

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

**Charakterisierung der Effekte verschiedener
differenzierungssteigernder Substanzen auf
Radioiodaufnahme, Thymidininkorporation, NIS- und Pendrin-
Expression und Apoptose in der cancerogenen
Schilddrüsenzelllinie FTC-238**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Sabrina Wegenast
aus
Heilbronn/Neckargartach
2010

Dekan:	Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter:	Professor Dr. R. Wahl
2. Berichterstatter:	Frau Professor Dr. E. Fröhlich

**Meinen Eltern und
meinem Bruder David gewidmet.**

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	-Abbildung
AP	-alkalische Phosphatase
APL	- Acute promyelocytic leukemia
APS	-Ammoniumpersulfat
ATO	-Arsentrioxid
Bq	-Becquerel, 1 Zerfall pro Sekunde
kBq	-Kilo-Becquel
CPM	-counts per minute
DPM	-desintegrations per minute
DMSO	-Dimethyl-Sulfoxid
DTC	-differentiated thyroid carcinoma
EGF	-epidermal growth factor
Excel	-Statistikprogramm von Microsoft
IGF I	-insulin-like growth factor
G	-Gravitation, Erdbeschleunigung
g	-Gramm, 10^{-3} Kilogramm
FKS	-fetales Kälberserum
FTC	- follicular thyroid carcinoma
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
UTC	-undifferentiated thyroid carcinoma
min	-Minuten
n	-Anzahl der Proben
NIS	-Natrium-Iodid-Symporter

P	-statistische Wahrscheinlichkeit
PBS	-phosphate buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PPAR γ	-Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
RAR α	-Retinoid acid receptor α
RXR α	-Retinoid X receptor α
S	-Sekunde
SD	-Standardabweichung
SDS	-sodium dodecylsulfate
SEM	-Standard Error of the mean, mittlerer Fehlerwert des Mittelwertes
Tab.	-Tabelle
TEMED	- Tetramethylethylendiamin
TSH	-Thyreoidea-stimulierendes Hormon, Thyreotropin
U	-Unit
UTC	-undifferentiated thyroid carcinoma
mU	-Milliunit, 10^{-3} Unit
Vit. A	-Vitamin A
Vol%	-Volumen-Prozent

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	9
2.	Material	15
	2.1 Untersuchungsmaterial.....	15
	2.2 Geräte für die Zellkulturen.....	15
	2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität.....	16
	2.4 Geräte für den Mycoplasmennachweis.....	16
	2.5 Geräte für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	16
	2.6 Geräte für die Facsanalyse.....	17
	2.7 Geräte für die immunzytochemische Bestimmung von Pendrin und NIS	17
	2.8 Medien und Reagenzien für die Zellkultivierung.....	17
	2.9 Reagenzien für die FACS-Analyse.....	18
	2.10 Reagenzien für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	18
	2.11 Antikörper, Marker und Reagenzien für den Western Blot.....	19
	2.12 Reagenzien für die immunzytochemische Bestimmung.....	20
3.	Methoden	22
	3.1 Zellzählung.....	22
	3.2 Herstellung der Kulturen und Kulturbedingungen.....	22
	3.3 Zellernte und Messung der Radioaktivität.....	24
	3.4 Mycoplasmennachweis.....	25
	3.5 Cytochemische Darstellung von NIS und Pendrin unter verschiedenen Differenzierungssubstanzen.....	26
	3.6. Immuncytochemische Auswertung von NIS und Pendrin in den cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 238.	27
	3.7 Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin mittels Westernblot.....	27
	3.7.1 Proteinisolierung und –bestimmung.....	27
	3.7.2 Westernblot.....	28
	3.7.3 Herstellung des Elektrophoresesegels (SDS Page).....	28

3.7.4	Probenvorbereitung und Gelelektrophorese.....	30
3.7.5	Tank-Blotting.....	31
3.7.6	Ponceau S- Färbung.....	32
3.7.7	Immunreaktion.....	32
3.8	FACS-Analyse.....	33
3.9	Statistische Auswertung.....	34
3.9.1	Statistische Auswertung der Ergebnisse der ¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H- Thymidinaufnahme (Kapitel 4.2.1- 4.2.3)	34
3.9.2	Statistische Auswertung der Ergebnisse ¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H- Thymidinaufnahme (Kapitel 4.1.1-4.1.6).....	35
4.	Ergebnisse.....	36
4.1	¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H-Thymidinaufnahme.....	36
4.1.1	¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H-Thymidinaufnahme unter all-trans-Retinsäure, 9-cis -Retinsäure und 13-cis-Retinsäure.....	38
4.1.2	¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H-Thymidinaufnahme unter all-trans-Retinol und 13-cis-Retinol.....	39
4.1.3	¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H-Thymidinaufnahme unter 5-Aza-deoxycytidin und Mevinolin.....	42
4.1.4	¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H-Thymidinaufnahme unter Valproinsäure, Troglitazon, Apicidin und APHA Compound 8.....	45
4.1.5	¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H-Thymidinaufnahme unter Akt-Inhibitor V mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid.....	48
4.1.6	¹²⁵ I-Iodidaufnahme und ³ H-Thymidinaufnahme unter Akt-Inhibitor I mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid.....	51
4.2	a) Beeinflussung der Apoptoserate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene Differenzierungssubstanzen und	
	b) Immunzytochemischer Nachweis von NIS und Pendrin.....	54
4.2.1	Einfluss von all-trans Retinol, 13-cis-Retinol, all-trans-Retinsäure, 9-cis Retinsäure und 13-cis-Retinsäure auf:	
	a) die Apoptose und	

b) die NIS- und Pendrin Expression in humanen Thyreozyten.....	54
4.2.2. Einfluss von Apicidin, Valproinsäure, Troglitazon, 5-Aza- deoxycytidin und Mevinolin auf:	
a) die Apoptose und	
b) die NIS- und Pendrin Expression in humanen Thyreozyten....	59
4.2.3 Einfluss von Akt-Inhibitor I und V mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid und APHA Compound 8 auf:	
a) die Apoptose und	
b) die NIS- und Pendrin Expression in humanen Thyreozyten.....	65
4.3. Nachweis von NIS-Symporter und Pendrin-Transporter mittels Westernblot.....	70
5. Diskussion.....	72
6. Zusammenfassung.....	87
7. Literatur.....	90
8. Anhang.....	105
Danksagung.....	160
Lebenslauf.....	161

1. Einleitung und Fragestellung

Das Schilddrüsenkarzinom ist der häufigste maligne endokrine Tumor, jedoch mit einem Anteil von ca. 1 % aller bösartigen Tumoren insgesamt eher selten. In Deutschland erkranken pro Jahr etwa drei Personen auf 100000 Einwohner an einem Schilddrüsenkarzinom. Bei den Schilddrüsenkarzinomen unterscheidet man einerseits die von den Thyreozyten abgeleiteten differenzierten bzw. undifferenzierten Karzinome und andererseits die von den parafollikulären C-Zellen abgeleiteten medullären Schilddrüsenkarzinome (MTC). Die von den epithelialen Zellen der Schilddrüse abgeleiteten differenzierten Karzinome werden unterteilt in follikuläre (FTC) und papilläre Karzinome (PTC), sowie in undifferenzierte, anaplastische Karzinomen (UTC). Ein einheitliches Konzept der Schilddrüsenkarzinogenese ist bis jetzt nicht etabliert. PTC metastasieren vorzugsweise lymphogen, FTC hämatogen und UTC lokal invasiv und hämatogen. Aus diesem unterschiedlichen Metastasierungsverhalten kann geschlussfolgert werden, dass wahrscheinlich auch unterschiedliche Mechanismen wie Mutationen, Deletionen, Methylierungsstatus, Änderungen der Gen- bzw. Proteinexpression, die zu den genannten Tumorentitäten führen, vorliegen.

Die Therapie von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (DTC) besteht primär aus drei therapeutischen Schritten:

1. Der operativen Entfernung des vom Tumor befallenen Schilddrüsengewebes und der von Tumorzellen befallener Lymphknoten.
2. Der Radioiodtherapie nach Thyreoidektomie , um Zellen im Schilddrüsenbett und Iod-speichernde Metastasen zu erreichen. Die besten Erfolge lassen sich bei Lymphknoten- und Lungenmetastasen erzielen, während Knochenmetastasen trotz teilweiser hoher Iodaufnahme in den meisten Fällen nicht gänzlich zerstört, sondern lediglich in ihrer Aktivität reduziert werden (Schicha und Scheithauer, 1996).
3. Der TSH Suppression. Ziel dieser Behandlung ist, die postoperative Unterfunktion zu beheben, aber gleichzeitig die TSH-Ausschüttung aus der Hypophyse zu unterdrücken.

Im Laufe des Tumorwachstums verlieren ein Drittel der Tumorzellen der DTCs ihre morphologischen und funktionellen Eigenschaften. Dies äußert sich in der histologischen Untersuchung und der eingeschränkten Fähigkeit der Zellen Iod aufzunehmen und zu speichern (Klutmann et al, 2001). Klinisch wird ein aggressiveres Wachstum und eine vermehrte Metastasenbildung beobachtet.

Der Transport von Iodid in Thyreozyten erfolgt entgegen des elektrochemischen Gradienten für Iodid. Der aktive Transportmechanismus, welcher an der basolateralen Membran der Thyreozyten lokalisiert ist, wird durch den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) vermittelt (Carrasco, 1993). Dabei wird ein Iodid-Ion (I^-) zusammen mit zwei Natrium-Ionen (Na^+) ins Zellinnere transportiert, wobei der transmembrane Natriumgradient als die treibende Kraft zur Iodidaufnahme fungiert (Eskandari, 1997). Die Energie, die zum einen für den Transfer und zum anderen zum Aufbau des Gradienten benötigt wird, stammt aus einer Quabain-sensitiven Na^+/K^+ -ATPase.

Um die Erfolgchancen der Radioiodtherapie zu verbessern, werden Substanzen eingesetzt, welche die Redifferenzierung der Tumorzellen und damit einen erhöhten Radioiodid- Uptake bewirken sollen. In einer Studie von 2002 zur Untersuchung der Redifferenzierungstherapie in fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinomen konnte der Effekt von 13-cis-Retinsäure auf Thyreozyten nachgewiesen werden (Simon et al, 2002). 50 Patienten, welche an einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom erkrankt waren und bei denen die Radioiodtherapie aufgrund einer Entdifferenzierung des Gewebes und der damit eingeschränkten Iodaufnahme gescheitert ist, wurden untersucht. Bei 21 Patienten (42%) konnte unter 13-cis-Retinsäure eine Redifferenzierung und eine Erhöhung der Iodaufnahme festgestellt werden.

Eine Substanz, die in der Leukämiebehandlung an Bedeutung gewonnen hat, ist Arsentrioxid (ATO). Trotz bzw. wegen ihrer toxischen Wirkung werden Arsenverbindungen seit über 2400 Jahren zur Therapie unterschiedlichster Erkrankungen genutzt (Klaassen et al., 1996) Heute findet ATO seine

Anwendung in der Behandlung der rezidierten und refraktären akuten Promyelozytenleukämie (APL). Es besitzt Effekte auf den programmierten Zelltod (Apoptose) und die Dedifferenzierung, Proliferation der Tumorzellen und einen antiangiogenen Effekt (Jr Miller et al., 2002). Die ersten Berichte über Therapieerfolge der APL mit Arsentrioxid stammen aus China (Zhang P et al., 2000).

Phosphoryliertes Akt sorgt für ein Überleben der Zellen und verhindert den Zelltod durch Apoptose. Eine gesteigerte Aktivierung von Akt (Alternativbezeichnung: Proteinkinase B) wurde beim Cowden-Syndrom, einer autosomal-dominant vererbten Krankheit festgestellt. Menschen mit diesem Syndrom erkranken häufig an follikulären Schilddrüsenkarzinomen. In einer Studie von 2001 konnte die gesteigerte Aktivierung von Akt in einer Zelllinie eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms nachgewiesen werden (Ringel et al., 2001). Aus den Ergebnissen dieser Studie ergibt sich die Frage, welchen Einfluss Akt-Inhibitoren in Schilddrüsenkarzinomen besitzen könnten. Arsentrioxid führt zu einer Hemmung von Akt. Aus diesem Grunde ist es interessant zu wissen, ob sich Arsentrioxid und andere Akt-Inhibitoren in ihrer Wirkung verstärken.

Troglitazon ist ein Wirkstoff, der gezielt zur Behandlung des Typ 2-Diabetes eingesetzt wurde. Troglitazon gehört zur Substanzgruppe der Thiazolidindione. Diese Substanzgruppe besitzt die Fähigkeit die Insulinempfindlichkeit durch Aktivierung von PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma) auszulösen (Verspohl et al. 2001). PPAR γ wird der Familie der nukleären Hormonrezeptoren zugeordnet. Es stellte sich jedoch heraus, dass diese Substanzgruppe ein über die Diabetesbehandlung hinausgehendes, breiteres Wirkungsspektrum besitzt und auch bei Krankheiten wie Hypertonie (Kurz und Gardner, 1998), Atherosklerose (Nagy et al., 1998; Chawla et al., 2001), Asthma (Becker et al., 2006; Roth und Black 2006) oder Karzinomen (Kato et al., 2004; Varley et al., 2004) ihre Anwendung findet. Je nach Zellart und Höhe der Konzentration verursachen Thiazolidindione eine Hemmung der Zellproliferation, eine Re-Differenzierung, Verlängerung der Lebenszeit einer

Zelle (Wang et al., 2002) aber auch Apoptose (Shiau et al., 2005; Pandhare et al., 2006), meist über ein Zusammenspiel von PPAR- γ - abhängigen und - unabhängigen Mechanismen. So scheint eine Hemmung der Proliferation unter anderem durch Suppression der Caseinkinase-2 zu erfolgen (Lee et al., 2006). Ein PPAR- γ - unabhängiger antiproliferativer Effekt von Troglitazon wurde hingegen in Tumorzellen der Schilddrüse gefunden, der mit einer Einleitung der Re-Differenzierung einhergeht (Fröhlich et al., 2005).

Mevinolin, ein Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase-Inhibitor, induziert nach Untersuchungen von Di Matola et al. (2001) Apoptose in der Schilddrüsenkarzinomzelllinie TAD-2 und in normalen Schilddrüsenzellen in Kultur. Die Kombination von Mevinolin mit anderen tumorwachstumshemmenden Medikamenten ermöglicht nach Di Matola et al. (2001) die Chemotherapie von Tumoren und könnte sich auch zur Behandlung von Schilddrüsentumoren eignen.

5-Aza-2'-deoxycytidin gehört zur Substanzgruppe der DNA-Methyltransferase-Hemmer. Wenn DNA abweichend methyliert wird, wie zum Beispiel bei Hypermethylierung von Tumor-unterdrückenden Genen, können diese Gene stillgelegt werden. Dies geht oft mit der Entstehung von menschlichem Krebs einher. 1964 wurde 5-Aza-2'-deoxycytidin erstmals mit dem Ziel einer neuen Behandlungsoption für die AML (Akute Myeloblastenleukämie) synthetisiert (Sorm et al. 1964; Cihak 1974). Die Beobachtung, dass 5-Aza-2'-deoxycytidin die DNA-Methylierung inhibiert und zelluläre Differenzierung induziert, weckten das Interesse und bildeten die grundlegende Rationale zum klinischen Einsatz als antileukämische Substanz (Jones and Taylor, 1980).

Valproinsäure, ein Histon-Deacetylase Hemmer, wird seit den 60er Jahren als Antiepileptikum und zur Behandlung neurologischer Erkrankungen therapeutisch eingesetzt. 1996 erkannten Cinatl et al. die antitumorale Wirkung therapeutischer Valproinsäure-Konzentrationen gegenüber Neuroblastomzellen (Cinatl J. Jr. et al., 1996 und 1997) In der Zwischenzeit wird Valproinsäure weltweit sowohl experimentell als auch klinisch zur Behandlung

unterschiedlicher Krebserkrankungen untersucht. Aktuelle experimentelle Befunde aus Cinatls Arbeitsgruppe zeigen, dass Valproinsäure die Angiogenese, d.h. die Bildung neuer Blutgefäße (Michaelis M. et al., 2004) hemmt. Der Befund, dass Valproinsäure die Gefäßbildung hemmt, zeigt einen neuen, bisher unentdeckten potentiellen antitumoralen Wirkmechanismus dieser Substanz auf, da Tumoren für ihr Wachstum auf die Ausbildung eines versorgenden Blutgefäßsystems angewiesen sind. Darüber hinaus zeigen Untersuchungen am Mausmodell, dass die Kombination von Valproinsäure mit Interferon- α bei einem Drittel der Tiere zur Heilung von humanen Neuroblastom-Tumoren führt (Michaelis M. et al., 2004). Hemmstoffe der Histon-Deacetylase (HDAC) sind neue potentielle Wirkstoffe für die Prophylaxe und Therapie von Krebserkrankungen. Zu der Substanzgruppe der HDACs gehören u.a. Apicidin und APHA Compound 8. Eine Hemmung der Histon-Deacetylase und damit eine Hyperacetylierung der Histone, führt zur Induktion von Zelldifferenzierung und/oder programmiertem Zelltod (Apoptose) in Krebszellen. Weiterhin wurden durch neuere Ergebnisse Histon-Acetyltransferasen und Deacetylasen als wichtige Elemente in der Genregulation identifiziert. Dabei ist mehrfach der Zusammenhang zwischen fehlregulierter Histon-Acetylierung und Krebserkrankungen belegt worden (Jung, 2004).

