243,7	128,1	121,6	111,5	62,4	95,1
SD	179,9	102,9	81,3	45,3	9,3	25,7
SEM	73,4	42	33,2	18,5	3,8	10,5
signifikant				*		

Tab. 8 zu Abb. 19. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodidaufnahmerate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Ohne Stimulation	273,5	241,2	253,5	175,2	102,4	118,7
SD	107,8	106,8	174,4	42,6	21,4	46,9
SEM	44	43,6	71,2	17,4	8,7	19,2
Ethanol	420	241,3	131,6	104,1	69,3	82,1
SD	91,5	102	48	28,2	9	19,8
SEM	37,3	41,6	19,6	11,5	3,7	8,1
signifikant			*	*		
Mevinolin 100 μM	58,3	67,6	56,6	112,2	81,4	118,2
SD	25,6	10	13,4	27,4	26,7	56,1
SEM	10,5	4,1	5,5	11,2	10,9	22,9
signifikant	*	*	*	*		
Mevinolin 50 μM	63,2	93,7	64,2	125,2	122,2	217,4
SD	36,5	54	20,3	45,8	76,3	82,8
SEM	14,9	22,1	8,3	18,7	31,2	33,8
signifikant	*	*	*			
Mevinolin 37 μM	51,9	66,6	47,6	125,9	97,3	174,2
SD	10,7	13,6	13,9	22,9	18,1	46,3
SEM	4,4	5,5	5,7	9,4	7,4	18,9
signifikant	*	*	*			
Mevinolin 25 μM	47,9	92,3	53,5	149,4	114,2	159,8
SD	8,7	39,9	24,2	21,2	15,1	34,9
SEM	3,5	16,3	9,9	8,7	6,2	14,2
signifikant	*	*	*			
Mevinolin 12 μM	46,2	76,3	52,3	142,5	76,4	164,4
SD	13,4	30,3	10	65,5	25,3	43,3
SEM	5,5	12,4	4,1	26,7	10,3	17,7
signifikant	*	*	*			

Tab. 9 zu Abb. 20. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodidaufnahmerate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Ohne Stimulation	175,7	164,6	259,9	27,8	24,7	33,8

SD	45,7	16,9	71,1	11,6	8,8	7,2
SEM	16,1	6	25,1	4,1	3,1	2,6
Valproinsäure 3 mM	210,7	157,5	225,4	26,7	35,7	96,8
SD	110,6	34,1	78,5	5,9	11,6	142,2
SEM	39,1	12,1	27,8	2,1	4,1	50,3
signifikant				*	*	*
Valproinsäure 1 mM	255,3	188	305,3	215,5	234,7	305,2
SD	184,3	64,1	226,5	43,6	48,6	54,1
SEM	65,2	22,7	80,1	15,4	17,2	19,1
signifikant				*	*	*
Valproinsäure 0,5 mM	163,4	148,7	192,7	241,3	253,4	322,7
SD	15,5	16,2	20,3	42,6	38,4	62,3
SEM	5,5	5,7	7,2	15,1	13,6	22
signifikant					*	*

Tab. 10 zu Abb. 21. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) Stimulation	Zeit (Stunden)		
	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	474,2	191	242,8
SD	511,2	31,1	9,9
SEM	180,7	11	3,5
Valproinsäure 1 mM	284,2	209,9	254,7
SD	48,2	33	47,9
SEM	17	11,7	16,9
signifikant			
Valproinsäure 0,5 mM	240,6	207,9	227,7
SD	17,1	18,4	8,6
SEM	6	6,5	3
signifikant			

Tab. 11 zu Abb. 22. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit(Stunden) Stimulation	6h	19h	24h	30h	44h	48h
Ohne Stimulation	131,03	71,85	87,73	205,3	131,78	288,03
SD	34,45	17,48	47,05	71,99	28,63	87,37
SEM	14,06	7,14	19,21	29,39	11,69	35,67
DMSO	212,85	107,67	140,47	234,07	161,92	293,6
SD	109,61	44,13	114,92	65,34	29,39	68,63
SEM	44,75	18,01	46,91	26,68	12	28,02
signifikant		*	*			
Apicidin 500 nM	195,47	89,12	108,52	217,98	145,23	274,32
SD	37,69	9,85	26,63	42,12	19,74	39,53
SEM	15,39	4,02	10,87	17,2	8,06	16,14
signifikant	*					
Apicidin 200 nM	294,53	127,43	129,65	387,42	198,5	313,3
SD	225,3	51,65	350,08	350,08	45,31	99,92
SEM	91,98	21,08	142,92	142,92	18,5	40,79
signifikant	*				*	
Apicidin 100 nM	254,07	91,82	116,83	286,32	174,1	303,58
SD	107,23	14,91	26,49	74,45	30,59	90,35
SEM	43,78	6,09	10,81	30,39	12,49	36,89
signifikant	*					
Apicidin 15 nM	230,20	94,15	120,78	253,45	164,4	303,42
SD	50,14	26,75	13,41	33,49	15,58	39,03
SEM	20,47	10,92	5,48	13,67	6,36	15,93
signifikant	*					
Apicidin 10 nM	214,53	101,75	117,42	282,25	147,97	297,57
SD	70,82	18,95	43,98	53,79	19,35	47,82
SEM	28,91	7,73	17,96	21,96	7,90	19,52
signifikant		*				

Tab. 12 zu Abb. 23. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit(Stunden) Stimulation	6h	19h	24h	30h	44h	48h
------------------------------	----	-----	-----	-----	-----	-----

Ohne Stimulation	131,03	71,85	87,73	205,3	131,78	288,03
SD	34,45	17,48	47,05	71,99	28,63	87,37
SEM	14,06	7,14	19,21	29,39	11,69	35,67
DMSO	212,85	107,67	140,47	234,07	161,92	293,6
SD	109,61	44,13	114,92	65,34	29,39	68,63
SEM	44,75	18,01	46,91	26,68	12	28,02
signifikant		*	*			
APHA 50 µM	95,52	177,95	115	375,05	312,98	284,43
SD	20,84	31,53	39,2	73,03	102,59	57,52
SEM	8,51	12,87	16	29,82	41,88	23,48
signifikant		*			*	
APHA 10 µM	148,1	201,45	116,63	500,97	387,07	286,27
SD	38,79	38,78	29,99	352,78	142,64	68,42
SEM	15,84	15,83	12,24	144,02	58,23	27,93
signifikant		*		*	*	
APHA 5 µM	148,2	222,93	131,32	466,12	494,5	340,95
SD	9,23	55,15	41,08	169,7	163,72	82,28
SEM	3,77	22,51	16,77	69,28	66,84	33,59
signifikant		*		*	*	
APHA 1 µM	168,15	309,32	127,15	662,67	411,15	409,52
SD	25,75	159,87	34,67	252,65	59,72	48,64
SEM	10,51	65,27	14,15	103,14	24,38	19,86
signifikant		*		*	*	
APHA 0,5µM	175,73	265,47	132,28	768,47	526,42	398,17
SD	39,51	59,31	30,85	448,23	192,66	49,9
SEM	16,13	24,22	12,59	182,99	78,65	20,37
signifikant		*		*	*	

Tab. 13 zu Abb. 24. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	19h	24h	30h	44h	48h
Ohne Stimulation	131,03	71,85	87,73	205,3	131,78	288,03
SD	34,45	17,48	47,05	71,99	28,63	87,37
SEM	14,06	7,14	19,21	29,39	11,69	35,67
DMSO	212,85	107,67	140,47	234,07	161,92	293,6
SD	109,61	44,13	114,92	65,34	29,39	68,63
SEM	44,75	18,01	46,91	26,68	12	28,02
signifikant		*	*			
Troglitazon	179,05	252,97	138,28	629,08	470,03	424,3

10 µM						
SD	55,24	91,2	23,97	169,06	75,19	41,39
SEM	22,55	37,23	9,79	69,02	30,7	16,9
signifikant		*	*	*	*	*
Troglitazon	174,28	297,33	124,93	539,93	380,57	376,47
5 µM						
SD	34,18	37,5	21,14	140,85	69,16	43,73
SEM	13,95	15,31	8,63	57,5	28,24	17,85
signifikant		*		*	*	
Troglitazon	200,23	192,73	549,03	262,38	234,28	216,58
2,5 µM						
SD	61,55	73,78	192,15	73,26	61,62	78,28
SEM	25,13	30,12	78,44	29,91	25,15	31,96
signifikant		*	*		*	

Tab. 14 zu Abb. 25. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	18h	24h	28h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	188,2	176,4	258,7	2285,5	114,2	187,2
SD	19,5	55,7	56,1	423,3	20,6	31,9
SEM	6,9	19,7	19,8	149,7	7,3	11,3
DMSO	199,1	181,4	257,1	1989,6	118,5	216,6
SD	51,6	43,2	59,4	679,8	16,5	45,8
SEM	18,2	15,3	21	240,3	5,8	16,2
signifikant						
Rosiglitazon	120,6	146,3	236,3	722	114,6	173,2
20µM						
SD	49,7	41,6	78,4	88,4	45,2	59,6
SEM	17,6	14,7	27,7	31,3	16	21,1
signifikant	*			*		
Rosiglitazon	150	179,3	304,3	995,8	135,3	187,1
10µM						
SD	38,9	54,5	118,1	223,2	35,8	72,4
SEM	13,7	19,3	41,8	78,9	12,6	25,6
signifikant				*		

Tab. 15 zu Abb. 26. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant

($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit(Stunden) Stimulation	6h	18h	24h	28h	43h	48h
Ohne Stimulation	188,2	176,4	258,7	2285,5	114,2	187,2
SD	19,5	55,7	56,1	423,3	20,6	31,9
SEM	6,9	19,7	19,8	149,7	7,3	11,3
DMSO	199,1	181,4	257,1	1989,6	118,5	216,6
SD	51,6	43,2	59,4	679,8	16,5	45,8
SEM	18,2	15,3	21	240,3	5,8	16,2
signifikant						
Pioglitazon 20 μ M	179,4	271,3	115,2	348,1	109,5	477
SD	27,8	72,5	28,5	102,2	25,5	142,3
SEM	9,8	25,6	10,1	36,1	9	50,3
signifikant		*	*	*		*
Pioglitazon 10 μ M	165,2	251,7	120,8	404,8	100,5	480,2
SD	12	53,8	20,7	141,5	23,4	162
SEM	4,2	19	7,3	50	8,3	57,3
signifikant		*	*	*		*

Tab. 16 zu Abb. 27. 125 I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); $n=8$. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) Stimulation	6h	18h	24h	48h
Ohne Stimulation	732,4	788,5	676,8	283,5
SD	121,4	74,6	130,5	35,7
SEM	49,6	26,4	46,1	12,6
DMSO	629,3	885,1	781,6	320,5
SD	159,3	244,9	148,2	117,9
SEM	65	86,6	52,4	41,7
signifikant				
Arsentrioxid 2 μ M	541,3	708,5	656,6	250,2
SD	92,9	146,4	239,6	29,5
SEM	35,1	55,3	84,7	10,4

SEM signifikant				
Akt-Inhibitor 2 μ M	678,5	436	490,7	701
SD	186,9	86,8	73,8	148,2
SEM signifikant	66,1	30,7 *	26,1 *	52,4 *
Akt-Inhibitor 5 μ M	720,6	411,8	594,9	697,7
SD	122	92,9	120,4	152
SEM signifikant	43,1	32,9 *	42,6	53,7 *
Akt-Inhibitor 10 μ M	607,6	506,6	528,6	749,3
SD	157,6	60,3	72,5	275
SEM signifikant	55,7	21,3 *	25,6	97,2 *
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 μ M + 2 μ M	545,5	554,9	535,6	639,7
SD	101,2	45,5	43,1	165,5
SEM signifikant	35,8	16,1 *	15,2	58,5 *
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 μ M + 2 μ M	517,7	515,2	545,1	657,5
SD	136,3	98,4	25,9	135,3
SEM signifikant	48,2	34,8 *	9,2	47,8 *
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 μ M + 2 μ M	422,4	458,1	490,1	534,5
SD	129,7	57,2	88,4	74,3
SEM signifikant	45,9	20,2 *	31,3	26,3 *

Tab. 17 zu Abb. 28. 125 I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	24h	30h	48h
Stimulation			
Ohne Stimulation	144	123,6	134,5
SD	36,1	20,7	10,7