Apoptotische Prozesse sind von umfassender biologischer Signifikanz und spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Differenzierung, Proliferation/Homöostase, Regulation und Funktion des Immunsystems. In den vergangenen Jahren wurde immer mehr deutlich, dass die Tumorgenese nicht nur ein Resultat von exzessiver Proliferation aufgrund der Aktivität von Onkogenen ist, sondern im gleichen Maße auch von der oftmals gleichzeitig auftretenden Beeinträchtigung von Kontrollpunkten im Immunsystem, welche die Apoptoseprogramme überwachen, abhängig ist (Hanahan, 2000; Wang 1999). Eine Fehlfunktion im Ablauf des apoptotischen Programms kann zur Entstehung von Krebs, Autoimmunerkrankungen und zur Ausbreitung von viralen Infektionen führen. Eine exzessive Apoptose kann die Entstehung von

neurodegenerativen Krankheiten (z.B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson), AIDS und ischämische Erkrankungen beschleunigen oder gar beeinflussen (Fadeel et al., 1999).

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von ausgewählten Substanzen auf das Proliferationsverhalten und den Stoffwechsel von transformierten Thyreozyten zu untersuchen. Zur Verfügung standen dabei transformierte Thyreozyten der Zelllinie FTC-238. Folgende Substanzen wurden ausgewählt:

- Retinoide: all-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure, all-trans-Retinol, 13-cis-Retinol
- DNA-Methyltransferase-Hemmer: 5-Aza-2'-deoxycytidin
- Proteinkinase B-Hemmstoffe: Akt Inhibitor I und Akt Inhibitor V mit und ohne simultane Stimulation von Arsentrioxid
- Histon-Deacetylase-Hemmer: Apicidin, APHA Compound 8, Valproinsäure
- Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase-Inhibitor: Mevinolin
- Thiazolidindione: Troglitazon
- Arsentrioxid

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss haben diese Substanzen auf die ^{125}I -Iodidaufnahme und die ^3H -Thymidinaufnahmerate in Zellen der Zelllinie FTC-238?
- Haben diese Substanzen einen Effekt auf die Apoptose dieser Zellen?
- Welchen Einfluss haben diese Stimulanzen auf die Proteinexpression des
 1. Natrium-Iodid-Symporters und des
 2. Pendrins

2 . Material

2.1 Untersuchungsmaterial

- Humane cancerogene Zellen der Zelllinie FTC-238 (ECACC No: 94060901)

2.2 Geräte für die Zellkulturen

- Sterile Werkbank, Heraeus
- Bunsenbrenner Vulcan (Heraeus)
- Stabpipetten steril: 50 ml, 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml; (Falcon)
- Brutschränke:
 - HERAcell, Heraeus
 - HERAcell 240, Heraeus
- Zellkulturflaschen:
 - 162 cm²-Fläche, (Costar 3150)
 - 50 cm²-Fläche, (Falcon, Becton Dickinson)
- Zentrifugenröhrchen (50 ml), (Falcon Blue Max, Becton Dickinson)
- Zentrifuge Hettich Rotixa/RP, (Hettich, Tuttlingen)
- Lichtmikroskop Olympus, IX 51
- Zellzählgerät: Schärfe System Casy® Model TTC
- Kulturgefäße: Cell Culture Cluster:
 - 96 wells (Costar 3596)
 - 48 wells (Costar 3548)
- Zellernte:
 - Filtermat 11731, 102 x 256 mm, Skatron Instruments, Lier, Norway
 - 48-well cell harvester, Inotech ICH 280, Inotech, Dottikon, Switzerland
 - Printed Filtermat 1450-421, Glass Fibre Filter, 90 x 120 mm, Wallac, Turku Oy, Finland
 - Sample Bag 1450-432, 90 x 120 mm, Perkin Elmer

- 96-well cell harvester , Skatron Instruments, Lier, Norway

2.3 Geräte zur Messung der Radioaktivität

- Gamma-Strahlenmessung:
 - WIZARD™ 3“ 1480, Automatic Gamma Counter, Wallac
- Beta-Strahlen-Messung:
 - 1450 Microbeta (liquid scintillation & luminescence counter, TRILUX, Wallac

2.4. Geräte für den Mycoplasmennachweis

- MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit, CAMBREX
- Luminometer, Mithras LB 940, Berthold Technologies

2.5 Geräte für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- Zentrifuge Hettich Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen
- Biofuge primo R, Heraeus
- High speed Centrifuge, Avanti™ Centrifuge J-20XP, Rotor JS-5.3, Beckman
- Spectrophotometer, Ultrospec 2100 pro (UV-visible Spectrometer), Amersham Biosciences
- Heizblockthermomixer comfort 1,5 ml, Eppendorf
- Waage (Sartorius EA3DCE-LOCE)
- Waage (Sartorius CP225D-OCE)
- Küvetten (10 x 4 x 45) No./Ref 67.742 (Sarstedt)
- PVDF (polyvinylidene fluoride) Membran, Immobilon-P-Transfer, Cat.: IPVH 00010, Poresize: 0,45 µm, Millipore
- The Joey Gel Caster, Modell JG C-4, JG C-2, JG C-3, owl
- Electrophoresis-Power-Supply, E835, Consort
- P8DS Emperor Penguin, Vertical Electrophoresis System, owl
- VEP-2 Bandit, Mini Tank Electroblothing System, owl

- Kamera: Fujifilm/Raytest, Intelligent Dark Box, LAS 3000
Aufnahmeprogramm: Image Reader LAS 3000 Auswertungssoftware: AIDA Image Analyzer; V.3.44
- Aufnahmeprogramm: Image Reader LAS 3000
- Auswertesoftware: AIDA Image Analyzer; V.3.44

2.6 Geräte für die Facs-Analyse

- Zentrifuge Hettich Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen, Germany
- FACS-Gerät: Modell "Calibur", Becton Dickinson
- Facsröhrchen, Becton Dickinson

2.7 Geräte für die immunzytochemische Bestimmung von Pendrin und NIS

- Objektträger: Super Frost Plus Objektträger, Artikel:03-0060, (R. Langenbrink)
- Deckgläschen, Kat.Nr.: 190002440, 24 x 40 mm
- Zentrifugenröhrchen (50 ml), (Falcon Blue Max, Becton Dickinson)
- Gewebekulturflaschen, 75 cm²-Fläche, (Greiner, Nürtingen)
- Gewebekulturflaschen, 75 cm²-Fläche, (Costar 3376)
- Zellzählgerät: Schärfe System Casy®, Model TTC

2.8 Medien und Reagenzien für die Zellkultivierung

- Kulturmedium DMEM/NUT.MIX.F-12 with Glutamax-1, Ref. 31331-028, (GIBCO)
- Trypsin-EDTA (10 x), Cat: 15400-054, Invitrogen Corporation
- FETAL BOVINE SERUM, Cat: F 7524 (SIGMA)
- PBS, No. 0019, (CAMBREX)
- Szintillationsflüssigkeit, Betaplate Scint, PerkinElmer
- Radioaktive Chemikalien: [6-³H]Thymidine (851 GBq/mmol), TRK61, Amersham Biosciences
¹²⁵I: (3,8 GBq/ml), IMS.30, Amersham Pharma Biosciences
- Casyton, isotone Kochsalzlösung, Schärfe Systeme

- DMSO (Dimethylsulfoxid), D8410, (SIGMA)
- Ethanol, 1.00983.1000, (Merck)
- Methanol, 1.06009.2511, (Merck)
- Arsen(III)-trioxid (arsenige Säure), Merck.
- Apicidin, A8851, (SIGMA)
- APHA Compound 8, A2478, (SIGMA)
- Mevinolin, M2147, (SIGMA)
- 5-Aza-2'-deoxycytidin, 11390, (Fluka)
- Akt Inhibitor I, 124005, (Calbiochem)
- Akt Inhibitor V, Triciribine, 124012, (Calbiochem)
- Retinol, R7632, (SIGMA)
- 13-cis-Retinol, R 0271 (SIGMA)
- all-trans-Retinsäure, R2625, (SIGMA)
- 9-cis-Retinsäure, R4643 (SIGMA)
- 13-cis-Retinsäure, R3255, (SIGMA)
- Troglitazon (Calbiochem)
- Valproinsäure, P4543, (SIGMA)

2.9 Reagenzien für die FACS-Analyse

- Propidiumiodid, Sigma
- Staurosporine, 1055682, Roche Diagnostics

2.10 Reagenzien für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

- BioRad Bradford Reagenz (BioRad Protein Assay 450 ml Nr. 5000006)
- Acrylamid-Bis 40 %, 10681, SERVA
- SDS 10 %, 43601, Roth
- TEMED, T9281, SIGMA
- APS (Ammoniumpersulfat) 10 %, A-3678; Sigma
- Tris, 4885, Roth
- Salzsäure 32 %, 1.00319.100, Merck
- Propanol, 1.09634.2511, Merck

- Glycerin, 1.04091, Merck
- 2-Mercaptoethanol, Sigma
- Bromphenolblau, 8122.0005, Merck
- Glycin, 3908.2, Roth
- Glycerin, 1.04091.1000, Merck
- Ponceaurot S, 33429, Serva
- Trismabase, T1503, (SIGMA)
- 5 % Magermilchpulver, T145.2, Roth
- Tris-buffered saline (TBS), (20 mM Tris, 0,9 % NaCl, pH 8,0)
- Blotpuffer 1,2 l (3,636 g 25 mM Trismabase + 17,28 g 192 mM Glycin + 240 ml 20 % Methanol auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt)
- Essigsäure 100 %, 8.18755.1000, Merck
- Sammelgelpuffer, 4-fach, (0,5 M Tris/HCl, pH 6,8) (100 ml)
- Trenngelpuffer, 4-fach, (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8), (100 ml)
- Probenpuffer, 2-fach, (62,5 mM Tris-HCl [pH 6,8], 4% SDS (Sodium dodecyl sulphate), 10% Glycerol, 10% Dithiothreitol , 0,01% Bromphenolblau)
- Laufpuffer 10-fach (30 g Tris + 144 g Glycin + 10 g SDS 10 % auf 1000 ml mit H₂O aufgefüllt)
- Trenngel (3,13 ml 40 % Acrylamid-Bis + 2,5 ml Trenngelpuffer 4-fach + 4,27 ml Aqua dest. + 100 µl 10 % SDS + 15 µl TEMED + 30 µl 10 % APS)
- Sammelgel 5 % (1,25 ml 40 % Acrylamid-Bis + 2,5 ml Sammelgelpuffer 4-fach + 6,15 ml Aqua dest. + 100 µl SDS 10 % + 15 µl TEMED + 30 µl 10 % APS.

2.11 Antikörper, Marker und Reagenzien für den Western Blot

- High Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, (Amersham Biosciences 17061501)
- Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis, (Amersham Biosciences 17044601)
- Anti-Thyreoglobulin (TG), Novus Biologicals, Littelton, USA

- NIS 1-Antikörper, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. B. Czarnocka, Dep. Biochemie und Molekularbiologie, Universität Warschau. Der NIS 1-Antikörper ist gerichtet gegen die Aminosäure-Sequenz 262-280. Eingesetzte Verdünnung: 1:1000.
- Pendrin-Antikörper, zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. B. Czarnocka, Dep. Biochemie und Molekularbiologie, Universität Warschau. Eingesetzte Verdünnung: 1:1000
- 2. Antikörper: Goat; anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz biotechnology sc-2004. Eingesetzte Verdünnung: 1:5000
- Luminol, Cat.: 12,307-2, Aldrich
- p-Jodphenol, Cat.: 1.020-1, Aldrich
- Wasserstoffperoxid 30 %, AppliChem A 2473,0500
- ECL-Lösung bestehend aus Lösung A und Lösung B. Lösung A (0,5 M Luminol + 0,5 M p-Jodphenol + 0,1 M Tris/HCl pH 9,35), Lösung B (30 % H₂O₂ im Verhältnis 1:4000 in 0,1 M Tris/HCl pH 9,35)
- Tween 20, No.: 37470, Serva
- TBS/Tween (1000 ml TBS (1x) + 1ml Tween 20)

2.12 Reagenzien für die immunzytochemische Bestimmung

- Gummi Arabicum, 4282, (Merck)
- Holt'sches Gemisch (30 g D(+)-Saccharose +1 g Gummi Arabicum + 1000 ml Wasser)
- NaCl, 1.06404, (Merck)
- Na₂HPO₄, 1.06580, (Merck)
- KH₂PO₄, 4873, (Merck)
- Paraformaldehyd, 4005, (Merck)
- PBS, No. 0019, (CAMBREX)
- Cytomation Pen, S2002, (DAKO)
- Antikörper (Pendrin, NIS); siehe 2.10
- Goat anti rabbit IgG biotinyliert-SP-conjugiert, Kat.Nr.:111-065—003, (Dianova)

- Streptavidin-Alkalische Phosphatase (AP-)-Konjugat, Kat.Nr.: 0396, (DAKO)
- Substratlösung für AP: 4 mg Naphtol-As-MX-Phosphat (N5000, SIGMA) + 100 µl DMFA (1.03053.00, Merck) + 4,9 ml 0,1 M Trispuffer + 1,5 mg 1 M Levamisole (Kat.Nr.:L9756-5, SIGMA) + 5 mg Fast red TR salt (F2768, SIGMA)
- Kaisers Glyceringelatine, 1.09242.0100, (Merck)

3. Methoden

3.1 Zellzählung

Das CASY®1 Cell Counter and Analyser System (Fa. Schärfe System, Reutlingen, Deutschland) verbindet die Partikelmesstechnik nach dem Widerstandsmessprinzip mit der Pulsflächenanalyse. Für die Messung wurden 10 µl hochkonzentrierte Zelllösung in 10 ml Casyton® verdünnt und durch eine spannungsbelegte Messkapillare gesaugt. Durch das Durchtreten intakter Zellen durch eine Präzisionsmesspore wird der Widerstand der Kapillare erhöht. Durch die Widerstandserhöhung lassen sich Rückschlüsse auf das Zellvolumen ziehen. Das Zellgerät erlaubt, auf die Anzahl toter und lebender Zellen rückzuschließen.

3.2 Herstellung der Kulturen und Kulturbedingungen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen fanden in einer Reinraumbank mit vertikaler Luftströmung statt. Es wurde auf steriles Arbeiten geachtet, was Hände- und Arbeitsplatzdesinfektion mit 70% Ethanol bei jedem Arbeitsgang und das Verwenden von sterilen oder desinfizierten Materialien mit einschließt.

Für die eigenen Untersuchungen wurde die bereits in Kultur befindliche menschliche, maligne Thyreozyten Zelllinie FTC-238 verwendet. Diese Zelllinie wurde im Zellkulturmedium DMEM/NUT.MIX.F-12 (GIBCO) mit Zugabe von 5% FKS (fetales Kälberserum) kultiviert. Durch den Zusatz von Kälberserum erhielten die Zellen zusätzlich wichtige Stoffe, wie z.B. Hormone und Wachstumsfaktoren. Vor Gebrauch wurde das FKS bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert. Antibiotika wurden dem Medium nicht zugefügt. Für die eigenen Versuche wurden 8×10^6 Zellen mit 50 ml Medium zur Anzucht in eine Zellkulturflasche mit 162 cm² Bodenfläche (Costar) ausgesät. Die Kulturen wurden unter Lichtabschluss in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C mit 95 % Luft und 5 % CO₂ begast. Alle 2 bis 3 Tage wurde das Kulturmedium gewechselt. Die ausgesäten Zellen adhären am Zellgefäßboden und vermehren sich bei 37 °C. Sobald der Gefäßboden von einer Monolayer-Schicht vollständig bedeckt war, wurden die anhaftenden Zellen abgelöst.

Die Herstellung eines Versuchansatzes verlief wie folgt unter sterilen Bedingungen:

1. Verwendung von Kulturgefäßen, in denen Thyreozyten adhärent am Gefäßboden wachsen.
2. Dekantieren des überstehenden Mediums.
3. Spülen der Flasche mit 10 ml vorgewärmter PBS-Lösung.
4. Dekantieren der PBS-Lösung.
5. Ablösen des gespülten Zellrasens durch Zugabe von 2 ml 10 %iger Trypsinlösung mit einer Inkubationszeit im Brutschrank von 5 min bei 37°C.
6. Inaktivierung des Trypsins durch Zugabe von 10 ml FKS-haltiges Medium.
7. Abpipettieren der sich in Suspension befindlichen Zellen in ein 50 ml Falcon-Röhrchen
8. Zentrifugieren bei 4 °C, 120 x g, 7 min.
9. Dekantieren des Überstandes.
10. Resuspension der Zellen in 5 ml Kulturmedium.
11. Zellzählung im CASY®1 Cell Counter (Fa. Schärfe System, Reutlingen,D).
12. Verdünnung der Zellen für die Aussaat auf die jeweilige Endkonzentration.
13. Aussaat der Zellen auf Kulturplatten mit 96 wells (Costar) und 48 wells (Costar).

Während der Aussaat wurden die Zellen durch regelmäßiges Umrühren in Suspension gehalten. Jedes Loch der Platten stellt eine Kultur dar. Dabei wurde bei den Kulturplatten mit 48 wells mit einer Zelldichte von 0,133 Millionen Zellen pro 200 µl Suspension und den Kulturplatten mit 96 wells mit einer Zelldichte von 0,0665 Millionen Zellen pro 100 µl gearbeitet. Bleiben Zellen nach der Aussaat übrig, so werden diese wieder auf weitere Kulturflaschen verteilt und wie oben beschrieben weiter kultiviert. Dieser Vorgang nennt sich Passagierung.

Als Stimulanzen wurden in den jeweiligen Endkonzentrationen eingesetzt:

- all-trans-Retinol: 1,6 μM ; 3,2 μM ; 6,5 μM , 13 μM
- 13-cis-Retinol : 1,6 μM ; 3,2 μM ; 6,5 μM , 13 μM
- all-trans-Retinsäure : 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM
- 9-cis-Retinsäure: 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM
- 13-cis-Retinsäure: 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM

Retinol und die Retinsäurederivate wurden in abgedunkeltem Raum gehandhabt und in Methanol gelöst.

- Apicidin: 10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM, Lösungsmittel: DMSO
- APHA Compound 8: 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , Lösungsmittel: DMSO
- Mevinolin: 1 μM , 12,5 μM , 25 μM , 37 μM , 50 μM , 100 μM , Lösungsmittel: Ethanol
- 5-Aza-2'-deoxycytidin: 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , Lösungsmittel: DMSO
- Akt Inhibitor I: 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , Lösungsmittel: DMSO
- Akt Inhibitor V: 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , Lösungsmittel: DMSO
- Valproinsäure: 0,5 mM, 1 mM, 3 mM, Lösungsmittel DMSO
- Troglitazon: Lösungsmittel DMSO
- Arsen(III)-trioxid: 2 μM Lösungsmittel: Destilliertes Wasser

Direkt nach der Zugabe der Stimulanzen zu den Zellen erfolgte die Zugabe von ^{125}I -Iodid (4 kBq/200 μl Kultur) zu den 48 well-Platten und $6\text{-}^3\text{H}$ -Thymidin (12 kBq/100 μl Kultur).

3.3. Zellernte und Messung der Radioaktivität

a) ^{125}I -Iodid: Nach Ablauf der Inkubationszeit (6h, 18h, 24h, 30h, 42h, 48h) wurden die Zellen mittels eines Zellharvesters (Inotech AG) auf Glasfasermatten abgesaugt und diese anschließend mit H_2O gespült. Dieser mit Zellen beladene Filter wurde in Kunststoffaserröhrchen überführt und die Radioaktivitätsmessung von ^{125}I -Iodid im Gammacounter (Wallac) durchgeführt.

b) ³H-Thymidin: Zur Radioaktivitätsmessung wurden die Zellen nach Ablauf der Inkubationszeiten bei -20 °C eingefroren. Nach ca. 24 h wurden die Zellen wieder aufgetaut und mittels eines Zellharvesters (Inotech) abgesaugt und auf einer Filtermatte (90 x 120 mm) gesammelt. Im Zytoplasma der Zellen gelöstes ³H-Thymidin wird beim Wiederauftauen und Platzen der Zellen freigesetzt und beim Filtrieren über die Glasfasermatten entfernt. Jede Filtermatte wurde in eine Plastiktüte gleicher Größe gebracht und nach Zugabe von 4,5 ml Szintillationsflüssigkeit (Packard Bioscience) zugeschweißt. Die Radioaktivität der Filtermatte wurde mittels eines β -Counters (Microbeta-Trilux) gemessen.

3.4. Mycoplasmennachweis

Mycoplasmen können Zellkulturen kontaminieren. Sie können eine erniedrigte Zellproliferationsrate und veränderte Zellantworten hervorrufen. Mycoplasmen sind die kleinsten und einfachsten Prokaryonten; aufgrund ihrer begrenzten biosynthetischen Fähigkeiten sind sie wirtsabhängig. Mycoplasmen haben einen Durchmesser von 0,8 μm . Sie werden daher vom Filterpapier des Zellharvesters (Porengröße: 1,5 μm) nicht zurückgehalten. Bei der Messung des Thymidin-Uptakes werden sie nicht miterfasst. Die o. g. Effekte können aber trotzdem die Ergebnisse der Versuche verfälschen. Um eine mögliche Mycoplasmen-Kontamination auszuschließen, wurde der Mycoplasma Detection Assay "MycoAlert® Mycoplasma Detection Kit" der Firma CAMBREX eingesetzt. Bei diesem Test wird die Aktivität bestimmter mycoplastischer Enzyme ausgenutzt. Im Zuge dieses Assays lysieren die lebenden Mycoplasmen, ihre Enzyme werden frei und reagieren mit dem MycoAlert® Substrat, welches die Umwandlung von ADP in ATP bewirkt. Die ATP-Konzentration wird vor und nach Zugabe des MycoAlert® Substrats im Luminometer gemessen. Misst man bei der zweiten Messung eine höhere Konzentration an ATP als bei der ersten Messung, so korreliert diese ATP-Konzentration mit der Mycoplasmen-Konzentration in der Probe.

3.5 Cytochemische Darstellung von NIS und Pendrin unter verschiedenen Differenzierungssubstanzen

Hierfür wurden 10 ml Zellsuspension mit jeweils 20 Mio Zellen pro 75 cm²-Flasche ausgesät und die jeweilige zu untersuchende Substanz in konzentrierter Form zugegeben, so dass die gewünschte Endkonzentration im Medium erreicht wurde. Die Inkubationszeiten betragen 24 und 48 Stunden. Nach der Inkubation wurden die Zellen abtrypsiniert und in 10 ml Kulturmedium resuspendiert. Eine Bestimmung der Zellanzahl und Zellvitalität wurde, wie in Kapitel 3.1. beschrieben, durchgeführt. Die Zellzahl wurde dementsprechend auf 9 Millionen Zellen pro Milliliter im Kulturmedium eingestellt.

Die Vorbereitung der Objektträger für die cytochemische Darstellung von NIS, Pendrin und Thyreoglobulin, sowie die HE-Färbung, verlief für jede Substanz nach dem gleichen Schema. Pro Substanz wurden 5 Objektträger bereitgestellt:

1. 50 µl (entspricht $0,45 \times 10^6$ Zellen) der auf 9 Millionen Zellen pro Milliliter eingestellten Zellsuspension wurden auf einen Objektträger pipettiert und mit einem geschliffenen Deckglas auf dem Objektträger verteilt.
2. Trocknen der Objektträger für eine Stunde bei 37 °C im Trockenschrank.
3. Fixierung der Zellen mittels 10-minütiger Inkubation in 4 % Paraformaldehyd/PBS-Lösung.
4. 3 x Spülung der Objektträger in Aqua dest.
5. Inkubation der Objektträger für 10 min in Holt'schem Gemisch
6. Spülung der Objektträger in Aqua dest.
7. Objektträger wurden bei Raumtemperatur 2h zum Trocknen aufgestellt.
8. Die Objektträger konnten nun bei -20 °C gelagert werden.

Der Nachweis von NIS-3 und PDS-1 auf der Zelloberfläche erfolgte im Anatomischen Institut der Universität durch die Immuncytochemische Technik nach folgendem Prinzip:

- Bindung des Erstantikörpers (eingesetzte Verdünnungen: anti-NIS-3: 1:200, anti-PDS-1: 1:150; 160µl/Objektträger) an das Antigen.
- Lagerung der Objektträger in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C.
- Spülen der Objektträger mit PBS
- Inkubation der Objektträger für 60 min mit dem biotinylierten Zweitantikörper/Detektionsantikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Serum; Verdünnung 1:100 in PBS)
- Spülen der Objektträger mit PBS
- Zugabe von mit alkalischer Phosphatase markiertem Streptavidin (Verdünnung 1:200 in PBS), das mit Biotin einen festen Komplex bildet. Inkubationsdauer: 40 min bei Raumtemperatur
- Zugabe von Chromogen-Substratlösung. Durch das Aufbringen der Lösung wird der Komplex rot angefärbt. Inkubationszeit: 60 min bei Raumtemperatur

Die Präparate wurden mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckelt. Anschließend wurde der Objektträger waagrecht auf den Tisch gelegt. Nach 24 Stunden konnten die Zellen mikroskopiert werden.

3.6. Immunocytochemische Auswertung von NIS und Pendrin in den cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 238

Die Auswertung der immunzytochemischen Präparate erfolgte mikroskopisch im Anatomischen Institut der Universität Tübingen. Es wurde eine Einschätzung des Anteils positiv markierter Zellen im Vergleich zur Gesamtzahl der Zellen pro Objektträger vorgenommen. Die immunopositiven Zellen wurden gegen die Gesamtanzahl der Zellen pro Gesichtsfeld prozentual verrechnet.

3.7 Immunhistochemischer Nachweis von NIS und Pendrin mittels Westernblot

3.7.1 Proteinisolierung und –bestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde die Methode nach Bradford (1976) verwendet. Hierfür wurde der Bio-Rad Protein Assay eingesetzt. 20µl jeder

Probe wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und anschließend bei 480 nm in einem UV-Spektrometer vermessen. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration diente eine Eichkurve, die mit definierten Konzentrationen aus Rinderserumalbumin (BSA) hergestellt wurde. Es wurden nur Eichkurven verwendet, die einen Fehler (ermittelt durch Lineare Regression) von unter einem Prozent aufwiesen. Zur Gewinnung des Probenmaterials mussten kultivierte Thyreozyten, wie in Kapitel 3.2 beschrieben, abtrypsiniert, in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und abzentrifugiert (bei 4 °C, 120 x g, 7 min) werden. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 10 ml PBS resuspendiert. Dann wurde eine Zellzählung wie in Kapitel 3.1 beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (bei 4 °C, 120 x g, 7 min). Der Überstand wurde erneut dekantiert und das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Die Zellen wurden wieder abzentrifugiert (bei 4 °C, 16000 x g, 4 min) und der Überstand dekantiert. Das Reaktionsgefäß wurde nun über Kopf 2 - 3 Minuten zum Auslaufen auf ein Saugtuch gestellt und anschließend bei -80 °C tiefgefroren.

3.7.2 Westernblot

Beim Westernblot werden Proteine auf spezielle Membranen transferiert, um sie mit immunohistochemischen Methoden detektieren zu können (Towbin et al., 1979; Towbin et al., 1989). Dazu wird das Gesamtprotein der Zellen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Anschließend wurden die Proteine auf eine PVDF Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) transferiert und mit spezifischen Antikörpern detektiert.

3.7.3 Herstellung des Elektrophoresegels (SDS-Page)

SDS-PAGE steht für "**S**odium **D**odecyl **S**ulfate – **P**oly**A**crylamid **G**el **E**lectrophoresis". Die Gelelektrophorese wird zur Charakterisierung von Proteinen und zur Überprüfung von deren Reinheit eingesetzt. Die Proteine haben aufgrund ihrer unterschiedlichen elektrischen Ladungen (hervorgerufen durch die Ladungen der Aminosäuren) verschiedene Wanderungs-

geschwindigkeiten und -richtungen in elektrischen Feldern. Um Diffusionseffekte zu vermeiden, findet die Elektrophorese in einem Gel statt. In der Regel erfolgt die Auftrennung mittels zwei Gelen: einem Trenn- und einem Sammelgel. Das Sammelgel ist ein schwächer konzentriertes Gel und dient, wie der Name schon sagt, zum "Sammeln" der gesamten aufgetragenen Probe um allen Probemolekülen den selben "Startpunkt" für die Trennung zu ermöglichen. Das ist wichtig, damit Proteine mit gleichem Migrationsverhalten nach der Trennung im Trenngel als einzelne klare Bande erscheinen. Die SDS-Konzentration des Sammelgels betrug 5 %. Die Konzentrationen des Trenngels variierten je nach Molekulargewicht des Proteins:

Thyreoglobulin: 660.000 Dalton :10%

NIS: 80000-90000 Dalton:12,5%

Pendrin: 85000 Dalton:12,5%

Standardrezeptur für die Herstellung von Gelen für die SDS-PAGE(modifiziert nach Laemmli):

Komponenten	Trenngel 10%	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
Acrylamid-bis-Lösung 40%	2,50 ml	3,13 ml	1,25 ml
Trenngelpuffer 4x	2,50 ml	2,50 ml	---
Sammelgelpuffer 4x	---	---	2,50 ml
Dest. H ₂ O	4,90 ml	4,27 ml	6,15 ml
SDS 10 %	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml	0,015 ml
APS 10 %	0,03 ml	0,03 ml	0,03 ml

Tab.1: 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. APS und TEMED wurden jeweils zuletzt zugefügt, da sie als Starter der Polymerisation fungieren. Die Polymerisationszeit der Gele beträgt jeweils

ungefähr 15-30 min. Nach dem Giessen des Trenngels wird dieses mit 20 μl Ethanol übergossen, um einen geraden Abschluss des Geles zu erreichen. Danach wurde erst das Sammelgel hergestellt und dieses in die Gelgießkammer gefüllt. Durch einen Kamm wurden im Sammelgel die Probenaschen gebildet. Nach einer weiteren halben Stunde war das Sammelgel polymerisiert und der Kamm wurde entfernt.

3.7.4 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Pro Geltaschen wurde 30 μg Gesamtprotein jeder Probe aufgetragen. Zuvor musste daher zuerst die Gesamtmenge der Proteine bestimmt und dann auf 30 μg eingestellt werden. Die Proteinproben wurden dann im Verhältnis 1:1 (abhängig vom Volumen der auf 30 μg eingestellten Proben) mit einem Probenpuffer in einem Eppendorf-Gefäß gemischt. Der Probenpuffer wird üblicherweise zweifachkonzentriert hergestellt und enthält ein Reduktionsmittel für Disulfidbrücken. Er enthält Bromphenolblau, Triphenylmethanfarbstoff und dient als Farbstoffmarker bei der Gelelektrophorese von DNA und Proteinen. Der Probenpuffer sollte deutlich blau sein. Danach folgte das "Derivatisieren" der im Probenpuffer gelösten Proteine für 5 min bei 95°C im Heizblockthermomixer. Aus diesem Gemisch wurden dann 20 μl (max. Taschenvolumen) entnommen und in die Geltasche pipettiert.

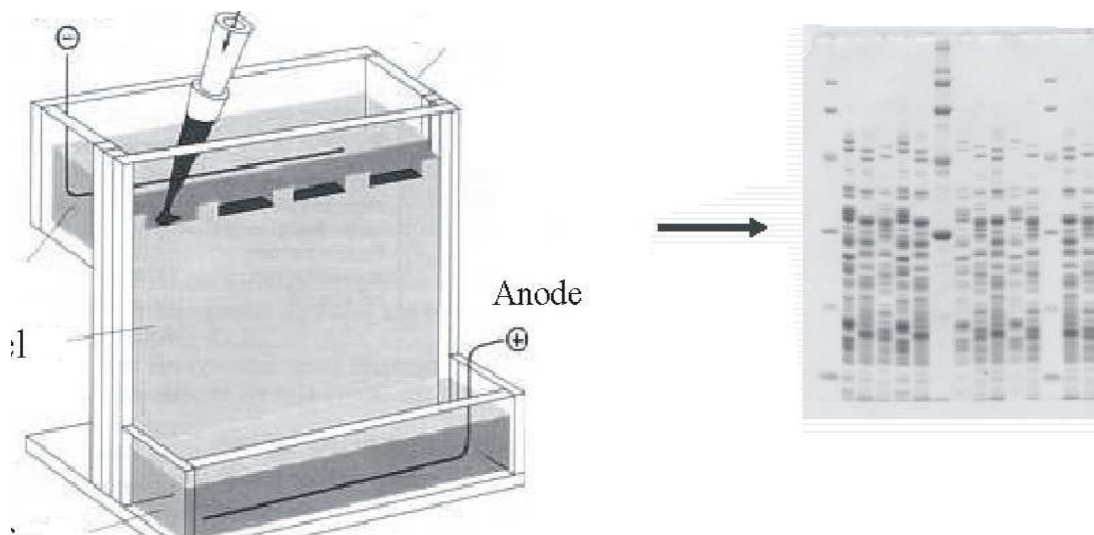


Abb 1: Schematische Darstellung einer Elektrophorese (links) und das resultierende Gel nach Färbung (rechts)

Elektrophoresekammer wurde mit Laufpuffer (50 mM TRIS, 384 mM Glycin, 0,1% SDS) befüllt. Der Laufpuffer soll während der Elektrophorese den pH-Wert konstant halten. Als Proteinstandard (Positivkontrolle) lief ein High Molecular Weight Marker (HMW, Electrophoresis Calibration Kit) mit. HMW wird für Gele benutzt, die einen Polyacrylamidgehalt von bis zu 12 % haben. 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. Die Elektrophorese lief im Sammelgel bei 120 V und im Trenngel bei 80 V. Die gesamte Dauer der Elektrophorese betrug ca. 3 Stunden. Der verwendete Proteinstandard enthält die Proteine Myosin, Alpha Makroglobulin, Beta Galactosidase, Transferrin, Glutamat Dehydrogenase. Myosin hat ein Molekulargewicht von 212000 Dalton und kommt dem Molekulargewicht von monomerem Thyreoglobulin (330000 Dalton) relativ nahe. Der Natrium-Iod-Symporter hat ein Molekulargewicht von 80000-90000 Dalton und Pendrin von 85000. Beide liegen damit dem Molekulargewicht von Transferin (76000 Dalton) sehr nahe.

3.7.5 Tank-Blotting

Um die in der Elektrophorese getrennten Proteine mit einem Antikörper nachzuweisen, mussten die Proteine zunächst aus dem Gel auf eine geeignete Matrix überführt werden. Als Träger wurde eine PVDF-Membran gewählt. Der Transfer erfolgt auf elektrophoretischem Weg auf die Membranoberfläche, mit der die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen interagieren. Bei diesem Vorgang wurde das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen, die Anordnung der Proteine im Gel blieb dabei erhalten. Daher konnten die Proteine teilweise renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wiedererlangen. Für den Transfer wurde ein sandwichartiger Aufbau, wie in Abbildung 2 dargestellt, verwendet.



Abb 2: Schichtaufbau für das Semidry-Blotting

Vor dem Aufbau wurden die Membranen in Methanol getränkt und die Blotkammer wurde mit einem Transferpuffer (20% Methanol, 25 mM TRIS, 192 mM Glycin) befüllt. Die Kassette konnte in den mit Blotpuffer gefüllten Blottank eingesetzt werden und an das Power-Supply angeschlossen werden. Geblotet wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur und einer Stromstärke von 80 mA.

3.7.6 Ponceau S- Färbung

Nach erfolgtem Blotting der Proteine erfolgte deren reversible Färbung mit Ponceau S. Somit lässt sich überprüfen, ob sowohl die Auftrennung als auch der Transfer der Proteine erfolgreich war. Dafür musste die Membran zuerst getrocknet werden. Danach wurde die Membran durch 100 % Methanol gezogen, in Wasser gespült und anschließend mit Ponceau S (0,5 %) für ca. 1 Minute angefärbt. Durch die wasserlösliche Eigenschaft von Ponceau S war eine ungehinderte Reaktion mit den Antikörpern nach Entfärben der Membran mittels Wasser möglich.