SEM	14,7	8,5	4,4
DMSO	128,3	114,1	119
SD	8,3	0,2	21,8
SEM	3,4	0,1	8,9
signifikant			
Arsentrioxid 2µM	50	116,1	110,9
SD	13,5	16,4	25,2
SEM	5,5	6,7	10,3
signifikant	*		
Akt-Inhibitor 2 µM	133,5	118	126,4
SD	24,1	19,9	39,8
SEM	9,8	8,1	16,2
signifikant			
Akt-Inhibitor 5 µM	132,9	96,7	120,5
SD	20,2	13,6	22,1
SEM	8,2	5,6	9
signifikant			
Akt-Inhibitor 10 µM	149,3	167,2	136,5
SD	21,9	38,5	21,9
SEM	8,9	15,7	8,9
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM	146,1	122,3	112,9
SD	17,6	19,7	25,1
SEM	7,2	8	10,2
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM	132,6	122,3	98
SD	12,1	23,5	25
SEM	4,9	9,6	10,2
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM	130,7	151,3	120,1
SD	19,1	25,3	17,3
SEM	7,8	10,3	7,1
signifikant			

Tab. 18 zu Abb. 29. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant

($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	24h	30h	48h
Stimulation			
Ohne Stimulation	190,7	146	306,6
SD	104,2	50,5	51,9
SEM	42,5	20,6	21,2
DMSO	179,8	215,4	453,4
SD	39,1	42	131,5
SEM	15,9	17,2	53,7
signifikant			
Arsentrioxid 2 μ M	135,4	124,6	260,9
SD	60,7	27,9	51
SEM	24,8	11,4	20,8
signifikant			
Akt-Inhibitor 2 μ M	102,5	159,1	332,9
SD	4,7	33,9	54,4
SEM	1,9	13,8	22,2
signifikant		*	
Akt-Inhibitor 5 μ M	103,9	154	357,3
SD	10,4	31,7	70,9
SEM	4,3	12,9	29
signifikant		*	
Akt-Inhibitor 10 μ M	116,6	168,1	375,5
SD	20	43,5	76,5
SEM	8,2	17,8	31,2
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 μ M + 2 μ M	74,9	213,7	361,9
SD	8,5	64,6	45,3
SEM	3,5	26,4	18,5
signifikant		*	
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 μ M + 2 μ M	82	166,8	376,8
SD	16,8	67,5	51,7
SEM	6,9	27,5	21,1
signifikant		*	
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 μ M + 2 μ M	89,1	121	389,1
SD	12,4	9,4	75,9

SEM signifikant	5,1	3,8 *	31
--------------------	-----	----------	----

Tab. 19 zu Abb. 30. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	168,9	84,7	197,3
SD	16,6	27,6	66,5
SEM	6,8	11,3	27,2
DMSO	182,4	90,3	171
SD	38,3	13,7	38,8
SEM	15,6	5,6	15,8
signifikant			
Arsentrioxid 2 μM	253,5	99,5	265
SD	130,3	29,1	152,8
SEM	53,2	11,9	62,4
signifikant			
Akt-Inhibitor 2 μM	219,3	73	269,2
SD	49,6	7,8	81,5
SEM	20,2	3,2	33,3
signifikant			
Akt-Inhibitor 5 μM	179	95,6	239,4
SD	38,9	15	36,6
SEM	15,9	6,1	15
signifikant			
Akt-Inhibitor 10 μM	233,6	127	289,7
SD	60,8	83,5	132,2
SEM	24,8	34,1	54
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 μM + 2 μM	249,7	111,1	287,9
SD	47	30,3	86,8
SEM	19,2	12,4	35,4
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 μM + 2 μM	229,3	117,1	280,5

SD	50,8	38,2	68,5
SEM	20,7	15,6	28
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM	205,1	106,2	241,8
SD	47,3	27,5	51,8
SEM	19,3	11,2	21,1
signifikant			

Tab. 20 zu Abb. 31. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	335,3	206,3	431
SD	41,3	22,7	64,2
SEM	20,7	11,4	32,1
DMSO	277	127,9	367,3
SD	43,2	94,1	94,1
SEM	21,6	47,1	47,1
signifikant			
Arsentrioxid 2µM	336	242,2	442,8
SD	34,6	95,2	89,8
SEM	14,1	38,9	36,7
signifikant			
Triciribin 0,1 µM	346	235,6	365,3
SD	121,3	51,9	94,3
SEM	42,9	18,3	33,3
signifikant			
Triciribin 1 µM	402,7	314,8	443
SD	67,1	34,4	71,8
SEM	23,7	12,2	25,4
signifikant			
Triciribin 5 µM	401,1	259	383,5
SD	49,2	23,7	59,6
SEM	17,4	8,4	21,1
signifikant			
Triciribin 10 µM	438	259	323,4
SD	90,9	20	110,5
SEM	32,2	7,1	39,1
signifikant			
Triciribin 20 µM	240,2	265,8	328,4

SD	24,7	95,8	20,9
SEM	8,7	33,9	7,4
signifikant			
Triciribin +	229	240	348,2
Arsentrioxid			
0,1 µM + 2 µM	60	62,4	28,5
SD	21,2	22,1	10,1
SEM			
signifikant			
Triciribin +	332,7	287,6	295,8
Arsentrioxid			
1 µM + 2 µM	54,4	78,8	102,8
SD	19,2	27,9	36,3
SEM			
signifikant			
Triciribin +	270,2	255,1	373,7
Arsentrioxid			
5 µM + 2 µM	57,8	34,2	63,7
SD	20,4	14	22,5
SEM			
signifikant			
Triciribin +	280,4	289,4	417,2
Arsentrioxid			
10 µM + 2 µM	36,5	67	45,7
SD	12,9	27,3	16,1
SEM			
signifikant			
Triciribin +	273,8	221,4	329,1
Arsentrioxid			
20 µM + 2 µM	59,2	64,8	42,6
SD	20,9	26,5	15
SEM			
signifikant			

Tab. 21 zu Abb. 32. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	24h	30h	48h
Stimulation			
Ohne Stimulation	199,03	184,23	268,08
SD	107,43	78,26	64,8
SEM	53,72	39,13	32,4
DMSO	164,7	291,18	433,13

SD	7,07	21,21	54,46
SEM	3,54	10,6	27,23
signifikant			
Arsentrioxid 2µM	392,4	210	298
SD	120,8	76,2	68,2
SEM	42,7	26,9	24,1
signifikant	*		
Triciribin 0,1 µM	165,1	284,8	428,8
SD	35,4	63,5	247,1
SEM	12,5	22,5	87,3
signifikant			
Triciribin 1 µM	169,4	279,6	1725,8
SD	47,5	63,6	1512,6
SEM	16,8	22,5	534,8
signifikant			*
Triciribin 5 µM	158,7	250,3	1416,1
SD	37,3	70,6	1803,2
SEM	13,2	24,9	637,5
signifikant			*
Triciribin 10 µM	129	276,6	691,7
SD	23,6	55,5	303,1
SEM	8,3	19,6	107,1
signifikant			
Triciribin 20 µM	157,7	233,9	932,4
SD	33,1	69,4	818,1
SEM	11,7	24,5	289,3
signifikant			
Triciribin + Arsentrioxid	392,8	271,6	253,4
0,1 µM + 2 µM	124,4	122,8	42,9
SD	44	43,4	15,2
SEM	*		
signifikant			
Triciribin + Arsentrioxid	405,9	398,3	279,6
1 µM + 2 µM	104,3	154,1	77,6
SD	36,9	54,5	27,4
SEM	*		
signifikant			
Triciribin + Arsentrioxid	427,8	413,7	282,2
5 µM + 2 µM	120,8	192,1	68,2
SD	42,7	67,9	24,1
SEM	*		
signifikant			
Triciribin + Arsentrioxid	425,7	362,2	256,3
10 µM + 2 µM	128,5	150,5	54

SD		45,4	53,2	19,1
SEM		*		
signifikant				
Triciribin	+	504	304,2	225,8
Arsentrioxid				
20 µM + 2 µM		66,2	112,3	43,4
SD		23,4	39,7	15,3
SEM		*		
signifikant				

Tab. 22 zu Abb. 33. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	15007,6	72601	87681,5	82730,4	95302,9	87657,8
SD	3311,7	11488,5	4336,5	5150,4	4335,3	4399,8
SEM	1170,9	4061,8	1533,2	1821	1532,8	1555,6
Methanol	13891,9	58313	73749	69976,8	90682,6	85265,6
SD	3608,1	16857,2	5639	13905,9	5660,8	5898,4
SEM	1275,6	5959,9	1993,7	4916,5	2001,4	2085,4
signifikant						
Retinol 13 µM	11315,5	77783,9	74710,6	77066,3	93770,9	80744,6
SD	6149,9	11536,9	19171,5	4521,8	2943,4	8388,7
SEM	2174,3	4078,9	6778,1	1598,7	1040,6	2965,8
signifikant						
Retinol 6,5 µM	77,57,4	60032,8	69998,3	71131,3	89918,5	82615,9
SD	4061,8	14993	83336,6	1960,1	5769,9	9758,5
SEM	1436,1	5300,8	2947,4	693	2040	3450,1
signifikant			*	*		
Retinol 3,25 µM	6644	42822,3	61693,6	68858,3	91912	80290,8
SD	2200,7	7287,1	7303,1	4807,6	4372,8	4590,1
SEM	778,1	2576,4	2582	1699,7	1546	1622,8
signifikant	*		*	*		
Retinol 1,6 µM	8086,3	24724,6	56113,3	57387,6	79530,5	85498,9
SD	4036,9	18849,5	16084,2	5732,3	7760,6	6187,5
SEM	1427,3	6664,3	5686,6	2026,7	2743,8	2187,6
signifikant		*	*	*	*	

Tab. 23 zu Abb. 34. ^3H -Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Ohne Stimulation	15007,6	72601	87681,5	82730,4	95302,9	87657,8
SD	3311,7	11488,5	4336,5	5150,4	4335,3	4399,8
SEM	1170,9	4061,8	1533,2	1821	1532,8	1555,6
Methanol	13891,9	58313	73749	69976,8	90682,6	85265,6
SD	3608,1	16857,2	5639	13905,9	5660,8	5898,4
SEM	1275,6	5959,9	1993,7	4916,5	2001,4	2085,4
signifikant						
all-trans-Retinsäure 2 μM	12243,5	80673,3	88649,3	77802,3	92056,4	78575
SD	7266,3	3848,6	5424,8	5210,6	5178,2	4959,3
SEM	2569	1360,7	1918	1842,2	1830,8	1753,4
signifikant						
all-trans-Retinsäure 1 μM	10295,8	61418,5	81056	72999,9	89038,5	81464,5
SD	5847	6145,2	7505,1	4191,8	5193,3	4017
SEM	2067,2	2172,7	2653,5	1482	1836,1	1420,2
signifikant				*		
all-trans-Retinsäure 0,5 μM	8514,9	49373,8	65217,5	63368,3	83774,8	74481,5
SD	2536,3	12018,3	10179,9	27535,1	4939,6	10620,6
SEM	896,7	4249,1	3599,1	9735,1	1746,4	3755
signifikant			*	*	*	*

Tab. 24 zu Abb. 35. ^3H -Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit(Stunden) \ Stimulation	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Ohne Stimulation	15007,6	72601	87681,5	82730,4	95302,9	87657,8
SD	3311,7	11488,5	4336,5	5150,4	4335,3	4399,8
SEM	1170,9	4061,8	1533,2	1821	1532,8	1555,6
Methanol	13891,9	58313	73749	69976,8	90682,6	85265,6
SD	3608,1	16857,2	5639	13905,9	5660,8	5898,4

SEM signifikant	1275,6	5959,9	1993,7	4916,5	2001,4	2085,4
9-cis- Retinsäure 2 µM	8182,6	42168,5	65007	61561,3	88194,1	78001,9
SD	1630,4	5446,3	12205,6	6242,5	3119,1	6230
SEM signifikant	576,4	1925,5	4315,3 *	2207 *	1102,8	2202,6 *
9-cis- Retinsäure 1 µM	10943,3	66968,6	82277,6	77417,8	89015,8	78695,8
SD	3287,9	3944,3	10835	3234,1	3323,1	5911,6
SEM signifikant	1162,4	1394,5	3830,7	1143,4	1174,9	2090,1
9-cis- Retinsäure 0,5 µM	10009,5	64061,5	77587,3	79260,3	77217,6	80631,6
SD	2090,5	9143,1	11578,3	4413,3	31482,8	5901,1
SEM signifikant	739,1	3232,6	4093,6	1560,3	11130,9	2086,4