3.7.7 Immunreaktion

Die Membranen wurden dafür für ca. 3 Stunden in 5 % Lactalbumin präinkubiert. Bei diesem Vorgang werden die freien Bindungsstellen der Membranen gesättigt und für die Antikörper unzugänglich gemacht. Die Membran wurde für 3 x 5 Minuten in TBS/Tween gewaschen. Die Proteinbanden wurden anschließend durch die Zugabe von folgenden Antikörpern nachgewiesen: NIS-Antikörper und PDS-Antikörper. Prinzip des Proteinnachweises:

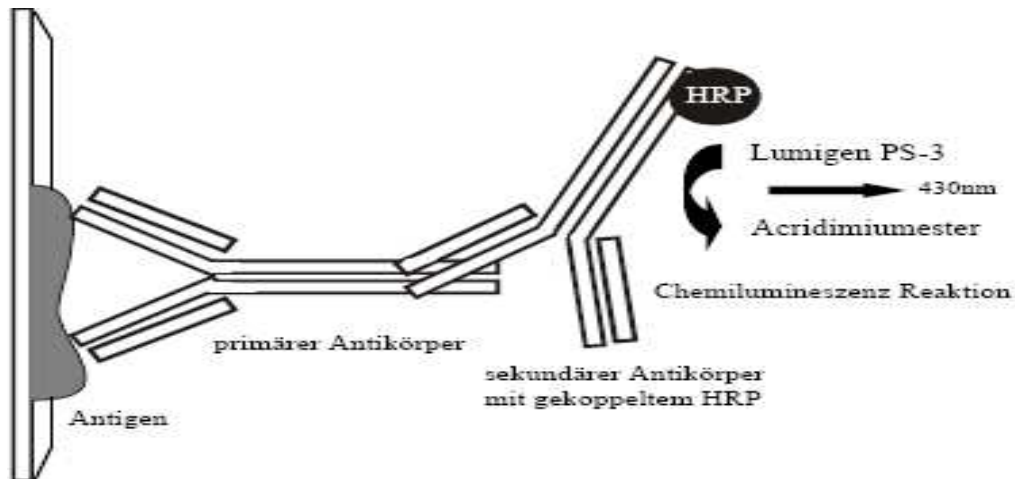


Abb. 3: Schematische Darstellung der Antikörperdetektion

- Bindung des Antikörpers an das Antigen
- Bindung eines HRP-konjugierten Antikörpers (Detektionsantikörper) an den Erstantikörper
- Inkubation in ECL-Lösung (siehe 2.11)

Die Membran wurde über Nacht bei 8 °C auf einem Schüttler mit dem Erstantikörper (eingesetzte Verdünnungen: 1:1000 in TBS) inkubiert. Danach folgte ein Waschgang für 3 x 15 Minuten in TBS/Tween. Dann wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem horseradish peroxidase (HRP)-konjugierten Zweitantikörper (eingesetzte Verdünnung: 1:2000 in TBS) inkubiert und anschließend folgte wieder ein Waschgang. Dann erfolgte die Inkubation in ECL-Lösung im Dunkeln. Nach einer ca. 3 – 5 minütigen Inkubationsdauer wurde das an spezifische Proteine gebundene Enzym sichtbar und damit die gesuchten Proteine identifiziert. Die dabei entstehende Lichtemission konnte mit dem Image Reader LAS-3000 (Fuji Photo Film) und dem Advanced Data Analyser Version 3.4. dokumentiert werden.

3.8 FACS-Analyse

Zellaufbereitung und Zellernte für die Apoptosemessung erfolgte mittels FACS-Analyse nach der Methode von Nicoletti et al. (1991).

Die humanen Thyreozyten der Zelllinie 238 wurden wie in Kapitel 3.2 beschrieben gezüchtet. Die Aussaat der Kulturen erfolgte in 96 well-Platten. Als Kontrolle dienten Staurosporin und H₂O₂. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen in den Kulturschalen zentrifugiert (7 min, 4°C, 300 g) und die Überstände dekantiert. Die Zellen wurden in 500 µl PBS-Puffer resuspendiert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden nochmals zentrifugiert (7 min, 4°C, 300 g), dekantiert und in PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit einem hypotonen Lysepuffer (50 µl/ml Propidiumiodid + 0,1% TritonX-100 + 0,1 % Na-Citrat in destilliertem Wasser gelöst) lysiert und die Zellkerne sofort mit der Durchflusszytometrie analysiert. Die Trägerflüssigkeit im FACS-Gerät, in welche die Probe in Form einer Suspension eingebracht wird, befindet sich in ständigem Fluss. Die Zellen oder die isolierten Zellkerne bewegen sich in einer definierten Position am Laserlicht vorbei; sind die Zellkerne Propidiumiodid positiv, so werden sie durch das Argon-Laserlicht (488 nm) angeregt. Das vom Propidiumiodid emittierte Fluoreszenzlicht kann durch verschiedene Photozellen detektiert werden. Zellkerne mit DNA-Fragmentierung (hypodiploider DNA), lassen auf apoptotische Zellen rückschließen und lassen sich gut von Zellkernen mit normalem (diploidem) DNA-Gehalt unterscheiden.

3.9 Statistische Auswertung

3.9.1 Statistische Auswertung der Ergebnisse der ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme (Kapitel 4.2.1-4.2.3):

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS für Windows, Version 17.0 (SPSS Inc., U.S.A.) durchgeführt. Die Darstellung der kontinuierlichen Variablen erfolgte als Mittelwerte, während als Streumaße die Standardabweichungen gewählt wurden. Die kontinuierlichen Variablen wurde mittels des Shapiro-Wilk-Tests hinsichtlich ihrer Normalverteilung überprüft. Während einige der getesteten Variablen keine Normalverteilung aufwiesen (Shapiro-Wilk-Test: $p < 0,05$), konnte für andere Variablen eine Normalverteilung berechnet werden (Shapiro-Wilk-Test: $p \geq 0,05$). Bei den Vergleichen der

Stichproben wurden daher Tests für normalverteilte Stichproben und nichtparametrische Tests für nicht normalverteilte Stichproben herangezogen. Beim Vergleich von 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben wurde der t-Test verwendet. Dabei wurde vorher zur Überprüfung der Homogenität der Varianzen der Levene-Test durchgeführt. Bei nachgewiesener Homogenität der Varianzen wurde der Student t-Test durchgeführt, während bei fehlender Gleichheit der Varianzen der Welch-Test als Modifikation des t-Tests durchgeführt wurde. Bei nicht normalverteilten Stichproben wurde der Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrisches Verfahren angewendet. Beim Vergleich von mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wurde der H-Test nach Kruskal und Wallis eingesetzt, während beim Vergleich von mehr als 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben die einfaktorielle ANOVA Anwendung fand. Zur weiteren Differenzierung, welche Parameter der ANOVA sich unterschieden, wurde bei signifikantem Ergebnis der ANOVA als post hoc Test der Bonferroni-Test sowie der LSD-Test mit multipler t-Testung durchgeführt. Bei allen durchgeführten Tests erfolgte eine zweiseitige Signifikanzüberprüfung, wobei für alle statistischen Tests ein p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant angenommen wurde.

3.9.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse der ^{125}I -Iodidaufnahme und ^3H -Thymidinaufnahme (Kapitel 4.1.1-4.1.6)

Da die Werte logarithmisch normalverteilt sind, wurden die Berechnungen mit den Logarithmen durchgeführt. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Die Einbauraten wurden nach logarithmischer Transformation mit einer Varianzanalyse mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkung beschrieben. Signifikante Ergebnisse sind in den Graphiken durch schwarze Sterne gekennzeichnet. Ein Stern resultiert für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz (Jod bzw. Thymidin).

Für die Durchführung der Statistik danke ich Herrn Prof. Dr. Dietz, Institut für medizinische Biometrie der Universität Tübingen.

4. Ergebnisse

4.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme

4.1.1 ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme unter All-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure

In diesem Versuchsansatz (Abb. 4 und 5) wurde den kultivierten menschlichen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 nachfolgende Substanzen bei der Aussaat zugefügt:

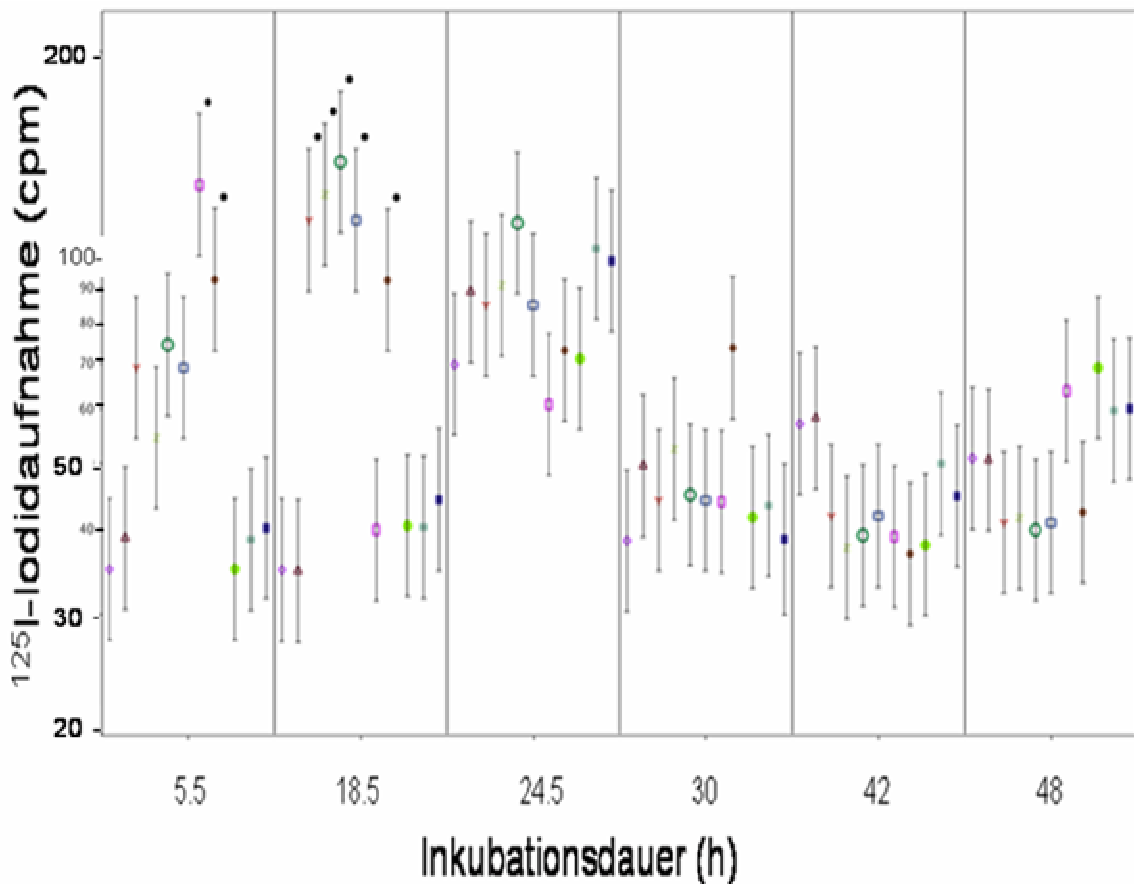
- All-trans-Retinsäure (0,5 µM, 1 µM, 2 µM)
- 9-cis-Retinsäure (0,5 µM, 1 µM, 2 µM)
- 13-cis-Retinsäure (0,5 µM, 1 µM, 2 µM)

Bei den Konzentrationen handelt es sich um die Endkonzentrationen der untersuchten Substanzen. Als Lösungsmittel für alle 3 Substanzen wurde Methanol verwendet. Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, die mit dem Lösungsmittel Methanol versetzt wurden. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 5.5, 18.5, 24.5, 30, 42 und 48 Stunden gemessen. Die Einbauraten wurden mit den Kontrollgruppen verglichen und mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkung beschrieben. Signifikante Unterschiede sind in Abb.4 und 5 mit einem Stern (*) markiert. Siehe hierzu auch Tab.3 und 4 im Anhang.

¹²⁵I-Iodidaufnahme: Nach 5.5 h und 18.5 h Inkubationszeit kam es bei 9-cis-Retinsäure in den Konzentrationen 1 µM und 2 µM zu einem signifikanten Anstieg der ¹²⁵I-Iodideinbaurate. Nach 18.5 h wurde ein signifikanter Anstieg ebenfalls bei 0,5 µM 9-cis-Retinsäure, sowie bei 13-cis-Retinsäure in allen drei getesteten Konzentrationen, verzeichnet. Erhöhte, allerdings nicht signifikante, Einbauraten wurden bei all-trans-Retinsäure in allen getesteten Konzentrationen nach 24.5 h gemessen. Tendenziell kam es nach 24.5 h bei allen 3 Substanzen zu einem Absinken der ¹²⁵I-Iodideinaufnahme, mit Ausnahme eines Anstieges bei 2 µM 9-cis-Retinsäure. Dieser Anstieg wurde

im Bonferroni-Holm Test allerdings als nicht signifikant gewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

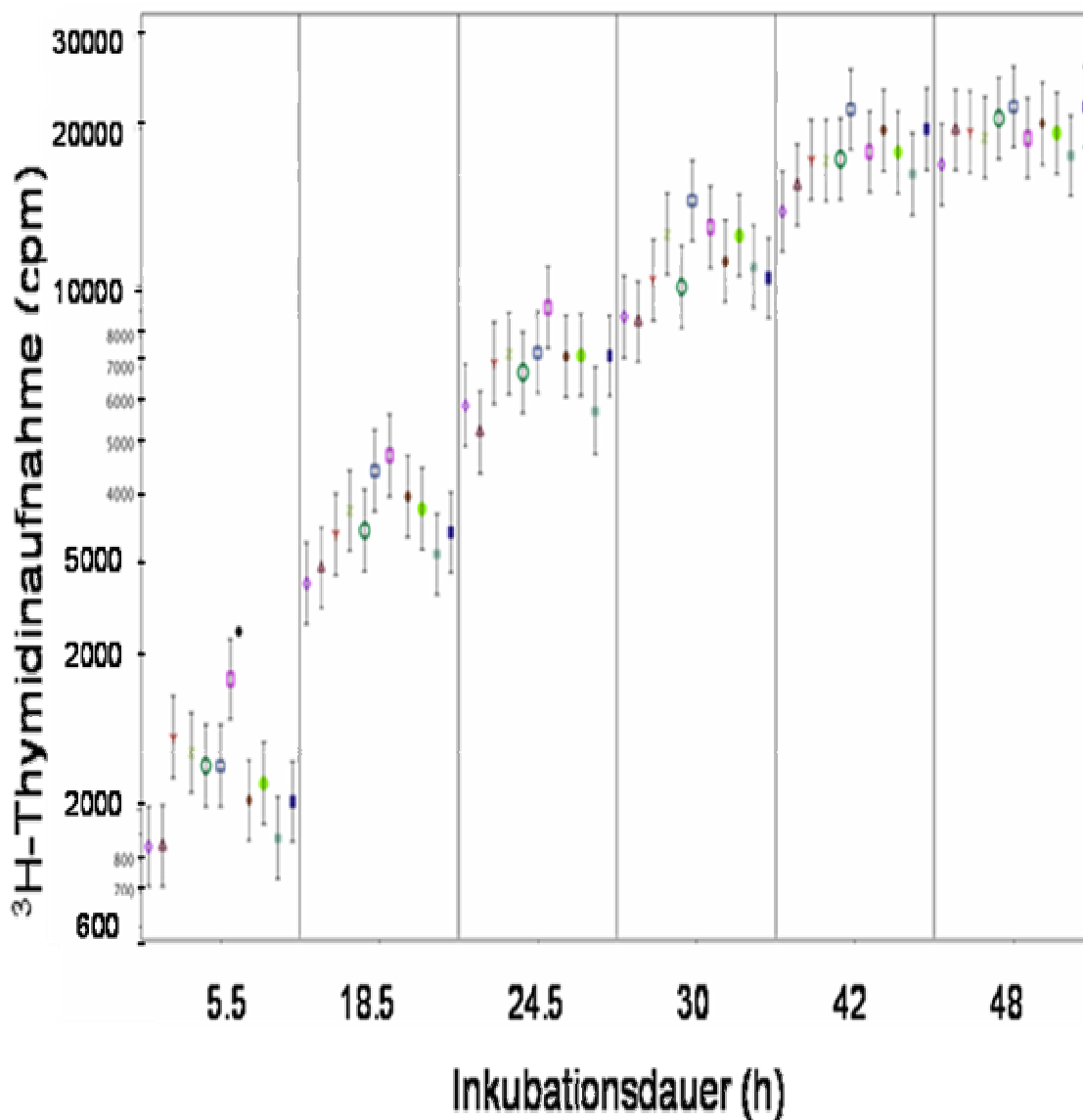
³H-Thymidinaufnahme: Die Graphik (s.h. Abb.5) zeigt deutlich, dass es im Verlauf der Inkubation zu einem graduellen Anstieg der ³H-Thymidinaufnahme bei den unbehandelten, aber auch bei den mit Redifferenzierungssubstanzen stimulierten Thyreozyten kam. Der einzige signifikante Anstieg im Vergleich zur Kontrolle wurde bei 9-cis-Retinsäure in einer Konzentration von 1 µM nach einer Inkubationszeit von 5.5 h verzeichnet.



◇	ohne Stimulation	▲	Methanol	Y	13-cis Retinsäure 0,5 µM	Z	13-cis Retinsäure 1 µM
○	13-cis Retinsäure 2 µM	□	9-cis Retinsäure 0,5 µM	◻	9-cis Retinsäure 1 µM	◆	9-cis Retinsäure 2 µM
●	All-trans Retinsäure 0,5 µM	■	All-trans Retinsäure 1 µM	■	All-trans Retinsäure 2 µM		

Abb.4: Einfluss von 13-cis-Retinsäure, 9-cis- und all-trans-Retinsäure auf die ¹²⁵I-Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ¹²⁵I-Iodidzugabe (4kBq). Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach 5,5h, 18,5h, 24,5h, 30h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert

und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.3). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.



◇	ohne Stimulation	▲	Methanol	∩	13-cis Retinsäure 0,5 µM	Z	13-cis Retinsäure 1 µM
○	13-cis Retinsäure 2 µM	□	9-cis Retinsäure 0,5 µM	◻	9-cis Retinsäure 1 µM	◆	9-cis Retinsäure 2 µM
●	All-transRetinsäure 0,5 µM	■	All-transRetinsäure 1 µM	■	All-transRetinsäure 2 µM		

Abb.5: Einfluss von 13-cis-Retinsäure, 9-cis- und all-trans-Retinsäure auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ³H-Thymidinzugabe (6kBq). Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 5,5h, 18,5h, 24,5h, 30h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.4). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.

4.1.2 ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme unter all-trans-Retinol und 13-cis-Retinol

Den kultivierten menschlichen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 wurden folgende Substanzen bei der Aussaat zugefügt:

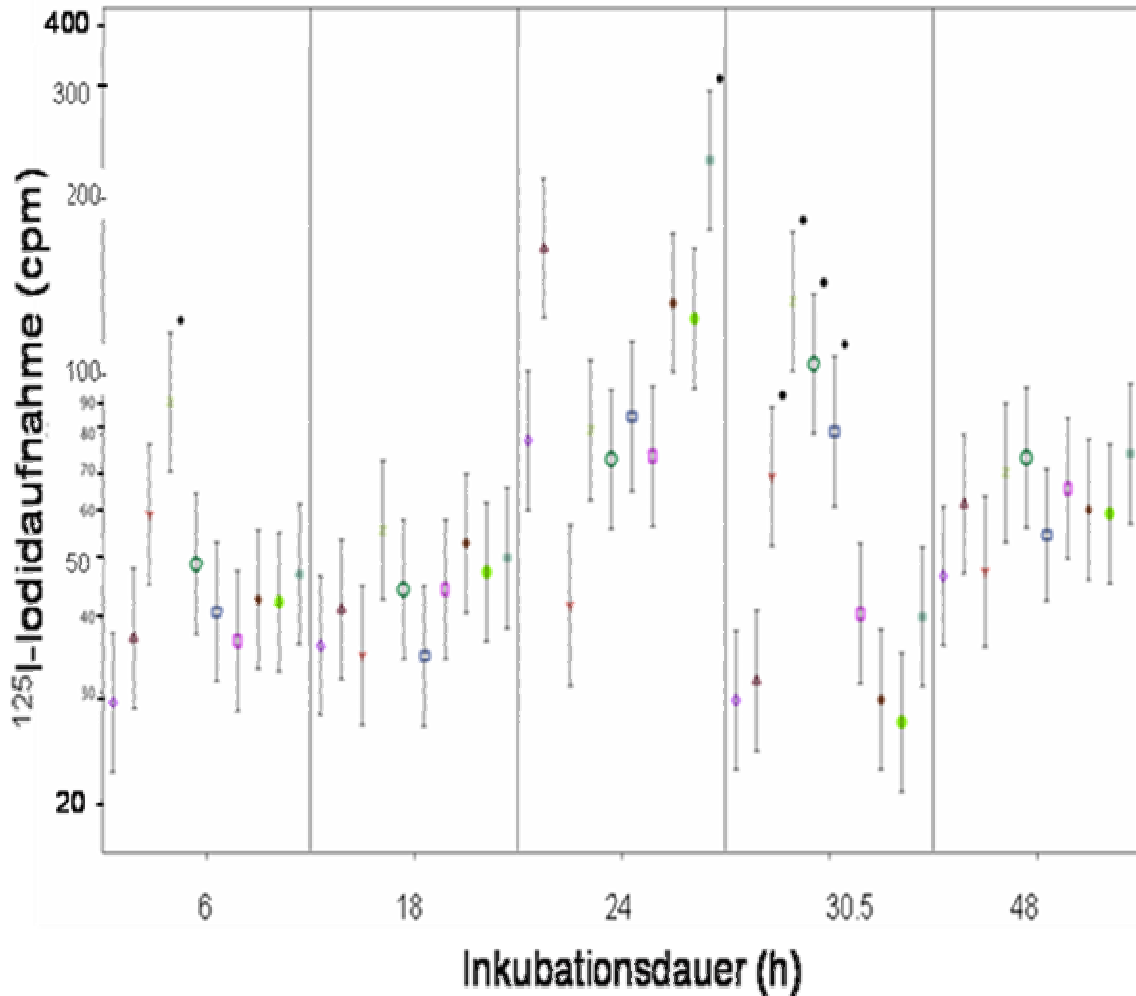
- all-trans-Retinol (1,6 µM, 3,2 µM, 6,5 µM, 13 µM)
- 13-cis-Retinol (1,6 µM, 3,2 µM, 6,5 µM, 13 µM)

Als Lösungsmittel für beide Substanzen wurde Methanol verwendet. Die oben angegeben Konzentrationen sind Endkonzentrationen der untersuchten Substanzen. Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, zu deren Medium nur das Lösungsmittel zugefügt wurde. Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme und die ³H-Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 6, 18, 24, 30.5 und 48 Stunden gemessen. Die Einbauraten wurden mit den Kontrollgruppen verglichen und mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkung beschrieben. Signifikante Unterschiede sind in Abb. 6 und 7 mit einem Stern (*) markiert. Siehe auch hierzu Tab.5 und 6 im Anhang.

¹²⁵I-Iodidaufnahme: Nach 6h Inkubationszeit zeigte sich eine signifikante Erhöhung der ¹²⁵I-Iodidinkorporation unter 3,2 µM 13-cis-Retinol. Nach 24h fanden sich bis auf die Ausnahme unter 1,6 µM 13-cis-Retinol insgesamt erhöhte Werte der ¹²⁵I-Iodidaufnahme in den Thyreozyten. Einziger signifikanter Anstieg nach 24 h war unter 13 µM all-trans-Retinol zu verzeichnen. Nach 30.5h kam es zu einem signifikanten Anstieg unter allen 4 getesteten Konzentrationen von 13-cis-Retinol, wohingegen es unter allen 4 getesteten Konzentrationen von all-trans Retinol zu einem nicht signifikanten Absinken der ¹²⁵I-Iodidinkorporation kam. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt.

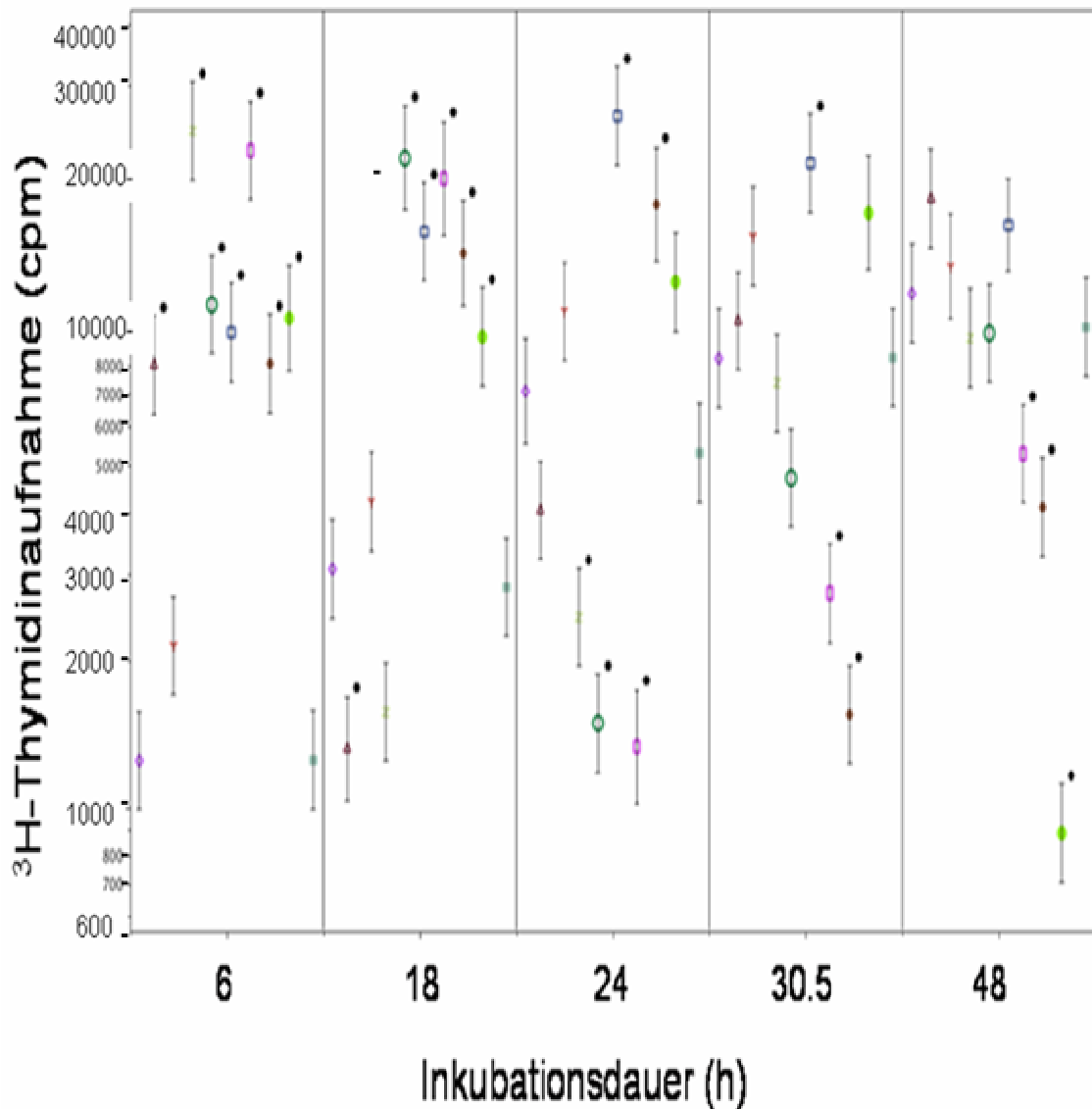
³H-Thymidinaufnahme: Nach 6 und 18 Stunden Inkubation zeigte sich in fast allen Thyreozyten ein signifikanter Anstieg der ³H-Thymidininkorporation. Unter 13 µM 13-cis-Retinol kam es über die gesamten Inkubationszeiten hinweg zu den höchsten ³H-Thymidineinbauraten, von denen sich bis auf den Meßpunkt nach 48h alle signifikant von der Kontrolle unterschieden. Nach 24h kam es zu einem signifikanten Absinken der Einbauraten unter 3,2 µM und 6,5 µM 13-cis-Retinol, sowie 1,3 µM all-trans-Retinol. Bei 3,2 µM all-trans-Retinol wurde ein

signifikanter Abfall nach 30.5h und bei 6,5 μM all-trans-Retinol nach 48h verzeichnet. Einzig 1,6 μM 13-cis- Retinol und 13 μM all-trans-Retinol wiesen über die Versuchsdauer hinweg einen graduellen, allerdings nicht signifikanten Anstieg der ^3H -Thymidininkorporation auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt.



◇	ohne Stimulation	▲	Methanol	Y	13-cis Retinol 1,6 μM	Z	13-cis Retinol 3,2 μM
○	13-cis Retinol 6,5 μM	□	13-cis Retinol 13 μM	□	All-trans Retinol 1,6 μM	◆	All-trans Retinol 3,2 μM
●	All-trans Retinol 6,5 μM	■	All-trans Retinol 13 μM				

Abb.6: Einfluss von 13-cis-Retinol und all-trans-Retinol auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^{125}I -Iodidzugabe (4kBq). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 6h, 18.5h, 24h, 30.5h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.5). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.



◇	ohne Stimulation	▲	Methanol	∩	13-cis Retinol 1,6 μM	Z	13-cis Retinol 3,2 μM	
○	13-cis Retinol 6,5 μM	□	13-cis Retinol 13 μM	◻	All-trans Retinol 1,6 μM	◆	All-trans Retinol 3,2 μM	
●	All-trans Retinol 6,5 μM	■	All-trans Retinol 13 μM					

Abb.7: Einfluss von 13-cis-Retinol und all-trans-Retinol auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten, pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 μl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^3H -Thymidinzugabe (6kBq). Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach 5,5h, 18,5h, 24,5h, 30h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.6). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.

4.1.3 ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme unter 5-Aza-deoxycytidin und Mevinolin

Bei der Aussaat wurde den kultivierten menschlichen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 folgende Substanzen in unterschiedlichen Endkonzentrationen zugefügt:

- Mevinolin (1 µM, 12,5 µM, 25 µM, 37 µM, 100 µM)
- 5-Aza-deoxycytidin (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM)

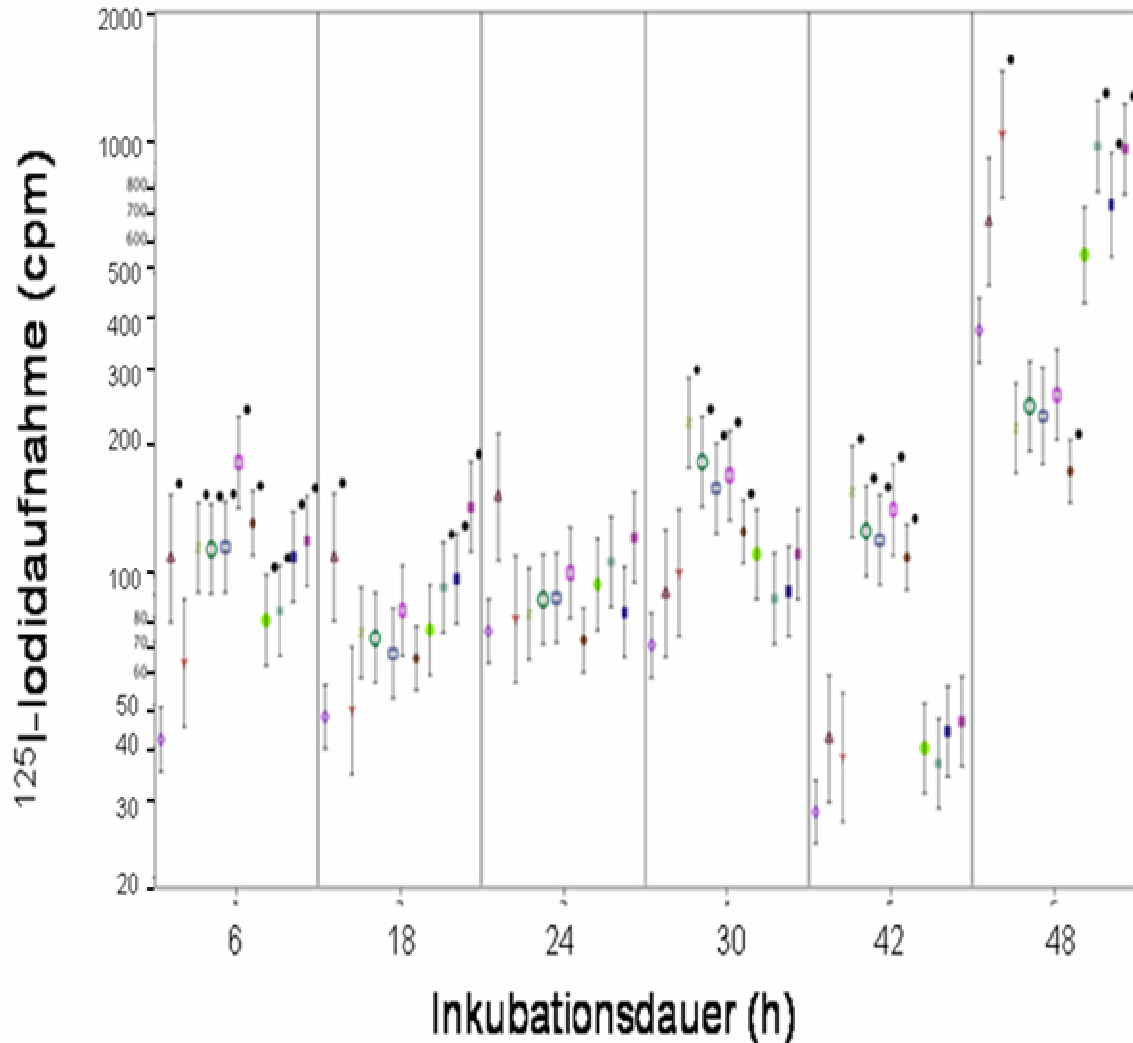
Lösungsmittel für Mevinolin war Ethanol und für 5-Aza-deoxycytidin DMSO.

Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, denen nur das Lösungsmittel zugefügt wurde. Die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidineinbauraten in die Thyreozyten wurde nach 6, 18, 24, 30, 42 und 48 Stunden gemessen. Die Einbauraten wurden mit den Kontrollgruppen verglichen und mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkung beschrieben. Signifikante Unterschiede in Abb. 8 und 9 sind mit einem Stern (*) markiert. Siehe hierzu auch Tab. 7 und 8 im Anhang.

¹²⁵I-Iodidaufnahme: Zwischen 6 und 42 Stunden kam es im Vergleich zur Kontrolle zu einer Steigerung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme in die stimulierten Thyreozyten. Hervorzuheben ist der signifikante Anstieg unter allen eingesetzten Konzentrationen von Mevinolin und 5-Aza-deoxycytidin nach 6h Inkubation. Nach 18h kam es allerdings nur noch unter 1 µM, 5 µM und 10 µM 5-Aza-deoxycytidin zu signifikant erhöhten Einbauraten. Nach 30h und 42h hingegen wurde ein signifikanter Anstieg der ¹²⁵I-Iodidaufnahme erneut unter 12,5 µM, 25 µM, 37 µM, 100 µM Mevinolin und 0,5 µM 5-Aza-deoxycytidin beobachtet. Insgesamt kam es nach 48h zu generell erhöhten Einbauraten. Im Vergleich zur Kontrolle war der Einbau unter 100 µM Mevinolin und wie schon nach 18h unter 1 µM, 5 µM und 10 µM 5-Aza-deoxycytidin statistisch signifikant. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.