Tab. 25 zu Abb. 36. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=12. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	16727,1	28903,6	35756,8	45185,7	42634,3	42587,6
SD	1652,4	3045,6	7029,3	6971,7	2546,9	1522,1
SEM	477	879,2	2029,2	2012,6	735,2	439,4
DMSO	47712	39363,7	47328,8	74931,9	69765,1	71716
SD	425,8	3229,2	7524,6	7543,3	4733,5	2847
SEM signifikant	122,9 *	932,2 *	2172,2 *	2177,6 *	1366,4 *	821,8
5-Aza- deoxycytidin 10 µM	7403,3	55723,8	59156,5	79644,3	79352,5	80215,4
SD	915,5	5154,3	5969,8	8633,4	6375,8	22529,8
SEM signifikant	264,3 *	1487,9 *	1723,3 *	2492,2 *	1840,5 *	6503,8 *
5-Aza- deoxycytidin 5 µM	7451,4	59650,3	60446,3	83470,8	88374,2	70018,3

SD	718,9	6808,4	9508,7	5338,7	4540,7	31627,9
SEM	207,5	1965,4	2744,9	1541,2	1310,8	9130,2
signifikant	*	*	*	*	*	
5-Aza-deoxycytidin 1 µM	9705,3	61588,1	64778,4	76675,5	82742,3	82601,5
SD	2484,3	4816,5	13449,6	4697,3	5143,7	6322,7
SEM	717,2	1390,4	3882,6	1356	1484,9	1825,2
signifikant	*	*	*	*	*	*
5-Aza-deoxycytidin 0,5 µM	11843,8	56791,9	65734,4	89114,3	78511,8	86154,3
SD	3390,8	3524,2	7998,2	4454,8	25404,6	5894,6
SEM	978,9	1017,4	2308,9	1286	7333,7	1701,6
signifikant	*	*	*	*	*	*

Tab. 26 zu Abb. 37. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=12. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	16727,1	28903,6	35756,8	45185,7	42634,3	42587,6
SD	1652,4	3046,6	7029,3	6971,7	2546,9	1522,1
SEM	477	879,2	2029,2	2012,6	735,2	439,4
Ethanol	3758	27684,6	37254,2	66871,7	76171,3	59567,6
SD	847,1	6390,1	4892,1	8047,8	8683,8	30049,1
SEM	244,5	1844,7	1412,2	2322,2	2506,8	8674,4
signifikant		*	*	*	*	
Mevinolin 100µM	2719,7	19390,3	23481,7	27728,5	27344,1	30272,2
SD	795,9	3303,9	1890,9	1514	3478,3	1213,6
SEM	229,7	953,8	545,9	437	1004,1	350,3
signifikant	*	*	*	*	*	
Mevinolin 50µM	4359,3	45002,3	52579,8	61489,7	59023,8	66929,9
SD	1069,6	12156,8	7817,5	4636,9	7612,6	5231,6
SEM	308,8	3509,4	2256,7	1338,5	2197,6	1510,2
signifikant	*	*	*	*	*	
Mevinolin 37µM	3396,2	37910,5	46999,8	59185	59979,1	59967
SD	1047,4	8723,3	3382,2	5284,8	5410,2	27788,5
SEM	302,4	2518,2	976,3	1525,6	1561,8	8021,8
signifikant	*	*	*	*	*	
Mevinolin 25µM	4249,8	48657,6	58425,7	63071,3	60581,4	76518,1
SD	2474,6	7214,7	5662,9	4859,7	7511,5	11142,9

SEM signifikant	714,3 *	2082,7 *	1634,7 *	1402,9 *	2168,4 *	3216,7 *
Mevinolin 12µM	4279,1	36656,3	45739,1	60087,1	65049,4	84435
SD	1803,5	5792,5	7406,5	7629,2	5923,6	2888,5
SEM signifikant	520,6 *	1672,1 *	2138,1 *	2202,4 *	1710 *	833,8 *

Tab. 27 zu Abb. 38. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	Zeit (Stunden)					
	6h	19h	24h	30h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	13701,6	91895,5	93613,4	106007,8	97170	28099,8
SD	1724,3	6904,3	14180,3	7392	10190,1	35198,4
SEM	609,6	2441,1	5013,5	2613,5	3602,7	12444,5
Valproinsäure 3 mM	16501,6	112027,9	129643	116540,3	108533,8	22366,5
SD	1289,1	3731,2	21500,7	11364,5	4803,1	28020,7
SEM signifikant	455,8 *	1319,2 *	7601,6 *	4018 *	1698,2 *	9906,8
Valproinsäure 1 mM	14055,6	98762,3	109769	118908,3	115780,8	26088
SD	2644,9	13102,6	17822,7	11033,6	1633,7	28992
SEM signifikant	935,1	4632,5	6301,3 *	3901 *	577,6 *	10250,2
Valproinsäure 0,5 mM	21172,4	88742,4	98864,6	104310,3	103362,9	37307,4
SD	2762,9	5276,8	6633,8	3124,8	3783,6	38434,3
SEM signifikant	976,8	1865,6	2345,4	1104,8	1337,7	13588,6

Tab. 28 zu Abb. 39. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=12. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit(Stunden) Stimulation	7h	19h	24h	30h	44h	48h
Ohne Stimulation	127,57	8146,2	13324,8	12858,9	15373,5	19485,9
SD	1713,7	5576,3	7612,6	5063,6	10809,8	4304,7
SEM	494,7	1609,7	2197,6	1461,7	3120,5	1242,7
DMSO	3393,9	12642,3	19186,7	24747,8	9306,7	23816,8
SD	466,3	3944,8	3448,7	6033,8	10828,5	4461,8
SEM	134,6	1138,8	995,6	1741,8	3125,9	1288
signifikant	*			*		
Apicidin 500 nM	769	6229,5	10948,9	17921,1	10746	10793,8
SD	304	2763,6	4439,4	8894,1	7831,2	10504
SEM	87,7	797,8	1281,5	2567,5	2260,7	3032,2
signifikant	*					
Apicidin 200 nM	772,3	7049,4	16420	27366,3	16370,2	21532,8
SD	665	3191,3	5976,4	6529,6	11976,8	12089,2
SEM	192	921,2	1752,2	1884,9	3457,4	3489,9
signifikant	*					
Apicidin 100 nM	1329,1	12116,9	17185,1	24405,4	14077,8	23619,3
SD	440,2	8796,7	5908,5	5434,2	13059,6	11095,3
SEM	127,1	2539,4	1705,6	1568,7	3770	3202,9
signifikant	*				*	*
Apicidin 15 nM	2068,8	14741,5	17288,3	17642,4	11086	20567,4
SD	1094,8	7573,7	6791,9	8308,8	9976,9	9218,9
SEM	316,1	2186,3	1960,7	2398,6	2880,1	2661,3
signifikant	*	*		*	*	
Apicidin 10 nM	2342,8	13752,5	19410,9	20791,1	29099,9	23587,8
SD	1595,4	4588,7	4945,9	5811,1	3609,5	8040,8
SEM	460,6	1324,6	1427,8	1677,5	1042	2321,2
signifikant	*					*

Tab. 29 zu Abb.40. ^3H -Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=12. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit(Stunden) Stimulation	6h	19h	24h	30h	44h	48h
Ohne	1275,7	8146,2	13324,8	12858,9	15373,5	19485,9

Stimulation						
SD	1713,7	5576,3	7612,6	5063,6	10809,8	4304,7
SEM	494,7	1609,7	2197,6	1461,7	3120,5	1242,7
DMSO	3393,9	12642,3	19186,7	24747,8	9306,7	23816,8
SD	466,3	3944,8	3448,7	6033,8	10828,5	4461,8
SEM	134,6	1138,8	995,6	1741,8	3125,9	1288
signifikant				*	*	
APHA 50 µM	4444,8	7364,5	15392,1	25816,7	16374,9	12173,1
SD	1358,8	2153,8	2653,2	2068,3	4396,2	7214,3
SEM	392,3	621,8	765,9	597,1	1269,1	2082,6
signifikant						
APHA 10 µM	2539,8	6341,5	19546,8	29593,7	16575,9	6843,8
SD	1115,8	2638,4	7957,2	2417,6	11213,9	9274,4
SEM	322,1	761,6	2297	697,9	3237,2	2677,3
signifikant	*	*				*
APHA 5 µM	2149,8	4263,9	11472,9	22360,7	9960,6	14860,6
SD	1989,9	3019,2	8806,9	6155,3	11037,9	12607,8
SEM	574,4	871,6	2542,3	1776,9	3186,4	3639,6
signifikant	*	*		*	*	
APHA 1 µM	2693,3	4490,8	8508,4	23267	14901,3	5225,8
SD	3053,5	2798,8	4669,2	7097,7	10318,8	7675
SEM	881,5	808	1347,9	2048,9	2978,8	2215,6
signifikant	*			*	*	*
APHA 0,5µM	4254	8029,7	16019,3	21507,5	13569,7	9584,8
SD	4773,7	5683	6687,4	6912,6	10569	11812
SEM	1378	1640,6	1930,5	1995,5	3051	3409,8
signifikant	*	*			*	

Tab. 30 zu Abb. 41. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=12. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)		6h	19h	24h	30h	44h	48h
Stimulation							
Ohne Stimulation		1275,7	8146,2	13324,8	12858,9	15373,5	19485,9
SD		1713,7	5576,3	7612,6	5063,6	10809,8	4304,7
SEM		494,7	1609,7	2197,6	1461,7	3120,5	1242,7
DMSO		3393,9	12642,3	19186,7	24747,8	9306,7	23816,8
SD		466,3	3944,8	3448,7	6033,8	10828,5	4461,8
SEM		134,6	1138,8	995,6	1741,8	3125,9	1288
signifikant		*			*	*	
Troglitazon 10 µM		5187,2	14770,8	24554,6	34895,3	17030,2	9837,8
SD		2333,6	3995,9	4689,8	2748,9	13556,4	11936,1

SEM signifikant	673,6 *	1153,5	1353,8	793,5 *	3913,4	3445,7
Troglitazon 5 µM	6190,8	10589,2	27067	32496	20995,8	13418,8
SD	2958,2	2843,8	2346,4	3625,7	9024,2	10963,3
SEM signifikant	854 *	820,9	677,4	1046,7	2605,1	3164,8
Troglitazon 2,5 µM	1376,3	13205,1	21298,1	26895,6	24652,3	29659,8
SD	1845,4	4513,6	4955,7	3906,5	1526,5	9887,8
SEM signifikant	532,7 *	1303	1430,6 *	1127,7	440,7	2854,4 *

Tab. 31 zu Abb. 42. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=12. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	Zeit (Stunden)					
	6h	18h	24h	28h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	2289,6	43741	44293,2	32316,8	67458	66456,2
SD	1492,2	14186	15328,4	7805,8	9729,4	8314,8
SEM	430,8	4095,1	4424,9	2253,4	2808,6	2400,3
DMSO	2548,1	59749	53256,7	47284,1	68214,3	57714,8
SD	1969,4	16681	15713,5	12003,5	5025,8	18332,6
SEM signifikant	568,5	4815,4	4536,1	3465,1	1450,8 *	5292,2
Rosiglitazon 20µM	4916,3	54214,3	59768,5	52778,3	67679,2	56619,3
SD	3482,8	10099,8	13878,5	17026,3	7733,5	31279,7
SEM signifikant	1005,4	2915,6	4006,4	4915,1	2232,5	9029,7
Rosiglitazon 10µM	2294,5	62689	46448,6	56038	73773,2	42677,1
SD	2544,9	12992,5	18016,7	11361,9	8189,5	32084
SEM signifikant	734,6	3750,6	5201	3279,9	2364,1	9261,9

Tab. 32 zu Abb.43. ³H-Thymidininkorporation in malignen humanen Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=12. Werte gelten als signifikant