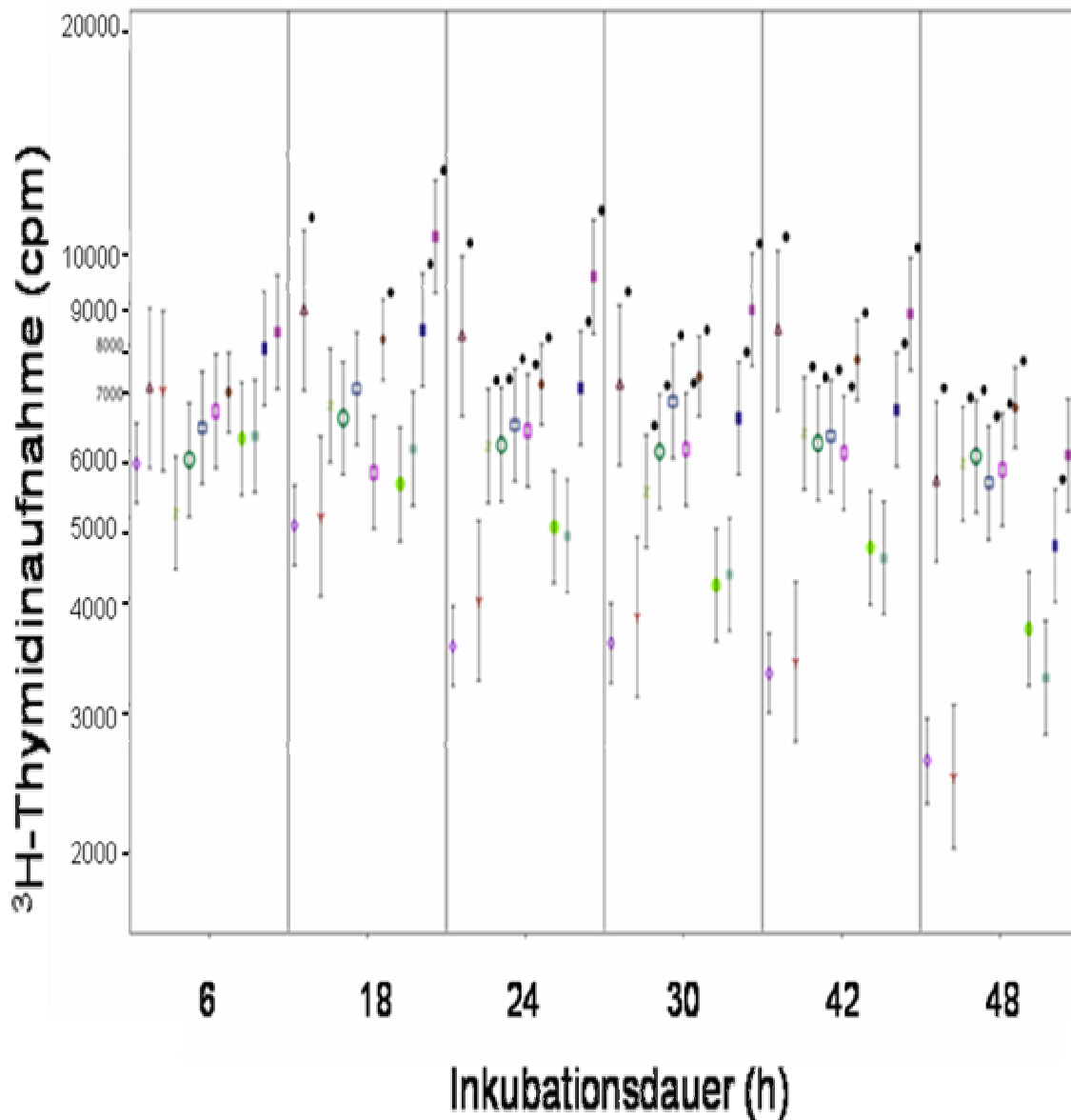
³H-Thymidinaufnahme: Im Verlauf dieses Versuches ließ sich nach 18h ein signifikanter Anstieg der ³H-Thymidineinbaurate durch 100 µM Mevinolin, 5 µM und 10 µM 5-Aza-deoxycytidin induzieren. Zwischen 24 und 48 Stunden, kam es unter allen untersuchten Konzentrationen von Mevinolin, sowie unter 5 µM

und 10 μM 5-Aza-deoxycytidin zu signifikant erhöhten ^3H -Thymidineinbauraten. Ergebnisse siehe Abbildung 9.



◇	ohne Stimulation	▲	Ethanol	∩	DMSO	Z	Mevinolin 1 μM
○	Mevinolin 12,5 μM	□	Mevinolin 25 μM	◻	Mevinolin 37 μM	◆	Mevinolin 100 μM
●	5-Aza-deoxycytidin 0,5 μM	■	5-Aza-deoxycytidin 1 μM	■	5-Aza-deoxycytidin 5 μM	■	5-Aza-deoxycytidin 10 μM

Abb.8: Einfluss von Mevinolin und 5-Aza-deoxycytidin auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^{125}I -Iodidzugabe (4kBq). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 6h, 18h, 24h, 30h, 42h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.7). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.



◇	ohne Stimulation	▲	Ethanol	Y	DMSO	Z	Mevinolin 1 µM
○	Mevinolin 12,5 µM	□	Mevinolin 25 µM	◻	Mevinolin 37 µM	◆	Mevinolin 100 µM
●	5-Aza-deoxycytidin 0,5 µM	■	5-Aza-deoxycytidin 1 µM	■	5-Aza-deoxycytidin 5 µM	■	5-Aza-deoxycytidin 10 µM

Abb.9: Einfluss von Mevinolin und 5-Aza-deoxycytidin auf die ^3H -Thymidinaufnahme in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^3H -Thymidinzugabe (6kBq). Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach 5,5h, 18,5h, 24,5h, 30h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.8). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.

4.1.4 ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme unter Valproinsäure, Troglitazon, Apicidin und APHA Compound 8

Den kultivierten menschlichen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 wurden folgende Substanzen bei der Aussaat zugefügt:

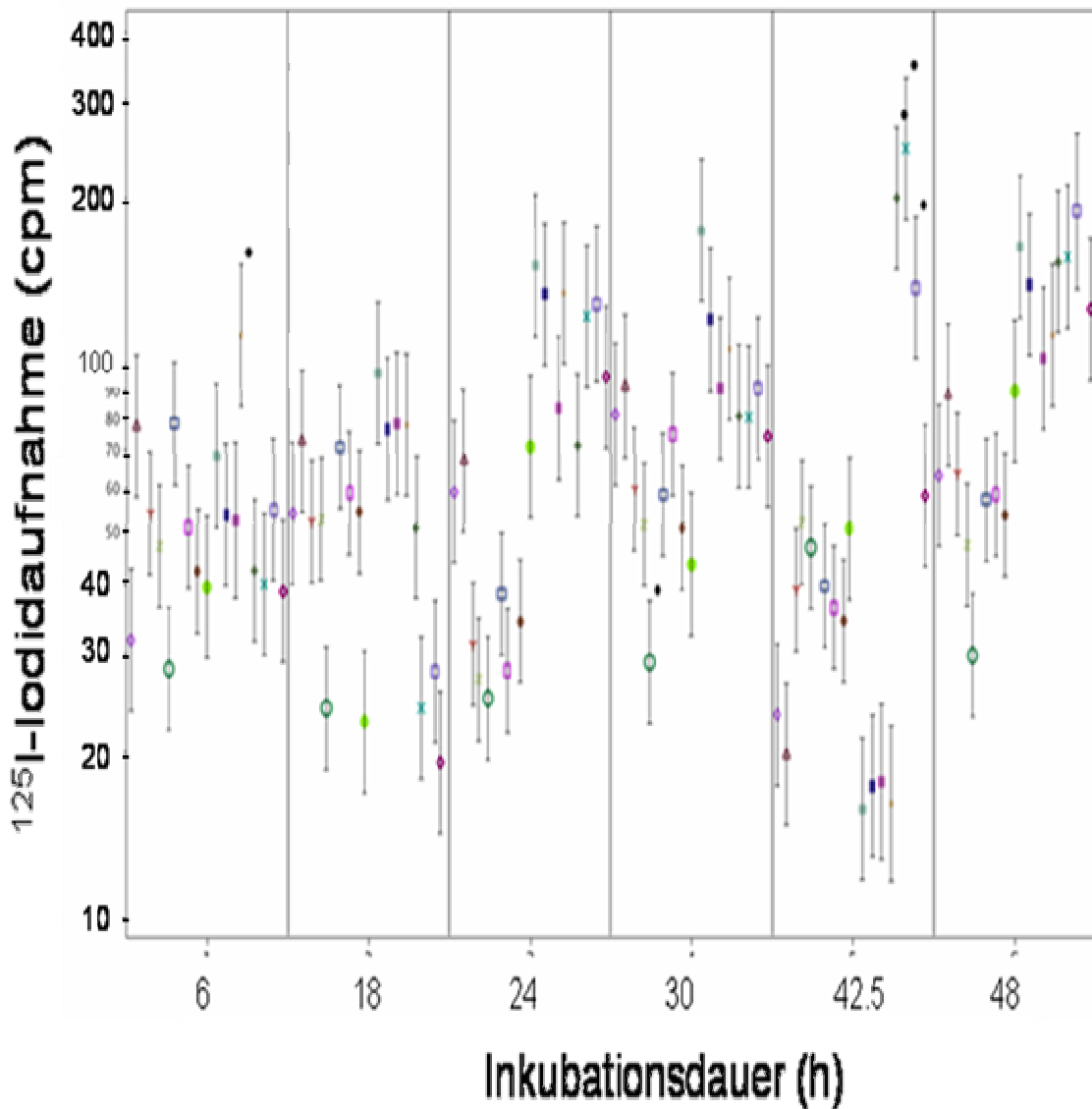
- Valproinsäure (0,5 mM, 1 mM, 3 mM)
- Troglitazon (2,5 µM, 5 µM, 10 µM)
- Apicidin (10 nM, 50 nM, 100 nM, 200 nM, 500 nM)
- APHA Compound 8 (0,5µM, 1µM, 5 µM, 10 µM)

Die angegebenen Konzentrationen sind Endkonzentrationen. Als Lösungsmittel für alle 4 Substanzen wurde DMSO verwendet.

Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, denen bei der Aussaat nur das Lösungsmittel zugefügt wurde. Die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidineinbauraten in die Thyreozyten wurde nach 6, 18, 24, 30, 42.5 und 48 Stunden gemessen. Die Einbauraten wurden mit den Kontrollgruppen verglichen und mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkung beschrieben. Signifikante Werte sind in Abb. 10 und 11 mit einem Stern (*) markiert. Siehe auch hierzu Tab.9 und 10 im Anhang

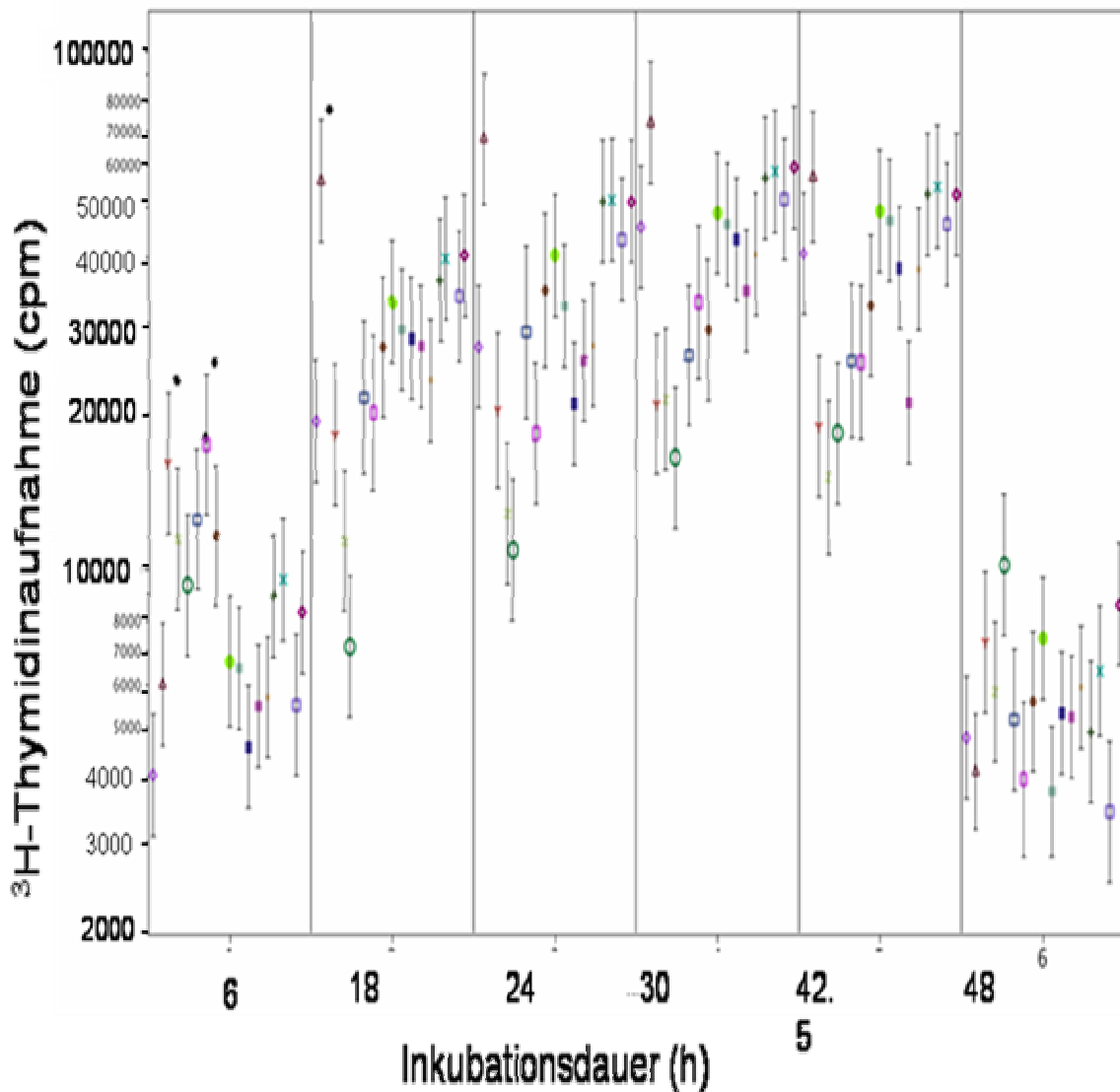
¹²⁵I-Iodidaufnahme: Nach 6h Inkubationszeit wurde ein signifikanter Anstieg unter 500 nM Apicidin verzeichnet. Unter Valproinsäure kam es über die gesamten Inkubationszeiten hinweg zu erniedrigten ¹²⁵I-Iodideinbauraten im Vergleich zur Kontrolle, von denen allerdings nur ein Wert (Valproinsäure 3 mM) nach 30h als signifikant erniedrigt gewertet wurde. Unter 0,5 µM, 1 µM und 5 µM APHA kam es nach 42 h zu einem gegenüber der Kontrolle signifikanten Anstieg der ¹²⁵I-Iodideinbaurate. Ergebnisse siehe Abbildung 10.

³H-Thymidinaufnahme: 0,5 mM Valproinsäure und 5 µM Troglitazon bewirkten nach 6 Stunden Inkubation eine signifikant erhöhte ³H-Thymidinaufnahme. Insgesamt kam es zwischen 18 und 42 Stunden Inkubation, betrachtet man die Konzentrationen getrennt, zu recht konstanten ³H-Thymidineinbauraten. Nach 48 Stunden war die ³H-Thymidininkorporation gegenüber der Kontrolle nicht signifikant erniedrigt. Ergebnisse siehe Abbildung 11.



◇	ohne Stimulation	▲	DMSO	∩	Valproinsäure 0,5 mM	Z	Valproinsäure 1mM
○	Valproinsäure 3mM	□	Troglitazon 2,5 µM	◻	Troglitazon 5 µM	◆	Troglitazon 10µM
●	Apicidin 10 nM	■	Apicidin 50 nM	■	Apicidin 100nM	■	Apicidin 200nM
◦	Apicidin 500nM	◊	APHA 0,5 µM	X	APHA 1 µM	◻	APHA 5 µM
◇	APHA 10 µM						

Abb.10: Einfluss von Valproinsäure, Troglitazon, Apicidin, APHA auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^{125}I -Iodidzugabe (4kBq). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 6h, 18,h, 24h, 30h, 42,5 und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.9). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.



◇	ohne Stimulation	▲	DMSO	Y	Valproinsäure 0,5 mM	Z	Valproinsäure 1mM
○	Valproinsäure 3mM	□	Troglitazon 2,5 µM	□	Troglitazon 5 µM	◆	Troglitazon 10µM
●	Apicidin 10 nM	■	Apicidin 50 nM	■	Apicidin 100nM	■	Apicidin 200nM
●	Apicidin 500nM	◆	APHA 0,5 µM	X	APHA 1 µM	□	APHA 5 µM
◇	APHA 10 µM						

Abb.11: Einfluss von Valproinsäure, Troglitazon, Apicidin, APHA auf die ^3H -Thymidininkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten, Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^3H -Thymidinzugabe (6kBq). Die ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach 6h, 18h, 24h, 30h, 42h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.10). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.

4.1.5 ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme unter Akt-Inhibitor V mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid

Zum Zeitpunkt der Aussaat wurde den kultivierten menschliche Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 folgende Substanzen zugefügt:

- Akt-Inhibitor V (1µM, 5µM, 10µM, 20µM)
- Arsentrioxid (2µM)
- Akt-Inhibitor V (1µM, 5µM, 10µM, 20µM) + Arsentrioxid (2µM)

Angegeben sind die Endkonzentrationen.

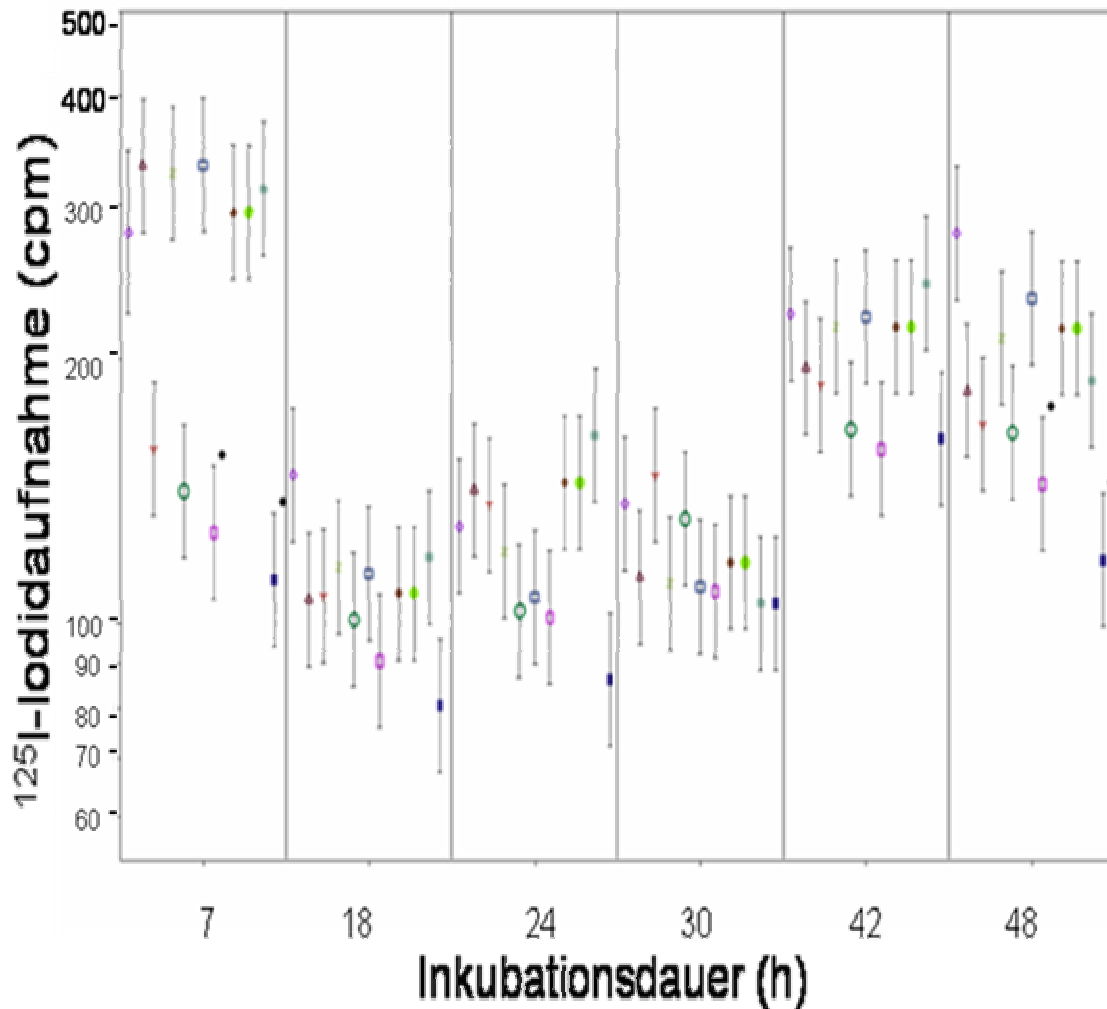
Bei einem Teil der Zellen, die mit Akt-Inhibitor I und V stimuliert wurden, erfolgte nach 2 Stunden die Zugabe von Arsentrioxid (2 µM). AKT-Inhibitor V wurde in DMSO gelöst.

Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, denen nur das Lösungsmittel zugefügt wurde. Die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidineinbauraten in die Thyreozyten wurde nach 7, 18, 24, 30, 42 und 48 Stunden gemessen. Die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidineinbauraten wurden mit den Kontrollgruppen verglichen und mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkung beschrieben. Signifikante Unterschiede sind in Abb. 12 und 13 mit einem Stern (*) markiert. Siehe hierzu auch Tab.11 und 12 im Anhang

¹²⁵I-Iodidaufnahme: Mit Ausnahme von 10 µM AKT Inhibitor V + 2 µM Arsentrioxid, bewirkten alle mit AKT V + 2 µM Arsentrioxid behandelten Thyreozyten nach 6 Stunden eine deutlich niedrigere ¹²⁵I-Iodideinbaurate im Vergleich zu den Thyreozyten, die nur mit AKT Inhibitor V stimuliert wurden. Signifikant niedrige Einbauraten wurden bei 5 µM und 20 µM AKT V + 2 µM Arsentrioxid nach 6h und 48h gemessen. Ergebnisse siehe Abbildung 12.

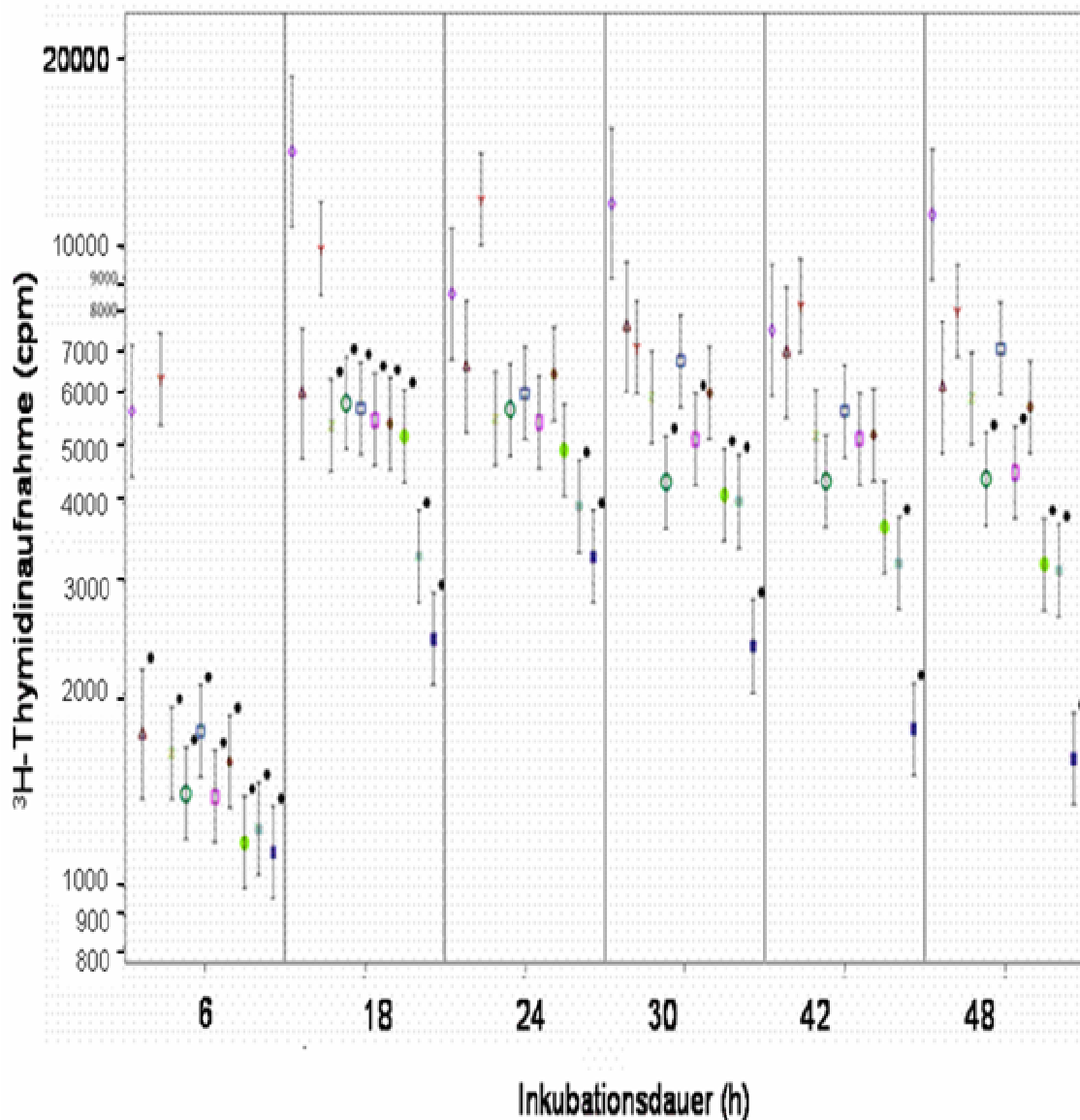
³H-Thymidinaufnahme: Nach 6 und 18 Stunden Inkubation kam es unter allen stimulierten Zellen, mit Ausnahme von 2 µM Arsentrioxid, zu einem signifikanten Abfall der ³H-Thymidininkorporation. Hervorzuheben ist die Stimulation mit 20 µM Akt-Inhibitor V mit und ohne Zugabe von 2 µM Arsentrioxid, da es über 48 Stunden hinweg signifikant niedrige ³H-Thymidineinbauraten im Vergleich zur Kontrolle aufwies. Zudem wurden unter 1

μM, 5 μM und 10 μM AKT V +2 μM Arsentrioxid nach 32 und 48 Stunden signifikant erniedrigte Werte gemessen. Ergebnisse siehe Abbildung 13.



◇	ohne Stimulation	▲	DMSO	∩	Arsentrioxid 2 μM	Z	AKT-Inhibitor V 1 μM
○	AKT-Inhibitor V 1 μM +2 μM Arsentrioxid	□	AKT-Inhibitor V 5 μM	◻	AKT-Inhibitor V 5 μM +2 μM Arsentrioxid	◆	AKT-Inhibitor V 10 μM
●	AKT-Inhibitor V 10 μM + 2 μM Arsentrioxid	■	AKT-Inhibitor V 20 μM	■	AKT-Inhibitor V 20 μM +2 μM Arsentrioxid		

Abb.12: Einfluss von AKT V-Inhibitor mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit 2 μM Arsentrioxid und mit 2 μM Arsentrioxid allein auf die ¹²⁵I-Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ¹²⁵I-Iodidzugabe (4kBq). Die ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach 7h, 18h, 24h, 30h, 42h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.11). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.



◇	ohne Stimulation	▲	DMSO	Y	Arsentrioxid 2 μ M	Z	AKT-Inhibitor V 1 μ M
○	AKT-Inhibitor V 1 μ M +2 μ M Arsentrioxid	□	AKT-Inhibitor V 5 μ M	◻	AKT-Inhibitor V 5 μ M +2 μ M Arsentrioxid	◆	AKT-Inhibitor V 10 μ M
●	AKT-Inhibitor V 10 μ M +2 μ M Arsentrioxid	■	AKT-Inhibitor V 20 μ M	■	AKT-Inhibitor V 20 μ M +2 μ M Arsentrioxid		

Abb.13: Einfluss von Akt V-Inhibitor mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit 2 μ M Arsentrioxid und mit 2 μ M Arsentrioxid allein auf die 3 H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 μ l Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die 3 H-Thymidinzugabe (6kBq). Die 3 H-Thymidinaufnahme wurde nach 7h, 18h, 24h, 30h, 42h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.12). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet

4.1.6 ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme unter Akt-Inhibitor I mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid

Den kultivierten menschlichen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 wurden folgende Substanzen bei der Aussaat zugefügt:

- Akt-Inhibitor I (1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM)
- Arsentrioxid (2 µM)
- Akt-Inhibitor I (1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM) + Arsentrioxid (2 µM)

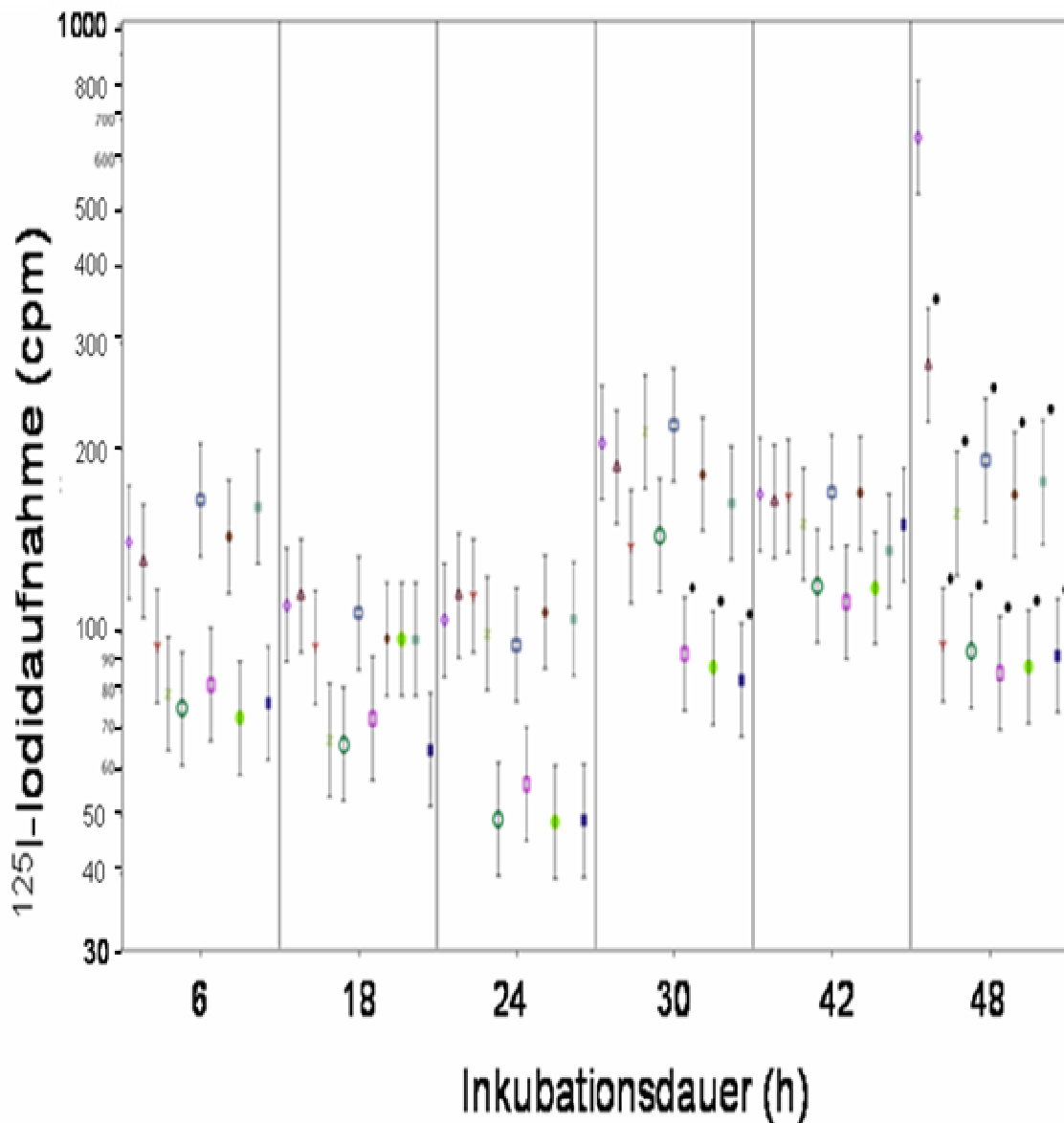
Angegeben sind die Endkonzentrationen.

Die Stimulation der Zellen mit Arsentrioxid erfolgte nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden. AKT-Inhibitor I wurde in DMSO gelöst.

Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidinaufnahme dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, die nur mit dem Lösungsmittel versetzt wurden. Die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidininkorporation in die Thyreozyten wurde nach 6, 18, 24, 30, 42 und 48 Stunden gemessen. Die Einbauraten wurden mit den Kontrollgruppen verglichen und mit den Faktoren Erntezeit, Konzentration und deren Wechselwirkung beschrieben. Signifikante Werte sind in Abb 14 und 15 mit einem Stern (*) markiert. Siehe hierzu auch Tab.13 und 14 im Anhang.