($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit(Stunden)	6h	18h	24h	28h	43h	48h
Stimulation						
Ohne Stimulation	2289,6	43741	44293,2	32316,8	67458	66456,2
SD	1492,2	14186	15328,4	7805,8	9729,4	8314,8
SEM	430,8	4095,1	4424,9	2253,4	2808,6	2400,3
DMSO	2548,1	59749	53256,7	47284,1	68214,3	57714,8
SD	1969,4	16681	15713,5	12003,5	5025,8	18332,6
SEM	568,5	4815,4	4536,1	3465,1	1450,8	5292,2
signifikant					*	
Pioglitazon 20 μ M	1253,9	39059,3	54882,8	40365,5	45504,5	37635,8
SD	437,8	11715,7	15069,5	14556,2	15082,7	30817,4
SEM	126,4	3382	4350,2	4202	4354	8896,2
signifikant						
Pioglitazon 10 μ M	1818,4	33452,9	48131	35696,8	41866,4	55151
SD	1015,9	8606,8	11112,8	14680,9	10106,1	16987,8
SEM	293,3	2484,6	3208	4238	2917,4	4904
signifikant						

Tab. 33 zu Abb. 44. ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); $n=6$. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	24h	30h	48h
Stimulation			
Ohne Stimulation	113324,5	110830,5	74297,8
SD	2465,3	4007,3	45005,8
SEM	1232,7	2003,6	22502,9
DMSO	121050,1	115031,9	17554,5
SD	10587,4	5987,4	34243,3
SEM	3743,2	2116,9	12106,8
signifikant			*
Arsentrioxid 2 μ M	116628,5	109515,8	28086,5
SD	3939,6	12659,9	12230,8
SEM	1969,8	6329,9	6115,4
signifikant			
Akt-Inhibitor	103509,4	103968,4	15164,6

2 µM SD SEM signifikant	6597,7 2332,6	5570,8 1969,6	26030,9 9203,3 *
Akt-Inhibitor 5 µM SD SEM signifikant	115269,4 5016,5 1773,6	119970,6 19845,1 7016,3	10635,8 12398,6 4383,6 *
Akt-Inhibitor 10 µM SD SEM signifikant	122822 3807,4 1346,1	115749,8 18574,3 6567	17985,5 23878,9 8442,5
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM SD SEM signifikant	114956,9 10336,4 3654,5	102828,6 24344,3 8607	28595,1 32430,2 11465,8
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM SD SEM signifikant	106332,9 20715,6 7324,1	219805,6 14223,9 5028,9	26604,6 32680,5 11554,3
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM SD SEM signifikant	118263,5 3543,2 1252,7	12188,1 3444,1 1217,7	35563,1 22177,1 7840,8

Tab. 34 zu Abb. 45. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) Stimulation	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	91045	57223,3	2028,5
SD	14935	6979	564,5
SEM	5280,3	2467,4	199,6
DMSO	92715,5	63409,9	4617,3
SD	16476,6	17804,1	7724,4

SEM signifikant	5825,3	6294,7	2731
Arsentrioxid 2µM SD SEM signifikant	36154,3 8630,3 3051,3 *	58087,5 6676 2360,3	11784,3 14781,4 5226
Akt-Inhibitor 2 µM SD SEM signifikant	104187,8 18165,1 6422,3	53756,8 8545 3021,1	10090,5 15475 5471,2
Akt-Inhibitor 5 µM SD SEM signifikant	107479,1 7646,4 2703,4	56505,6 13977,3 4941,7	10866,5 15012,3 5307,6
Akt-Inhibitor 10 µM SD SEM signifikant	102518 17855,6 6312,9	57866 23135,9 8179,8	9241,4 10199,5 3606,1
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM SD SEM signifikant	39118,5 6399,4 2262,5 *	68181,9 15152,5 5357,2	16048,6 19634,8 6942 *
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM SD SEM signifikant	41595,9 18485,2 6535,5 *	55714,4 13505 4774,7	17794,1 18501,8 6541,4 *
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM SD SEM signifikant	30853,3 6934,1 2451,6 *	71071,1 28203,6 9971,5	15602 18530,4 6551,5 *

Tab. 35 zu Abb. 46. ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	24h	30h	48h
Ohne Stimulation SD SEM	102959,3 9794,7 3463	81607,8 12897,5 4560	15371,9 21108 7462,8
DMSO SD SEM signifikant	108724,8 59124,1 20903,5	100979,5 34035,7 12033,4	5208,1 2273,8 803,9
Arsentrioxid 2µM SD SEM signifikant	107397,3 14217,2 5026,5	85586,6 17440,7 6166,2	15009,1 9667,9 3418
Akt-Inhibitor 2 µM SD SEM signifikant	109103,6 17715,9 6263,5	109343,4 31248 11047,8	8997,3 11314,4 4000,2
Akt-Inhibitor 5 µM SD SEM signifikant	118731,3 20156,5 7126,4	96460,3 16042,3 5671,8	12881,9 17690,4 6254,5
Akt-Inhibitor 10 µM SD SEM signifikant	106358,8 13874,4 4905,3	113223,5 16090,9 5689	103678,9 9646,8 3410,7
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM SD SEM signifikant	107569,1 23696,5 8378	98754 18233,7 6446,6	15608,4 13288,1 4698
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM SD SEM signifikant	117835,4 35716,2 12627,6	107149 12461,5 4405,8	15291,8 9722,7 3437,5
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM SD SEM signifikant	107270,3 53132,1 18785	96271,4 50780,3 17953,5	14885,9 13809,6 4882,4

Tab. 36 zu Abb. 47. ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	41377,5	55954,75	64892,25
SD	6612,62	16797,51	7130,78
SEM	3306,31	8398,75	3565,39
DMSO	32671	38680,5	44770
SD	6701,93	7994,54	6905,79
SEM	3350,97	3997,27	3452,89
signifikant			
Arsentrioxid 2 μM	50789,9	50969,4	64681,5
SD	6556	7469,6	9199
SEM	2317,9	2640,9	3252,3
signifikant			
Triciribin 0,1 μM	28491	36063,6	49222,6
SD	10402,9	9520,1	8335,2
SEM	3678	3365,9	2946,9
signifikant			
Triciribin 1 μM	32984,9	42712,1	44796,6
SD	6860,9	6650	4849,5
SEM	2425,7	2351,1	1714,6
signifikant			
Triciribin 5 μM	27379,5	38789,3	39499
SD	4157,2	5864	4254,5
SEM	1469,8	2073,2	1504,2
signifikant			
Triciribin 10 μM	22906,4	25174	29544,3
SD	4621	9352,6	5131,9
SEM	1633,8	3306,6	1814,4
signifikant		*	*
Triciribin 20 μM	12092,3	12550,9	11420,3
SD	1836,8	2900,6	1090
SEM	649,4	1025,5	385,4
signifikant		*	*
Triciribin + Arsentrioxid 0,1 μM + 2 μM	29746,3	52686,6	40902,1
SD	13769,9	10160,7	4595,6
SEM	4868,4	3592,3	1624,8
signifikant			*
Triciribin +	37992,6	50897,4	45905,8

Arsentrioxid 1 µM + 2 µM SD SEM signifikant	5084,6 1797,7	9794 3462,7	8625,8 3049,7 *
Triciribin + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM SD SEM signifikant	26201,4 4098 1448,9	36134,3 4334,5 1532,5	32013,5 9190,7 3249,4 *
Triciribin + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM SD SEM signifikant	21345,8 3189,1 1127,5	25286,4 3321,9 1174,5	28083,1 4396,7 1554,5 *
Triciribin + Arsentrioxid 20 µM + 2 µM SD SEM signifikant	11367,4 2073,9 733,3	15246,5 1409 498,2	11908 1326,7 469,1 *

Tab. 37 zu Abb. 48: Nachweis von NIS und Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 24 Stunden eingefärbt und mittels Mikroskop ausgewertet. Des Weiteren wurden unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt t=0 ebenfalls ausgewertet (Nullwert). Die als positiv gewerteten Zellen werden in der Tabelle in Prozent angegeben.

Protein	NIS	Pendrin
Stimulation		
Nullwert	35%	
Ohne Stimulation	25%	7,5%
Methanol	30%	0%
Ethanol	45%	20%
Retinol 3,2 µM	55%	10%
all-trans-Retinsäure 0,5 µM	25%	5%
Mevinolin 50 µM	70%	15%
Valproinsäure 1 mM	80%	20%

Tab. 38 zu Abb. 49: Nachweis von NIS und Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 48 Stunden eingefärbt und mittels

Mikroskop ausgewertet. Des Weiteren wurden unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt t=0 ebenfalls ausgewertet (Nullwert). Die als positiv gewerteten Zellen werden in der Tabelle in Prozent angegeben.

Stimulation \ Protein	NIS	Pendrin
Nullwert	35%	
Ohne Stimulation	40%	2,5%
Methanol	25%	2,5%
Ethanol	90%	60%
Retinol 3,2 µM	60%	30%
all-trans-Retinsäure 0,5 µM	80%	40%
Mevinolin 50 µM	60%	40%
Valproinsäure 1 mM	90%	75%

Tab. 39 zu Abb. 50: Nachweis von NIS und Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 24 Stunden eingefärbt und mittels Mikroskop ausgewertet. Des Weiteren wurden unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt t=0 ebenfalls ausgewertet (Nullwert). Die als positiv gewerteten Zellen werden in der Tabelle in Prozent angegeben.

Stimulation \ Protein	NIS	Pendrin
Nullwert	70%	30%
Ohne Stimulation	70%	20%
DMSO	85%	10%
Troglitazon 10 µM	80%	30%
Apicidin 200 nm	60%	0-10%
APHA 5 µM	80-90%	10%
Rosiglitazon 10 µM	40%	0%
Pioglitazon 10 µM	20-30%	10%
5-Aza-deoxycytidin 5 µM	40-50%	0-10%

Tab. 40 zu Abb. 51: Nachweis von NIS und Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 48 Stunden eingefärbt und mittels Mikroskop ausgewertet. Des Weiteren wurden unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt t=0 ebenfalls ausgewertet (Nullwert). Die als positiv gewerteten Zellen werden in der Tabelle in Prozent angegeben.

Stimulation \ Protein	NIS	Pendrin
Nullwert	70%	30%

Ohne Stimulation	65%	35%
DMSO	85%	25%
Troglitazon 10 µM	55%	25%
Apicidin 200 nm	75%	20%
APHA 5 µM	45%	0%
Rosiglitazon 10 µM	95%	30%
Pioglitazon 10 µM	45%	45%
5-Aza-deoxycytidin 5 µM	30%	5%

Tab. 41 zu Abb. 52: Nachweis von NIS und Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 24 Stunden eingefärbt und mittels Mikroskop ausgewertet. Des Weiteren wurden unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt t=0 ebenfalls ausgewertet (Nullwert). Die als positiv gewerteten Zellen werden in der Tabelle in Prozent angegeben.

Stimulation \ Protein	NIS	Pendrin
Nullwert	75%	45%
Ohne Stimulation	55%	50%
DMSO	70%	50%
Arsentrioxid 2 µM	85%	45%
Akt-Inhibitor 2 µM	60%	50%
Triciribin 20 µM	85%	25%
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2µM + 2 µM	55%	5%
Triciribin + Arsentrioxid 20 µM + 2 µM	40%	15%

Tab. 42 zu Abb. 53: Nachweis von NIS und Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 48 Stunden eingefärbt und mittels Mikroskop ausgewertet. Des Weiteren wurden unstimulierte Zellen zum Zeitpunkt t=0 ebenfalls ausgewertet (Nullwert). Die als positiv gewerteten Zellen werden in der Tabelle in Prozent angegeben.

Stimulation \ Protein	NIS	Pendrin
Nullwert	75%	
Ohne Stimulation	55%	15%
DMSO	80%	10%
Arsentrioxid 2 µM	60%	20%
Akt-Inhibitor 2 µM	90%	15%
Triciribin 20 µM	95%	50%

Akt-Inhibitor Arsentrioxid 2µM + 2 µM	+	35%	10%
Triciribin + Arsentrioxid 20 µM + 2 µM		60%	30%

Tab. 43 zu Abb. 54. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	54,17	168,17	83,5	168,83
SD	9,26	74,06	6,83	36,79
SEM	4,63	37,03	3,42	18,39
Methanol	68,17	139,33	111	187,17
SD	21,01	42,21	38,46	64,47
SEM	10,5	21,1	19,23	32,24
signifikant				
Ethanol	77,8	54,3	115	116,5
SD	22,9	10,1	40,9	20,5
SEM	8,1	3,6	14,5	7,2
signifikant	*	*		*
Retinol 3,2 µM	66,3	113	92	138,3
SD	9,4	40,3	15,5	27,5
SEM	3,3	14,3	5,5	9,7
signifikant				
all-trans-Retinsäure 0,5 µM	75,5	63,2	63,7	118,8
SD	17,3	26,9	14,3	20,8
SEM	6,1	9,5	5,1	7,3
signifikant		*		
Mevinolin 50 µM	77,8	108,3	134,7	87,7
SD	5,8	35,5	43,7	33,5
SEM	2,1	12,5	15,4	11,9
signifikant	*			*
Valproinsäure 1 mM	65,8	118,2	83,2	79,7
SD	8,2	59,3	18,1	15,5
SEM	2,9	21	6,4	5,5
signifikant				*

Tab. 44 zu Abb. 55. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	351	606,7	532,5	522,7
SD	125,3	178	142,1	69,6
SEM	51,2	72,7	58	28,4
DMSO	518,5	771,2	555,2	492,5
SD	165,9	270,9	238	92,3
SEM	67,7	110,6	97,2	37,7
signifikant				
Troglitazon 10 μM	429,8	755,2	526,7	502,7
SD	110,1	294,5	121,4	97,2
SEM	44,9	120,2	49,6	39,7
signifikant				
Apicidin 200 nm	981	678,7	627,3	516,2
SD	764,8	149,8	124,1	33,9
SEM	312,2	61,2	50,7	13,8
signifikant	*			
APHA 5 μM	754,7	815,3	499	570,3
SD	148,6	478,7	50,3	141,4
SEM	60,7	195,4	20,5	57,7
signifikant	*			
Rosiglitazon 10 μM	675,2	692	535,8	458
SD	114,8	284,4	47,2	56,8
SEM	46,9	116,1	19,3	23,2
signifikant	*			
Pioglitazon 10 μM	698,7	818,7	584,2	435,5
SD	90,2	358,9	52,4	63,6
SEM	36,8	146,5	21,4	26
signifikant	*			
5-Aza- deoxycytidin 5 μM	600,7	475,5	556	467,8
SD	88,2	248,7	154,5	47,4

SEM signifikant	36	101,5	63,1	19,3
--------------------	----	-------	------	------

Tab. 45 zu Abb. 56. ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	24h	30h	48h
Stimulation				
Ohne Stimulation	231,5	455,83	339	463,17
SD	26,77	116,26	57,74	43,3
SEM	13,39	58,13	28,87	21,65
DMSO	346	583,33	408,67	463,5
SD	83,12	317,02	70,89	142,7
SEM	41,56	158,51	35,45	71,35
signifikant				
Arsentrioxid 2 μM	283,2	522,5	393,2	489,5
SD	38,7	137,8	77	89,2
SEM	13,7	48,7	27,2	31,6
signifikant				
Akt-Inhibitor 2 μM	320	582,2	355,8	559,5
SD	93,7	63,1	64,3	66,1
SEM	33,1	22,3	22,7	23,4
signifikant				
Triciribin 20 μM	345,2	452,3	383,8	390,7
SD	94,6	100,3	37,6	105,1
SEM	33,5	35,5	13,3	37,2
signifikant				
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 μM + 2 μM	397	449,5	372,3	446
SD	72	73,3	49,5	185,8
SEM	25,5	25,9	17,5	65,7
signifikant	*			
Triciribin + Arsentrioxid 20 μM + 2 μM	310	551,2	402,2	409
SD	82	69,9	51,6	115

SEM signifikant	29	24,7	18,2	40,7
--------------------	----	------	------	------

Tab. 46 zu Abb. 57. ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant ($p < 0,05$), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	6h	24h	30h	48h
Stimulation				
Ohne Stimulation	36868,25	100755	90038	97048,25
SD	3362,95	3943,69	13193,24	8445,37
SEM	1188,98	1394,3	4664,51	2985,89
Methanol	13891,88	73749	69976,75	85265,63
SD	3608,06	5639	13905,87	5898,41
SEM	1275,64	1993,69	4916,47	2085,4
signifikant	*	*		*
Ethanol	3907,5	38419,63	69994,5	62083,13
SD	997,86	5120,99	9272,14	31191,42
SEM	352,8	1810,54	3278,2	11027,83
signifikant	*	*	*	
Retinol 3,2 μM	6644	61693,63	68858,25	80290,75
SD	2200,75	7303,12	4807,59	4590,08
SEM	778,08	2582,04	1699,74	1622,84
signifikant	*	*		*
all-trans-Retinsäure 0,5 μM	8514,88	65217,5	63368,25	74481,5
SD	2536,28	10179,87	27535,08	10620,63
SEM	896,71	3599,13	9735,12	3754,96
signifikant	*	*		*
Mevinolin 50 μM	4722,63	53239,13	60626	65946
SD	1144,72	9651,04	5317,78	6248,23
SEM	404,72	3412,16	1899,21	2209,08
signifikant	*	*	*	
Valproinsäure 1 mM	103935,38	111561,38	115780,75	26088
SD	6320,3	14781,88	1633,74	28992,04
SEM	2234,56	5226,19	577,61	10250,24
signifikant	*		*	*

Tab. 47 zu Abb. 58. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidnaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	29482	78078	93943,5	86399,3
SD	6304	28291,7	38098,4	40015,1
SEM	2228,8	10002,6	13469,8	14147,5
DMSO	54027,8	93177,9	86354,9	52138,6
SD	13634,8	13807	14050,7	43675,1
SEM	4820,6	4881,5	4967,7	15441,5
signifikant	*			
Troglitazon 10 µM	41473,3	93362	81769,1	50178,4
SD	3509,9	16432,9	7094,9	32490
SEM	1240,9	5809,9	2508,4	11486,9
signifikant	*			
Apicidin 200 nm	34779,8	89346,8	79960	64615,9
SD	7555,6	5675,1	8088,3	26399,8
SEM	2671,3	2006,5	2859,6	9333,7
signifikant		*		
APHA 5 µM	32054,1	102588,5	100859,8	47672,1
SD	7179,2	26062,5	50290,1	31092,7
SEM	2538,2	9214,5	17780,2	10992,9
signifikant		*		
Rosiglitazon 10 µM	43999,8	96791,5	81731,5	49511,5
SD	4919,5	7462,7	8547,5	25920,6
SEM	1739,3	2638,5	3022	9164,3
signifikant	*			
Pioglitazon 10 µM	56612,1	94663,3	91791,5	96507,1
SD	22210,9	7770,7	32100,1	34152,6
SEM	7852,7	2747,4	11349,1	12074,8
signifikant	*			
5-Aza-deoxycytidin 5 µM	47733,4	105712	83963,6	74845,6
SD	6787,5	24823,4	12068,8	15134,6
SEM	2399,7	8776,4	4267	5350,9
signifikant	*			

Tab. 48 zu Abb. 59. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	6h	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	36868,25	100755	90038	97048,25
SD	3362,95	3943,69	13193,24	8445,37
SEM	1188,98	1394,3	4664,51	2985,89
DMSO	46521,75	100598,88	94785,75	90532,38
SD	7180,89	13459,91	8838,65	7546,56
SEM	2538,83	4758,8	3124,93	2668,11
signifikant				
Arsentrioxid 2 µM	23550,38	106290,63	92361,38	94139
SD	6663,4	10794,75	10638,63	6355,99
SEM	2355,87	3816,52	3761,33	2247,18
signifikant				
Akt-Inhibitor 2 µM	44957	87549,38	100574,75	88710,38
SD	26001,62	25646,82	9814,35	6258,19
SEM	9192,96	9067,52	3469,9	2212,61
signifikant				
Triciribin 20 µM	36268,25	95024,88	92483	74268,13
SD	3353,72	18242,19	12048,88	12073,44
SEM	1185,72	6449,59	4259,92	4268,6
signifikant				*
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM	40912,25	101406,25	107977,38	84796,88
SD	27352,3	9645,74	9692,94	9567,47
SEM	9670,5	3410,29	3426,97	3382,61
signifikant			*	
Triciribin + Arsentrioxid 20 µM + 2 µM	36592,5	105315	105480,5	87667,88
SD	6462,08	25694,3	10247,6	17748,76
SEM	2284,69	9084,31	3623,07	6275,14
signifikant				

Tab. 49 zu Abb. 65a. Apoptoserate der kultivierten malignen humanen Thyrozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 in Prozent. Angegeben sind Einzelwerte, Mittelwert, sowie STABW und SEM.

Stimulanzen	24 Stunden					
	Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert	Standardabweichung	SEM
Ohne Stimulation	9,06	11,07	11,28	10,5	1,2	0,5
Ethanol	13,29	11,73	9,18	11,4	2,1	0,8
Methanol	10,4	12,44	10,58	11,1	1,1	0,5
DMSO	13,35	14,08	10,6	12,7	1,8	1,1
Retinol 3,2 µM	13,57	13,16	11,87	12,9	0,9	0,5
all-trans- Retinsäure 0,5 µM	16,23	6,26	7,94	10,1	5,3	3,1
5-Aza- deoxycytidin 5 µM	13,57	15,41	13,03	14	1,2	0,7
Mevinolin 50 µM	22,58	23,55	21,31	22,5	1,1	0,6
Staurosporin	45,37	54,19	41,7	47,1	6,4	3,7
H2O2	13,18	13,25	14,34	13,6	4,9	2,8

Tab. 50 zu Abb. 65a. Apoptoserate der kultivierten malignen humanen Thyrozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 in Prozent. Angegeben sind Einzelwerte, Mittelwert, sowie STABW und SEM.

Stimulanzen	48 Stunden					
	Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert	Standardabweichung	SEM
Ohne Stimulation	22,83	22,62	23,06	22,8	0,2	0,1
Ethanol	20,42	20,77	24,89	22	2,5	1
Methanol	16,35	23,15	20,02	19,8	3,4	1,4
DMSO	15,51	20,21	23,76	19,8	4,1	2,4
Retinol 3,2 µM	18,03	22,61	23,91	21,5	3,1	1,8
all-trans- Retinsäure	8,08	7,16	7,39	7,5	0,5	0,3

0,5 µM						
5-Aza-deoxycytidin 5 µM	23,17	24,79	23,48	23,8	0,9	0,5
Mevinolin 50 µM	83,23	82,47	83,12	82,9	0,4	0,2
Staurosporin	79,52	75,48	47,71	67,6	17,3	10
H2O2	71,05	73,94	83,16	76,1	33,3	19,2

Tab. 51 zu Abb. 65b. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodid-einbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	149,8	170,1	141,2
SD	94,2	129,1	15,3
SEM	38,4	52,7	6,3
Methanol	151,2	153,8	134,6
SD	60,8	28,7	17,6
SEM	24,8	11,7	7,2
signifikant			
Ethanol	152,3	190,6	138,2
SD	38,4	65,5	24,1
SEM	15,7	26,7	9,8
signifikant			
DMSO	165,7	128,9	138,4
SD	61,9	10,2	23,4
SEM	25,3	4,2	9,5
signifikant			
Retinol 3,2 µM	188,6	124,1	126,9
SD	25,2	31,2	22,8
SEM	10,3	12,8	9,3
signifikant			
All-trans-Retinsäure 0,5 µM	271,7	142,4	122,9
SD	78,7	34,7	14,6
SEM	32,1	14,2	6
signifikant	*		
5-Aza-deoxycytidin 5 µM	363,1	140,3	126
SD	203,3	23,3	17,1

SEM signifikant	83 *	9,5	7
Mevinolin 50 µM	206,5	129,7	100,9
SD	33,8	26,2	14
SEM signifikant	13,8	10,7	5,7 *

Tab. 52 zu Abb. 65c. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	24h	30h	48h
Stimulation			
Ohne Stimulation	88444,5	94484,9	85705,5
SD	9574,9	12201,2	72775,1
SEM	3385,2	4313,8	25729,9
Methanol	97296,8	100899	87419,1
SD	2700,2	2666,1	56963
SEM signifikant	954,7 *	942,6	20139,5
Ethanol	99150,9	100860,6	90822,8
SD	2096,4	3969,7	37251,4
SEM signifikant	741,2 *	1403,5	13170,4
DMSO	96206	99814,8	99114,9
SD	1101,9	4188,9	4896,5
SEM signifikant	389,6	1481	1731,2
Retinol 3,2 µM	98384,4	100574,1	86909,9
SD	2502	4199,2	29018,5
SEM signifikant	884,6 *	1484,7	10259,6
all-trans- Retinsäure 0,5 µM	80296,8	94945,8	82023,6
SD	8330,9	3588,6	38106,1
SEM signifikant	2945,4	1268,8	13472,5
5-Aza- deoxycytidin 5 µM	104768,9	106503,8	89205,3
SD	3884,2	2524,3	4700,8
SEM	1373,3	892,5	1662

signifikant	*	*	
Mevinolin 50 µM	60499,5	62263,1	31034,9
SD	4511,5	4025,3	3036,2
SEM	1595	1423,2	1073,4
signifikant		*	

Tab. 53 zu Abb. 66a. Apoptoserate der kultivierten malignen humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 in Prozent. Angegeben sind Einzelwerte, Mittelwert, sowie STABW und SEM.

Stimulantien	24 Stunden					
	Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert	Standardabweichung	SEM
Ohne Stimulation	11,67	9,94	21,26	14,3	6,1	2,5
DMSO	11,83	11,15	10,24	11,1	0,8	0,3
Arsentrioxid 2 µM	8,87	7,57	7,12	7,9	0,9	0,4
Akt-Inhibitor 2 µM	5,22	5,88	4,71	5,3	0,6	0,3
Akt-Inhibitor 5 µM	5,63	7,07	8,15	7	1,3	0,7
Akt-Inhibitor 10 µM	11,09	10,08	8,69	10	1,2	0,7
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM	6,97	6,04	12,45	8,5	3,5	2
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM	6,8	8,06	14,34	9,7	4	2,3
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM	8,34	6,12	6,96	7,2	1,1	0,6
Valproinsäure 1 mM	6,29	5,35	4,33	5,3	3,1	1,8
Valproinsäure 0,5 mM	6,45	4,15	4,37	5	1,3	0,7
Staurosporin	46,58	36,64	36,74	40	5,7	3,3
H2O2	44,41	28,45	26,91	33,3	9,7	5,6

Tab. 54 zu Abb. 66a. Apoptoserate der kultivierten malignen humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 in Prozent. Angegeben sind Einzelwerte, Mittelwert, sowie STABW und SEM.

Stimulantien	48 Stunden					
	Wert1	Wert2	Wert3	Mittelwert	Standardabweichung	SEM
Ohne Stimulation	35,23	35,17	34,67	35	0,3	0,1
DMSO	25,08	27,2	27,38	26,6	1,3	0,5
Arsentrioxid 2 μ M	28,8	28,05	27,27	28	0,8	0,3
Akt-Inhibitor 2 μ M	17,62	16,53	15,18	16,4	1,2	0,7
Akt-Inhibitor 5 μ M	15,47	18,13	19,98	17,9	2,3	1,3
Akt-Inhibitor 10 μ M	34,47	49,45	40,73	41,6	7,5	4,3
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 μ M + 2 μ M	29,58	30,03	26,17	28,6	2,1	1,2
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 μ M + 2 μ M	31,77	36,6	27,08	31,8	4,8	2,7
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 μ M + 2 μ M	17,08	19,67	23,88	20,2	3,4	2
Valproinsäure 1 mM	9,8	16,15	14,88	13,6	4,2	2,4
Valproinsäure 0,5 mM	18,28	22,22	16,12	18,9	3,1	1,8
Staurosporin	42,2	44,75	51,68	46,2	4,9	2,8
H ₂ O ₂	88,47	80,77	77,12	82,1	5,8	3,3

Tab. 55 zu Abb. 66b. ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=6. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Iodidaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Iodideinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden)	24h	30h	48h
Stimulation			

Ohne Stimulation	144	123,6	134,5
SD	36,1	20,7	10,7
SEM	14,7	8,5	4,4
DMSO	128,3	114,1	119
SD	8,3	0,2	21,8
SEM	3,4	0,1	8,9
signifikant			
Arsentrioxid 2µM	50	116,1	110,9
SD	13,5	16,4	25,2
SEM	5,5	6,7	10,3
signifikant	*		
Akt-Inhibitor 2 µM	133,5	118	126,4
SD	24,1	19,9	39,8
SEM	9,8	8,1	16,2
signifikant			
Akt-Inhibitor 5 µM	132,9	96,7	120,5
SD	20,2	13,6	22,1
SEM	8,2	5,6	9
signifikant			
Akt-Inhibitor 10 µM	149,3	167,2	136,5
SD	21,9	38,5	21,9
SEM	8,9	15,7	8,9
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM	146,1	122,3	112,9
SD	17,6	19,7	25,1
SEM	7,2	8	10,2
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM	132,6	122,3	98
SD	12,1	23,5	25
SEM	4,9	9,6	10,2
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM	130,7	151,3	120,1
SD	19,1	25,3	17,3
SEM	7,8	10,3	7,1
signifikant			

Tab. 56 zu Abb. 66c. ³H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Angegeben sind Mittelwert, Standardabweichung (SD) und

Standardfehler des Mittelwerts (SEM); n=8. Werte gelten als signifikant (p<0,05), wenn ihre Thymidinaufnahme mindestens um das 1,4fache von der Thymidineinbaurrate der Kontrolle (Thyreozyten ohne Kontrolle) abweicht (*).

Zeit (Stunden) \ Stimulation	24h	30h	48h
Ohne Stimulation	113324,5	110830,5	74297,8
SD	2465,3	4007,3	45005,8
SEM	1232,7	2003,6	22502,9
DMSO	121050,1	115031,9	17554,5
SD	10587,4	5987,4	34243,3
SEM	3743,2	2116,9	12106,8
signifikant			*
Arsentrioxid 2µM	116628,5	109515,8	28086,5
SD	3939,6	12659,9	12230,8
SEM	1969,8	6329,9	6115,4
signifikant			
Akt-Inhibitor 2 µM	103509,4	103968,4	15164,6
SD	6597,7	5570,8	26030,9
SEM	2332,6	1969,6	9203,3
signifikant			*
Akt-Inhibitor 5 µM	115269,4	119970,6	10635,8
SD	5016,5	19845,1	12398,6
SEM	1773,6	7016,3	4383,6
signifikant			*
Akt-Inhibitor 10 µM	122822	115749,8	17985,5
SD	3807,4	18574,3	23878,9
SEM	1346,1	6567	8442,5
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 2 µM + 2 µM	114956,9	102828,6	28595,1
SD	10336,4	24344,3	32430,2
SEM	3654,5	8607	11465,8
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 5 µM + 2 µM	106332,9	219805,6	26604,6
SD	20715,6	14223,9	32680,5
SEM	7324,1	5028,9	11554,3
signifikant			
Akt-Inhibitor + Arsentrioxid 10 µM + 2 µM	118263,5	12188,1	35563,1

SD	3543,2	3444,1	22177,1
SEM	1252,7	1217,7	7840,8
signifikant			

8. Literaturverzeichnis

- Agarwal B., Bhendwal S., Halmos B., Moss S.F., Ramey W.G., Holt P.R.
(1999) Lovastatin Augments Apoptosis Induced by Chemotherapeutic Agents in Colon Cancer Cells.
Clinical Cancer Research; 5: 2223-2229
- Aturi F., Russo D., Giuffrida D., Schlumberger M.
(2000) Sodium-iodide symporter (NIS) gene expression in lymph-node metastases of papillary thyroid carcinomas.
Eur J Endocrinol; 143: 623-627
- Au W., Chim C.S., Lie A.K., Liang R., Kwong Y.L.
(2002) combined arsenic trioxide and all-trans retinoic treatment for acute promyelocytic leukemia recurring from previous relapses successfully treated using arsenic trioxide.
Br J Haematol; 117: 130-132
- Bennett S.M., Agrawal A., Elasha H., Heise M., Jones N.P., Walker M., Wilding J.P.
(2004) Rosiglitazone improves insulin sensitivity, glucose tolerance and ambulatory blood pressure in subjects with impaired glucose tolerance.
Diabet Med; 21(5): 415-22
- Bidart J.M., Mian C., Lazar V., Russo D., Filetti S., Caillou B., Schlumberger M.
(2000) Expression of pendrin and the pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues.
J Clin Endocrinol Metab; 85: 2028-33.
- Brower V.
(2003) Of Cancer and Cholesterol: Studies Elucidate Anticancer Mechanisms of Statins.
J Nat Cancer Institute; 95(12):844-846
- Cai X., Shen Y-L., Zhu Q., Jia P-M., Yu Y., Zhou L., Huang Y., Zhang Y-W., Xiong S-M., Chen S-J., Wang Z-Y., Chen Z., Chen C-Q.
(2000) Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia.
Leukemia; 14(2): 262-270
- Cannon C.P., Braunwald E., McCabe C.H., Rader D.J., Rouleau J.L., Belder R., Joyal S.V., Hill K.A., Pfeffer M.A., Skene A.M.
(2004) Pravastatin or Atorvastatin Evaluation and Infection Therapy-Thrombolysis in Myocardial Infarction 22 Investigators. Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes.

N Engl J Med.; 350(15): 1495. 1504.

Casey M.B., Lohse C.M., Lloyd R.V.

(2003) Distinction Between Papillary Thyroid Hyperplasia and Papillary Thyroid Carcinoma by Immunohistochemical Staining for Cytokeratin 19, Galectin-3, and HBME-1.

Endocrine Pathology; 14(1): 55-60

Catalano MG., Fortunati N., Pugliese M. et al.

(2005) Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells.

J Clin Endocrinol Metab; 90:1383-1389

Chambard M., Verrier B., Gabrion J., Mauchamp J.

(1983) Polarization of thyroid cell culture: evidence for the basolateral localization of the iodide pump and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex.

J Cell Biol; 96: 1172-77.

Cheung C.C., Ezzat S., Ramyar L., Freeman J., Asa S.L.

(2000) Molecular basis of Hurthle cell papillary thyroid carcinoma.

J Clin Endocrinol Metab; 85: 878. 882.

Cheung C.C., Ezzat S., Freeman J.L., Rosen I.B., Asa S.L.

(2001) Immunohistochemical Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma.

Mod Pathol; 14(4): 338. 342

Chou W.C., Dang C.

(2005) Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to arsenic therapies.

Current Opinion in Hematology; 12(1):1-6

Chun Y.J., Park I.C., Park M.J., Woo S.H., Hong S.I., Chung H.Y., Kim T.H., Lee Y.S., Rhee C.H., Lee S.H.

(2002) Enhancement of radiation response in human cervical cancer cells in vitro and in vivo by arsenic trioxide (As₂O₃).

FEBS Lett; 519: 195-200

Cohen Y., Xing M., Mambo E., Guo Z., Wu G., Trink B., Beller U., Westra W.H., Ladenson P.W., Sidransky D.

(2003) BRAF Mutation in Papillary Thyroid Carcinoma.

J Nat Cancer Institut; 95(8): 625

Cress W. D., Seto, E.

(2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer.

J. Cell. Physiol.; 184: 1-16

- De la Vieja A., Ginter C.S., Carrasco N.
 (2003) The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing the NIS turnover number.
 J Cell Science; 117: 677-687
- Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S.
 (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer.
 Nature; 417: 949. 54.
- Demetri G.D., Fletcher C.D., Mueller E., Sarraf P., Naujoks R., Campbell N., Spiegelman B.M., Singer S.
 (1999) Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor- ligand troglitazone in patients with liposarcoma.
 Proc Natl Acad Sci ; 96: 3951-3952
- Depasquale I., Wheatley D.N.
 (2006) Action of Lovastatin (Mevinolin) on an in vitro model of angiogenesis and its co-culture with malignant melanoma cell lines.
 Cancer Cell International; 6:9
- De Ruijter A.J.M., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B.P.
 (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.
 Biochem. J.; 370: 737. 749
- Dohán O., Baloch Z., Bánrévi Z., Livolsi V., Carrasco N.
 (2001) RAPID COMMUNICATION: Predominant Intracellular Overexpression of the Na⁺/I⁻ Symporter (NIS) in a Large Sampling of Thyroid Cancer Cases.
 J Clin Endocrinol & Metab; 86(6): 2697-2700
- Donghi R., Longoni A., Pilotti S., Michieli P., Della Porta G., Pierotti M.
 (1993) Gene p53 mutations are restricted to poorly differentiated and undifferentiated carcinomas of the thyroid gland.
 J Clin Invest; 91:1753. 1760
- Eng C., Mulligan L.M., Healey C.S., Houghton C., Frilling A., Raue F., Thomas G.A., Ponder B.A.J.
 (1996) Heterogeneous Mutation of the RET Proto-oncogene in Subpopulations of Medullary Thyroid Carcinoma.
 Cancer Research; 56: 2167-2170
- Filetti S., Bidart J.M., Arturi F., Caillou B., Russo D., Schlumberger M.
 (1999) Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism.

European Journal of Endocrinology;141: 443. 457.

Fonseca E., Nesland J., Hoie J., Sobrinho-Simoes M.

(1997) Pattern of expression of intermediate cytokeratin filaments in the thyroid gland: an immunohistochemical study of simple and stratified epithelial-type cytokeratins.
Virchows Arch; 430: 239. 245.

Fortunati N., Catalano M., Arena K., Brignar dello E., Piovesan A., Boccuzzi G.

(2004) Valproic acid induces the expression of the Na⁺/I⁻ Symporter and iodine uptake in poorly differentiated thyroid cancer cells.
J Clin. Endocrinol & Metab; 89(2):1006. 1009

Fröhlich E., Machicao F., Wahl R.

(2005) Action of thiazolidinediones on differentiation, proliferation and apoptosis of normal and transformed thyrocytes in culture.
Endocrine-Related Cancer; 12(2): 291. 303

García-Rostán G., Tallini G., Herrero A., D'Aquila T.G., Carcangiu M.L., Rimm D.L.

(1999) Frequent Mutation and Nuclear Localization of β -Catenin in Anaplastic Thyroid Carcinoma.
Cancer Research; 59: 1811. 1815,

García-Rostán G., Costa A.M., Pereira-Castro I., Salvatore G., Hernandez R., Hermsem M.J.A., Herrero A., Fusco A., Cameselle-Teijeiro J., Massimo Santoro M.

(2005) Mutation of the PIK3CA Gene in Anaplastic Thyroid Cancer.
Cancer Research; 65: 10199-10207

Gärtner R.

(1992) Thyroid growth in vitro
Exp. Clin. Endocrinol.; 100(1-2): 32-5

Ghobrial I.M., Witzig T.E., Adjei A.A.

(2005) Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy.
CA Cancer J Clin; 55: 178-194

Gimm O.

(2001) Thyroid cancer.
Cancer Lett; 163: 143. 56.

Graaf MR., Richel DJ., van Noorden CJ. et al

(2004) Effect of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and the progression of cancer.
Cancer Treat Rev; 30:609-641

Gratzl M., Junqueira L. C., Carneiro J., Kelley R.O.

(2002) Zellkern
Histologie, 21-34

Haugen B.R., Larson L.L., Pugazhenti U., Hays W.R, Klopper J.P., Kramer C.A., Sharma V.

(2004) Retinoic Acid and Retinoid X Receptors Are Differentially Expressed in Thyroid Cancer and Thyroid Carcinoma Cell Lines and Predict Response to Treatment with Retinoids.
J Clin Endocrinol & Metab; 89(1):272. 280

Heaney AP., Fernando M., Melmed S.

(2003) PPAR receptor ligands: novel therapy for pituitary adenomas.
J Clin. Invest.; 111(6): 1381-1388

Hernandez R., Teruel T., Lorenzo M.

(2003) Rosiglitazone produces insulin sensitisation by increasing expression of the insulin receptor and its tyrosine kinase activity in brown adipocytes.
Diabetologia; 46(12):161828

Ho Y-S., Tseng S-C., Chin T-Y., Hsieh L-L., Lin J-D.

(1996) p53 gene mutation in thyroid carcinoma.
Cancer Lett; 103: 57. 63

Hoang-Vu C., Bull K., Schwarz I. et al

Regulation of CD97 protein in thyroid carcinoma.
J Clin Endocrinol Metab; 84: 1104-1109

Holm R, Nesland J.M.

(1994) Retinoblastoma and p53 tumour suppressor gene protein expression in carcinomas of the thyroid gland.
J Pathol; 172: 267. 272

Huang X.

(2000) potentiation of arsenic trioxide-induced apoptosis by retinoic acid in retinoic acid sensitive and resistant HL-60 myeloid leukaemia cells.
Chin Med J (Engl); 113:498-501

Ishigaki K., Namba H., Nakashima M., Nakayama T., Mitsutake N., Hayashi T., Maeda S., Ichinose M., Kanematsu T., Yamashita S.

(2002) Aberrant Localization of β -Catenin Correlates with Overexpression of Its Target Gene in Human Papillary Thyroid Cancer.
J Clin Endocrinol Metab; 87(7): 3433-3440

Ito Y., Yoshida H., Tomoda C., Miya A., Kobayashi K., Matsuzuka F., Kakudo K., Kuma K., Miyauchi A.

- (2005) HBME-1 expression in follicular tumor of the thyroid: an investigation of whether it can be used as a marker to diagnose follicular carcinoma.
Anticancer Res.; 25(1A):179-82.
- Iwama T., Konishi M., Iijima T., Yoshinaga K., Tominaga T., Koike M., Miyaki M.
(1999) Somatic Mutation of the *APC* Gene in Thyroid Carcinoma Associated with Familial Adenomatous Polyposis.
Cancer Science; 90(4): 372
- Janka H.U.
(2001) Glitazone.
Der Internist, Springer Verlag; 587-596
- Jockenhövel F., Olbricht T.
(1993) Fragen und Antworten zur Epidemiologie und Ätiologie der Struma.
Z. Gesamte Inn. Med.; 48(12): 565-74
- Jones P., Baylin S.
(2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer.
Nature Reviews/Genetics; 02/6: 415-428
- Jung M.
(2001) Inhibitors of Histone Deacetylase as New Anti cancer Agents.
Current Medicinal Chemistry; 8(12): 1505-1511
- Kanzawa T., Zhang L., Xiao L., Germano I.M., Kondo Y., Kondo S.
(2005) Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3.
Oncogene; 24: 980. 991
- Karavitaki N., Vlassopoulou V., Tzanela M., Tzavara I., Thalassinou N.,
(2002) Recurrent and/or metastatic thyroid cancer: therapeutic options.
Expert Opin Pharmacother; 3(7): 939-47
- Kawa S., Nikaido T., Unno H., Usada N., Nakayama K., Kiyosawa K.
(2002) Growth inhibition and differentiation of pancreatic cancer cell lines by PPAR gamma ligand troglitazone.
Pancreas; 24(1): 1-7
- Kim C.S., Vasko V.V., Kato Y., Kr uhlak M., Saji M., Cheng S-Y., Ringel M.D.
(2005) AKT Activation Promotes Metastasis in a Mouse Model of Follicular Thyroid Carcinoma.
Endocrinology; 146(10): 4456-4463
- Kim R.

(2005) Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy.
Cancer;103(8): 1551 - 1560

Kitamura S., Miyazaki Y., Shinomura Y., Kondo S., Kanayama S., Matsuzawa Y.

(1999) Peroxisome proliferator-activated receptor induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancers cells.
Jpn J Cancer Res ; 90: 75-80

Klutmann S., Jenicke L., Geiss-Tonshoff M., Bohuslavizki K.H., Wester J., Clausen M.

(2001) Prevalence of iodine- and thyroglobin-negative findings in differentiated thyroid cancer.
Nuklearmedizin; 40(5): 143-47

Koeffler H.P.

(2003) Peroxisome proliferator-activated receptor and cancers.
Clin Cancer Res; 9: 1-9

Kogai T., Schultz J., Johnson L., Huang M., Brent G.

(2000) Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodine uptake in the MCF-7 breast cancer cell line.
Proc Natl Acad Sci USA; 97:8519. 8524

Kosugi S., Bhayana S., Dean H.J.

(1999) A Novel Mutation in the Sodium/Iodide Symporter Gene in the Largest Family with Iodide Transport Defect.
J Clinical Endocrinol & Metab; 84(9): 3248-3253

Kumar A., Bal C.S.

(2003) Differentiated thyroid cancer.
Indian J Pediatr.; 70(9): 707-13

Kurebayashi J., Tanaka K., Otsuki T., Moriya T., Kunisue H., Uno M. et al.

(2000) All-trans-retinoic acid modulates expression levels of thyroglobulin and cytokines in a new human poorly differentiated papillary thyroid carcinoma cell line, KTC-1.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism; 85: 2889. 2896.

Lazar V., Bidart JM., Caillou B., Mahe C., Lacroix L., Filetti S., Schlumberger M.

(1999) Expression of the Na⁺/I⁻ Symporter Gene in human thyroid tumors: a comparison study of other thyroid-specific genes.
J Clin Endocrinol Metab; 84: 3228-2234

Lawrence J.E., Lamm S.H., Pino S., Richman K., Braverman L.E.

(2000) The effect of short-term low-dose perchlorate on various aspects of thyroid function.

Thyroid.; 10: 659-663

Liu Z., Zhang L., Ding F., Li J., Guo M., Li W., Wang Y., Yu Z., Zhan Q., Wu M.
(2005) 5-Aza-2-deoxycytidine induces retinoic acid receptor-demethylation and growth inhibition in esophageal squamous carcinoma cells.
Cancer Letters; 230(2): 271-283

Lyko F.
(2002) Die Rolle der Epigenetik, Krebsentstehung.
Forum DKG; 06/02: 33-36

Maeda H., Hori S., Nishitoh H., Ichijo H., Ogawa O., Kakehi Y., Kakizuka A.
(2001) Tumor growth inhibition by arsen trioxide (As₂O₃) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer.
Cancer Res; 61: 5432-5440

Maltese W.A., Defendini R., Green R.A., Sheridan K.M., and Donley D.K.
(1985) Suppression of murine neuroblastoma growth in vivo by mevinolin, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase.
J Clin Invest.; 76(5): 1748. 1754.

Mandal M., Kim S. Younes M.N., Jasser S.A., El-Naggar A.K., Mills G.B., Myers J.N.
(2005) The Akt-Inhibitor KP372-1 suppresses Akt activity and cell proliferation and induces apoptosis in thyroid cancer cells.
Br J Cancer; 92(10): 1899-905

Martelli A.M., Tazzari P.L., Tabellini G., Bortul R., Billi A.M., Manzoli L., Ruggeri A., Conte R., Cocco L.
(2003) A new selective AKT pharmacological inhibitor reduces resistance to chemotherapeutic drugs, TRAIL, all-trans-retinoic acid, and ionizing radiation of human leukemia cells.
Leukemia; 17(9): 1794-1805

Mase T., Funahashi H., Koshikawa T., Imai T., Nara Y., Tanaka Y., Nakao A.
(2003) HBME-1 immunostaining in thyroid tumors especially in follicular neoplasm.
Endocr. J.; 50(2): 173-177

Mérino D., Lalaoui N., Morizot A., Schneider P., Solary E., Micheau O.
(2006) Differential Inhibition of TRAIL-Mediated DR5-DISC Formation by Decoy Receptors 1 and 2.
Molecular and Cellular Biology; 26(19): 7046-7055

Mian C., Lacroix L., Alzieu L., Nocera M., Talbot M., Bidart JM., Schlumberger M., Caillou B.

(2001) Sodium Iodide Symporter and Pendrin Expression in Human Thyroid Tissues
Thyroid; 11(9): 825-830

Miettinen M., Kärkkäinen P.

(1996) Differential reactivity of HBME-1 and CD15 antibodies in benign and malignant thyroid tumours.
Virchows Archiv, Springer Verlag; 429(4-5): 213-219

Miki K., Harada T., Miyai K., Takai S-I., Amino N.

(1997) Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na₂I₂ symporter.
Nat Genet; 16: 124. 125

Miller WH., Schipper H., Lee J., Jack Singer J., Waxman S.

(2002) Mechanisms of Action of Arsenic Trioxide.
Cancer Research; 62(14): 3893-3903

Momparler R.L.

(2005) Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine).
Semin. Oncol; 32(5): 443-51

Mueller E., Smith M., Sarraf P., Kroll T., Aiyer A., Kaufman D.S., Oh W., Demetri G., Frigg W.D., Zhou X.P., Eng C., Spiegelman B.M., Kantoff P.W.

(2000) Effects of ligand activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human prostate cancer.
Proc Natl Acad Sci ; 97: 10990-10995

Nakanishi K., Sakamoto M., Yasuda J., Takamura M., Fujita N., Tsuruo T., Todo S., Hirohashi S.

(2002) Critical Involvement of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway in Anchorage-independent Growth and Hematogeneous Intrahepatic Metastasis of Liver Cancer.
Cancer Research; 62: 2971-2975

Nicoletti I., Migliorati G., Pagliacci M.C., Grignani F., Riccardi C.

(1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.
J Immunol Methods; 139(2): 271-279

Nikiforova M.N., Kimura E.T., Gandhi M., Biddinger P.W., Knauf J.A., Basolo F., Zhu Z., Giannini R., Salvatore G., Fusco A., Santoro M., Fagin J.A., Nikiforov Y.E.

(2003) BRAF Mutations in Thyroid Tumors Are Restricted to Papillary Carcinomas and Anaplastic or Poorly Differentiated Carcinomas Arising from Papillary Carcinomas.
J Clinl Endocrinol Metab; 88(11): 5399-5404

Noh J.H., Eun J.W., Ryu S.Y., Park S.Y., Shin H.W., Kim S.Y., Lee S.H., Park W.S., Jang J.J., Lee J.Y., Nam S. W.

(2006) Inhibitory cascade of cell-cycle regulation by Apicindin, a histone deacetylase inhibitor in breast cancer cells through large-scale data analysis of gene expression profiling.
Proc Amer Assoc Cancer Res; 47

Orlandi F., Saggiorato E., Pivano G., Puligheddu B., Termine A., Cappia S., De Giuli P., Angeli A.

(1998) Galectin-3 Is a Presurgical Marker of Human Thyroid Carcinoma.
Cancer Research; 58: 3015-3020

Osaki M., Oshimura M., Ito H.

(2004) PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer.
Apoptosis; 9(6): 667-676

Paire A., Bernier-Valentin F., Selmi-Ruby S., Rousset B.

(1997) Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity.
J Biol Chem; 272(29): 18245-9.

Panigraphy D., Singer S., Shen L.Q., Butterfield C.E., Freedman D.A., Chen E.J., Moses M.A., Duensing S., Fletcher C., Fletcher J.A., Hlatky L., Hahnfeldt P., Folkman J., Kaipainen A.

(2002) PPRA ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis.
Am Soc Clin Invest; 110: 923-932

Park C., Inkyoung Lee I., Kang W.K.

(2001) Lovastatin-induced E2F-1 modulation and its effect on prostate cancer cell death.
Carcinogenesis; 22(10): 1727-1731

Pohlenz J., Medeiros-Neto G., Gross J.L., Silveiro S.P., Knobel M., Refetoff S.

(1997) Hypothyroidism in a Brazilian Kindred Due to Iodide Trapping Defect Caused by a Homozygous Mutation in the Sodium/Iodide Symporter Gene.
Biochemical and Biophysical Research Communications; 240(2): 488-491(4)

Rajagopalan H., Bardelli A., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E.

(2002) Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status.
Nature; 418: 934.

Ramos A.M., Fernández C., Amrán D., Sancho P., de Blas E., All er P.

(2005) Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukaemia cells.
Blood; 105(10): 4013-4020

Reinwein D., Röher H. D., Emrich D.

(1993) Therapie der Hyperthyreose aktueller Stand.
DMW 118. Jg. Nr. 27/28 1036-1043

Rodriguez A.M., Perron B., Lacroix L., Caillou B., Leblanc G., Schlumberger M., Bidart J.M., Pourcher T.

(2002) Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes.
J Clin Endocrinol Metab, 87(7): 3500-03.

Sahoo S., Hoda S.A., Rosai J., DeLellis R.A.

(2001) Cytokeratin 19 immunoreactivity in the diagnosis of papillary thyroid carcinoma: a note of caution.
Am J Clin Pathol.; 116(5): 696-702

Saito T., Endo T., Kawaguchi A., Ikeda M., Nakazato M., Kogai T und Onaya T.

(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

Saito T., Endo T., Kawaguchi A., Ikeda M., Katoh R., Kaaai A., Muramatsu A., Onaya T.

(1998) Increased expression of the sodium/iodine symporter in papillary thyroid carcinomas.
J Clin Invest; 101: 1296-1300

Santoro M., Dathan N.A., Berlingieri M.T., Bongarzone I., Paulin C., Grieco M., Pierotti M.A., Vecchio G., Fusco A.

(1994) Molecular characterization of RET/PTC3; a novel rearranged version of the RET proto-oncogene in a human thyroid papillary carcinoma.
Oncogene; 9(2): 509-16

Schuchmann M., Schattenberg J., Lohse A.W., Strand S., Galle P.R.

(2005) Histone Deacetylase Inhibitoren verstärken Empfindlichkeit von Hepatomzellen gegenüber CD95 vermittelter Apoptose . potentielle Rolle von Valproat in der Therapie des HCC.
Z Gastroenterol; 43

Seitz H.J.

(2003) Wirkungsmechanismus von Schilddrüsenhormonen.
Endokrinologie Informationen; 27(2): 43

- Schmutzler C., Winzer R., Meissner-Weigl J., Köhrle J.
 (1997) Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells.
 Biochemical and Biophysical Research Communications; 240: 832. 838.
- Schmutzler C., Hoang-Vu C., Ruger B. et al.
 (2004) Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses.
 Eur J Endocrinol; 150:547-556
- Schmutzler C., Winzer R., Meissner-Weigl J., Köhrle J.
 (1997) Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. Biochem Biophys Res Commun; 240:832. 838
- Schultze K., Böck B., Eckert A., Oevermann L., Ramacher D., Wiestler O., Roth W.
 (2006) Troglitazone sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via down-regulation of FLIP and Survivin.
 Apoptosis, Springer; 11(9): 1503-1512
- Scott D.A., Wang R., Kreman T.M., Sheffield V.C., Karninski L.P.
 (1999) The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein.
 Nat Genet; 21: 440-43.
- Shen Q., Cline G.W., Shulman G.I., Leibowitz M.D., Davies P.J.
 (2004) Effects of Retinoids on Glucose Transport and Insulin-mediated Signaling in Skeletal Muscles of Diabetic (db/db) Mice.
 Biol Chem; 279(19): 19721-31
- Simon D., Körber C., Krausch M., Segering J., Groth P., Görges R., Grünwald F., Gärtner HW., Schmutzler C., Köhrle J., Röher HD., Reiners C.
 (2002) Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study.
 European journal of nuclear Medicine; 29(6): 569-574
- Singer G., Oldt R. III, Cohen Y., Wang B.G., Sidransky D., Kurman R.J.
 (2003) Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade serous ovarian carcinoma.
 J Natl Cancer Inst; 95(6): 484-486
- Spitzweg C., Heufelder A., Morris J.
 (2000) Thyroid Iodine Transporter
 Thyroid Nummer 4 321

C. Spitzweg C., Scholz IV., Bergert ER., Tindall DJ., Young CYF., Göke B., Morris JC.

(2003) Retinoic Acid-Induced Stimulation of Sodium Iodide Symporter Expression and Cytotoxicity of Radioiodine in Prostate Cancer Cells
Endocrinology; 144(8):3423. 3432

Sugg S.L., Ezzat S., Rosen I.B., Freeman J., Asa S.L.

(1998) Distinct multiple ret/PTC gene rearrangements in multifocal papillary thyroid neoplasia.
J Clin Endocrinol Metab; 83: 4116. 4122.

Tabellini G., Tazzari PL., Bortul R., Evangelisti C., Billi AM., Grafone T., Martinelli G., Baccarani M., Martelli AM.

(2005) Phosphoinositide 3-kinase/Akt inhibition increases arsenic trioxide-induced apoptosis of acute promyelocytic and T-cell leukaemias.
Brit J Haem; 130 (5): 716-725

Takeuchi S., Okumura T., Motomura W., Nagamine M., Takahashi N., Kohgo Y.

(2002) Troglitazone Induces G1 Arrest by p27^{Kip1} Induction That Is Mediated by Inhibition of Proteasome in Human Gastric Cancer Cells.
Cancer Science; 93 (7): 774. 782

Tallini G., Asa S.L., Fuller G.N.

(2001) RET Oncogene Activation in Papillary Thyroid Carcinoma.
Advances in Anatomical Pathology; 8(6): 345-354

Timmermann S., Lehrmann H., Polesskaya A., Harel-Bellan A.

(2001) Histone acetylation and disease.
Cell. Mol. Life Sci; 58: 728-736

van de Donk N.W.C.J., Kamphuis M.M.J., Lokhorst H.M., Bloem A.C.

(2002) The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells.
Leukemia; 16(7): 1362-1371

Van Herle A.J., Agatep M.L., Padua D.N. III, Totanes T.L., Canlapan D.V., Van Herle H.M.

(1990) Effects of 13-cis-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA R0 82 W-1) in vitro.
J Clin Endocrinol Metab; 71: 755. 763.

Vazquez M., Silvestre J.S., Prous J.R.

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

Verspohl E.J., Weiland F.

- (2002) Insulinsensitizer.
Pharmazie in unserer Zeit; 280-292
- Vuky J., Yu R., Schwartz L., Motzer R.J.
(2002) Phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic renal cell carcinoma.
Invest New Drugs; 20, 327-330
- Wahl R.
(1991) Morphologische und biochemische Untersuchungen an der Schilddrüsenkultur
Theorie und Forschung, Bd. 161; Roderer, Regensburg
- Winczyk K., Pawlikowski M.
(2005) Immunohistochemical detection of PPAR receptors in the human pituitary adenomas: correlation with PCNA.
Folia histochemica et cytobiologica; 43(3): 137-141
- Wong W. W-L., Dimitroulakos J., Minden M.D., Penn L.Z.
(2002) HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis.
Leukemia; 16(4): 508-519
- Wozniak R.J., Klimecki W.T., Lau S.S., Feinstein Y., Futscher B.W.
(2006) 5-Aza-2'-deoxycytidine-mediated reductions in G9A histone methyltransferase and histone H3 K9 di-methylation levels are linked to tumor suppressor gene reactivation.
Oncogene; 26: 77-90
- Wu G., Mambo E., Guo Z., Hu S., Huang X., Gollin S.M., Trink B., Ladenson P.W., Sidransky D., Xing M.
(2005) Uncommon Mutation, but Common Amplifications, of the *PIK3CA* Gene in Thyroid Tumors.
J Clin. Endocrinol & Metab; 90(8): 4688-4693
- Xing M., Tokumaru Y., Wu G., Westra WB., Ladenson PW., Sidransky D.
(2003) Hypermethylation of the Pendred Syndrome Gene *SLC26A4* Is an Early Event in Thyroid Tumorigenesis
Cancer Res.; 63(9):2312-5.
- Zhang P.
(1999) The use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia.
J Biol Regul Homeost Agents; 13: 195-200
- Zheng P-Z., Wang K-K., Zhang Q-Y., Huang Q-H., Du Y-Z., Zhang Q-H., Xiao D-K., Shen S-H., Imbeaud S., Eveno E., Zhao C-J., Chen Y-L., Fan H-Y., Waxman S., Auffray C., Jin G., Chen S-J., Chen Z., Zhang J.

(2005) Systems analysis of transcriptome and proteome in retinoic acid/arsenic trioxide-induced cell differentiation/apoptosis of promyelocytic leukaemia.
PNAS; 102(21): 7653-7658

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Wahl für die Überlassung des Themas, sowie für seine hilfreichen Anregungen und Ideen.
- Frau Prof. Dr. Fröhlich für ihre Ratschläge und Hilfe bei der Auswertung der Immunzytochemie
- Frau Inge Fink für die sorgfältige Einarbeitung, Betreuung und Hilfsbereitschaft im Isotopenlabor.
- Frau Elke Maier, Anatomisches Institut Universität Tübingen, für ihre Hilfe bei der immunhistochemie
- Frau Stephan und Frau Schuster der AG von Prof. Brossart, Abt. II, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen, für die Durchführung und Auswertung der FACS-Analyse
- Frau Dr. Tina Herberts, Institut für Medizinische Biometrie, für die statistische Beratung
- Zum Schluss noch meiner Familie, ohne ihre Unterstützung wäre ich nie soweit gekommen.

Lebenslauf

Name: Maren Hülber

Geburtsdatum: 01.02.1983

Geburtsort: Mainz

Eltern: Karl Hülber, Senior IT-Architect

Reinhild Hülber, Bürokauffrau

Geschwister: Miriam Hülber, Lehrerin GHS

Meike Hülber, Magistra artium in Amerikanistik, BWL und
Psychologie

Schulbildung:

1990-1994 Grundschule Gäufelden -Öschelbronn
1994-2002 Schickhardt-Gymnasium Herrenberg

Studium

2002-2003 Studium der Amerikanistik, Romanistik und Soziologie an
der Eberhard Karls Universität Tübingen

2003-2007 Studium der Zahnmedizin an der Eberhard Karls
Universität Tübingen
Naturwissenschaftliche Vorprüfung im September 2003
Zahnärztliche Vorprüfung im März 2005
Staatsexamen am 23.11.2007

seit 2008 Assistenz Zahnärztin bei Zahnarzt Dr. Peter Kiefner,
Stuttgart