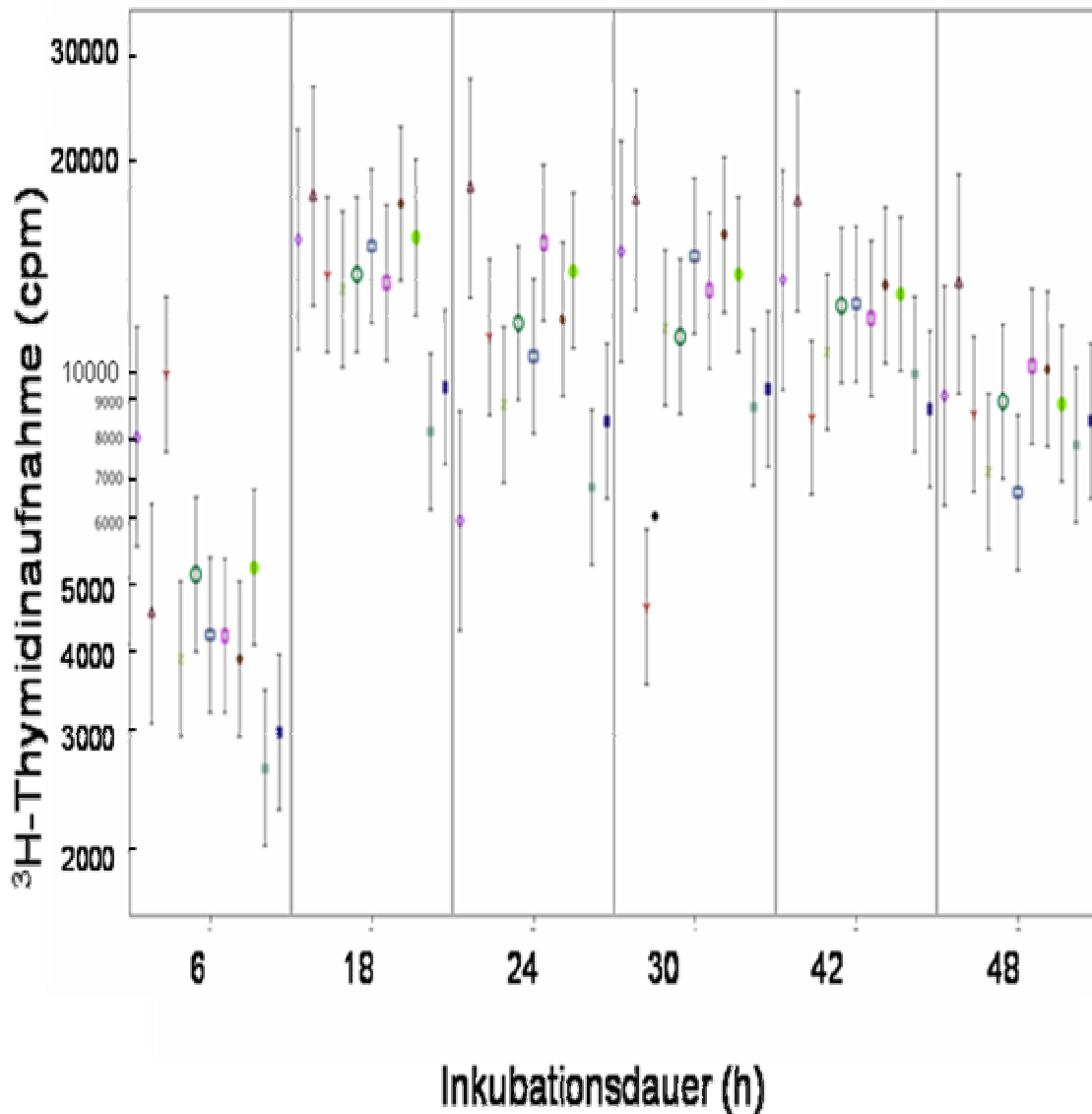
¹²⁵I-Iodidaufnahme: Über den Versuchszeitraum hinweg kam es bei den zusätzlich mit 2 µM Arsentrioxid stimulierten Zellen zu niedrigeren ¹²⁵I-Iodideinbauraten im Vergleich zu den Zellen, die nur mit AKT-Inhibitor I stimuliert wurden. Signifikant erniedrigte ¹²⁵I-Iodideinbauraten wurden nach 30 h Inkubation unter 5 µM, 10 µM und 20 µM AKT-Inhibitor I + 2 µM Arsentrioxid gemessen. Zudem konnte nach 48-stündiger Inkubation bei allen stimulierten Thyreozyten eine signifikant erniedrigte ¹²⁵I-Iodideininkorporation verzeichnet. Ergebnisse siehe Abbildung 14.

³H-Thymidinaufnahme: Der einzig statistisch signifikante Unterschied zur Kontrolle wurde unter 2 µM Arsentrioxid nach einer Inkubationsdauer von 30 Stunden gemessen. Erniedrigte ³H-Thymidinaufnahmen wurden nach 6-stündiger Inkubation gemessen. Insgesamt kam es über 18 und 24 Stunden hinweg zu konstanten ³H-Thymidinaufnahmeraten in allen humanen cancerogenen Thyreozyten. Ergebnisse siehe Abbildung 15.



◇	ohne Stimulation	▲	DMSO	∩	Arsentrioxid 2 µM	Z	AKT-Inhibitor I 1 µM
○	AKT-Inhibitor I 1 µM + 2 µM Arsentrioxid	□	AKT-Inhibitor I 5 µM	◻	AKT-Inhibitor I 5 µM + 2 µM Arsentrioxid	◆	AKT-Inhibitor I 10 µM
●	AKT-Inhibitor I 10 µM + 2 µM Arsentrioxid	■	AKT-Inhibitor I 20 µM	■	AKT-Inhibitor I 20 µM + 2 µM Arsentrioxid		

Abb.14: Einfluss von Akt I-Inhibitor mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit 2 µM Arsentrioxid und mit 2 µM Arsentrioxid allein auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^{125}I -Iodidzugabe (4kBq). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 5,5h, 18,5h, 24,5h, 30h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.13). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.



◇	ohne Stimulation	▲	DMSO	∩	Arsentrioxid 2 µM	Z	AKT-Inhibitor 1 µM
○	AKT-Inhibitor 1 µM + 2 µM Arsentrioxid	□	AKT-Inhibitor 15 µM	◻	AKT-Inhibitor 15 µM + 2 µM Arsentrioxid	◆	AKT-Inhibitor 10 µM
●	AKT-Inhibitor 10 µM + 2 µM Arsentrioxid	■	AKT-Inhibitor 20 µM	■	AKT-Inhibitor 20 µM + 2 µM Arsentrioxid		

Abb.15: Einfluss von Akt I-Inhibitor mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit 2 µM Arsentrioxid und mit 2 µM Arsentrioxid allein auf die ³H-Thymidineinbaurate in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten, Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. Direkt nach Aussaat erfolgte die ³H-Thymidinzugabe (6kBq). Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 5,5h, 18,5h, 24,5h, 30h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Die Ergebnisse sind logarithmisch transformiert und werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang (Tab.14). Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.

4.2 a) Beeinflussung der Apoptoserate von kultivierten malignen humanen Thyreozyten durch verschiedene Differenzierungssubstanzen und b) Immunzytochemischer Nachweis von NIS und Pendrin

4.2.1 Einfluss von all-trans-Retinol, 13-cis-Retinol, all-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure auf: a) die Apoptose und b) die NIS- und Pendrin-Expression in humanen Thyreozyten

Bei der Aussaat wurden den humanen cancerogene Zellen der Zelllinie FTC-238 folgende Substanzen hinzugefügt:

- All-trans-Retinol (3,2 µM)
- 13-cis-Retinol (3,2 µM)
- All-trans-Retinsäure (1 µM)
- 9-cis-Retinsäure (1 µM)
- 13-cis-Retinsäure (1 µM)

Die Konzentrationsangaben entsprechen den Endkonzentrationen der untersuchten Substanzen. Lösungsmittel für alle oben aufgezählten Substanzen war Methanol. Alle Zellen entstammten einer Population.

a) Apoptoserate: Nach einer 24- und 48-stündigen Inkubationszeit wurde der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers gemessen. Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der Apoptoseraten dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, welche nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden. Als zusätzliche Kontrollgruppe diente Staurosporin, ein Induktor des mitochondrialen Apoptosesignalweges.

Abbildung 16 zeigt, dass es nach einer 24-stündigen Inkubation nur bei den Thyreozyten, welche mit all-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure stimuliert wurden, zu einem leichten Anstieg der Apoptoseraten (auf 9%) gegenüber der Kontrolle kam. Die übrigen Werte lagen bei 4-7%. Nach 48 Stunden Inkubation war bei allen getesteten Thyreozyten nur ein minimales, nicht signifikantes Absinken der Apoptoserate im Vergleich zu den unstimulierten Thyreozyten, die als Kontrollgruppe dienten, zu verzeichnen. Der Abstieg der Apoptoserate unter Staurosporin, das als Positivkontrolle dient, spricht für ein intaktes Ansprechen der Zellen.

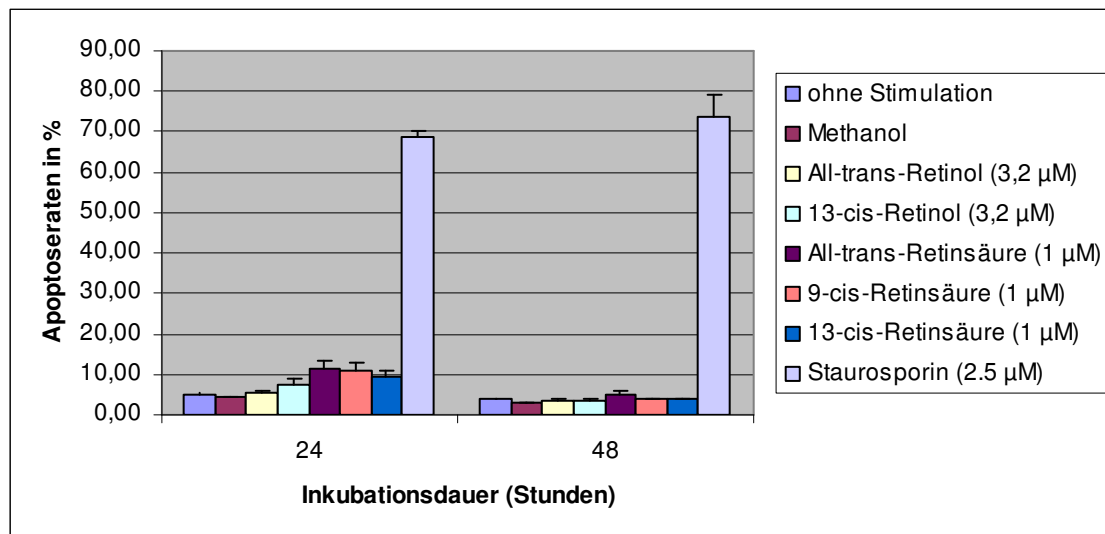


Abbildung 16: Einfluss von all-trans-Retinol (3,2 µM), 13-cis-Retinol (3,2 µM), all-trans-Retinsäure (1 µM), 9-cis-Retinsäure (1 µM) und 13-cis-Retinsäure (1 µM) auf die Apoptoserate der Zelllinie FTC-238. Zugabe der Stimulanzen erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Gemessen wurde die Apoptoserate nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte angegeben in Prozent, n=3. Als Kontrollgruppen dienen unstimulierte Thyreozyten, sowie Thyreozyten stimuliert mit den Lösungsmitteln Methanol und als Positivkontrolle mit Staurosporin stimulierte Thyreozyten. (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 15 u. 16 im Anhang)

b) NIS- und Pendrin-Expression: Als Kontrollgruppe für den zytochemischen Nachweis von NIS und Pendrin dienen unstimulierte und mit dem Lösungsmittel Methanol stimulierte Zellen. Zur Qualitätskontrolle der humanen cancerogenen Zellen wurden unstimulierte Thyreozyten, welche zum Zeitpunkt der Aussaat auf die Objektträger gegeben wurden, verwendet (Null-Wert). Fiel diese Qualitätskontrolle positiv aus, konnte der Versuch interpretiert werden.

NIS-Expression: Nach 24-stündiger Inkubation induzierte all-trans-Retinsäure ein Absinken der NIS-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe um 50%. Unter 9-cis-Retinsäure hingegen kam es zu einer Verdreifachung und unter 13-cis-Retinsäure gar zu einer Vervierfachung der NIS-exprimierenden Zellen. Nach 48 Stunden kam es insgesamt zu einer erhöhten NIS-Expression in allen untersuchten humanen cancerogenen Thyreozyten. Die niedrigsten Werte nach 48-stündiger Inkubation wurden unter all-trans-Retinsäure und 13-cis-Retinsäure gemessen, hier lag die Anzahl NIS-exprimierender Zellen bei 60%. Dennoch kam es bei all-trans-Retinsäure im Vergleich zu 24 Stunden zu einer 6x höheren NIS Expression. Unter 13-cis-Retinsäure hingegen kam es im Vergleich zu 24 Stunden zu einem Absinken der NIS exprimierenden Zellen um

20%. Die höchsten Werte mit einer NIS-Expression von 90%, waren unter all-trans-Retinol und 13-cis-Retinol, sowie unter 9-cis-Retinsäure zu sehen. Der Unterschied zur Lösungsmittel-Kontrolle betrug allerdings 10%, zur Null-Kontrolle dagegen 30%. Methanol selbst kann somit auch NIS induzieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.

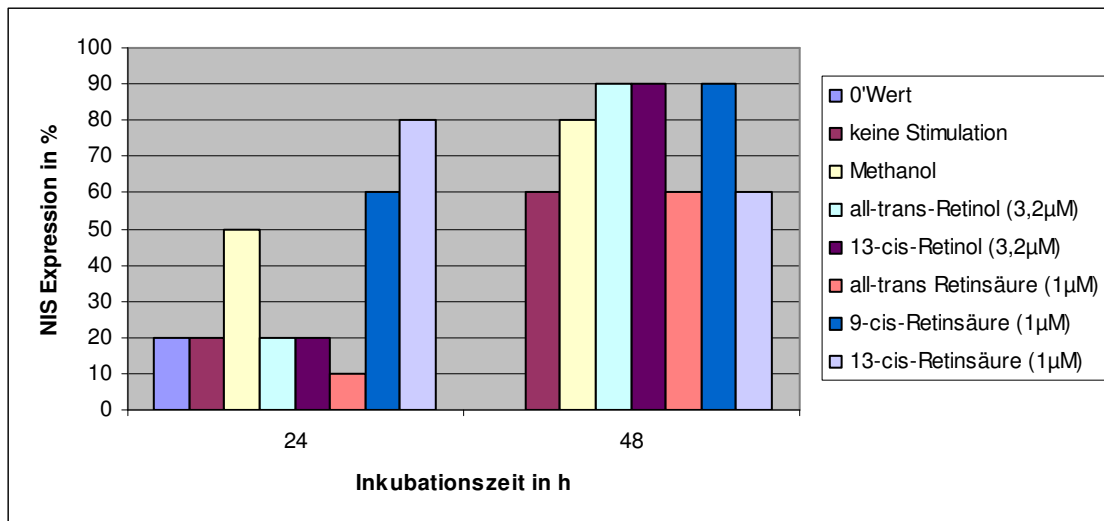


Abbildung 17: Einfluss von all-trans-Retinol (3,2 µM), 13-cis-Retinol (3,2 µM), all-trans-Retinsäure (1 µM), 9-cis-Retinsäure (1 µM) und 13-cis-Retinsäure (1 µM) auf die Expression des NIS-Symporters nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.17 im Anhang)

Pendrin-Expression: All-trans- und 13-cis-Retinol zeigten nach 24 Stunden Inkubation eine um bis zu 30% gesteigerte Pendrin Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 48 Stunden war nur noch unter 13-cis-Retinol ein Anstieg der Pendrin exprimierenden Zellen zu verzeichnen. Unter Stimulation von all-trans-, 9-cis- und 13-cis-Retinsäure zeigten die Thyreozyten nach 24 Stunden eine niedrigere Pendrin Expression, mit Werten zwischen 5 und 7.5%. Nach 48 Stunden stieg die Anzahl der Pendrin exprimierenden Zellen an und erreichte bei den mit all-trans-Retinsäure stimulierten Thyreozyten einen Wert von 40% und den mit 9-cis- und 13-cis-Retinsäure stimulierten Thyreozyten einen Wert von 25%. Ergebnisse siehe Abbildung 18.

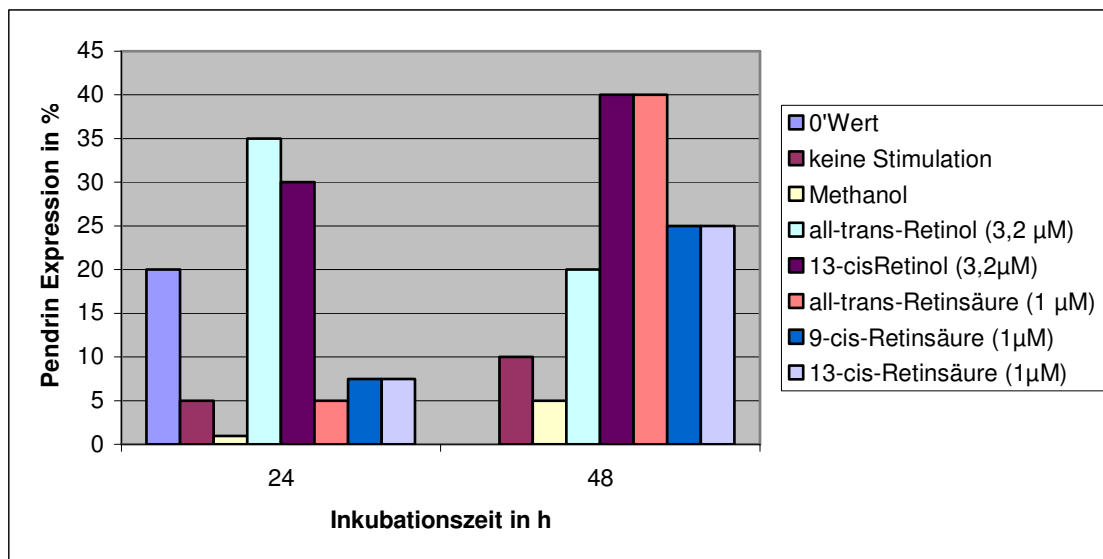


Abbildung 18: Einfluss von all-trans-Retinol (3,2 µM), 13-cis-Retinol (3,2 µM), all-trans-Retinsäure (1 µM), 9-cis-Retinsäure (1 µM) und 13-cis-Retinsäure (1 µM) auf die Expression von Pendrin nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.18 im Anhang)

Zusätzlich zur Apoptoserate und zur NIS- und Pendrin-Expression wurde in dieser Versuchsreihe die ^{125}I -Iodidaufnahme und ^3H -Thymidinaufnahme bestimmt. Die Schilddrüsenzellen hierfür entstammten derselben Population wie die Zellen, die für die Bestimmung der Apoptose und die Ermittlung der NIS-, Pendrin-Expression verwendet wurden.

Als Kontrollgruppe hierfür dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, welche mit dem Lösungsmittel versetzt wurden. Die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymidineinbauraten in die Thyreozyten wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen.

^{125}I -Iodidaufnahme: Abbildung 19 zeigt, dass sowohl nach 24-stündiger, als auch nach 48-stündiger Inkubation keine signifikant erniedrigten bzw. erhöhten ^{125}I -Iodideinbauraten gemessen werden konnten.

^3H -Thymidinaufnahme: Nach 24 Stunden Inkubation kam es unter 13-cis-Retinsäure zu einem signifikanten Anstieg der ^3H -Thymidininkorporation im Vergleich zur Kontrolle. Nach 48h wiesen alle Substanzen signifikant erhöhte Aufnahmeraten auf. Die Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt.

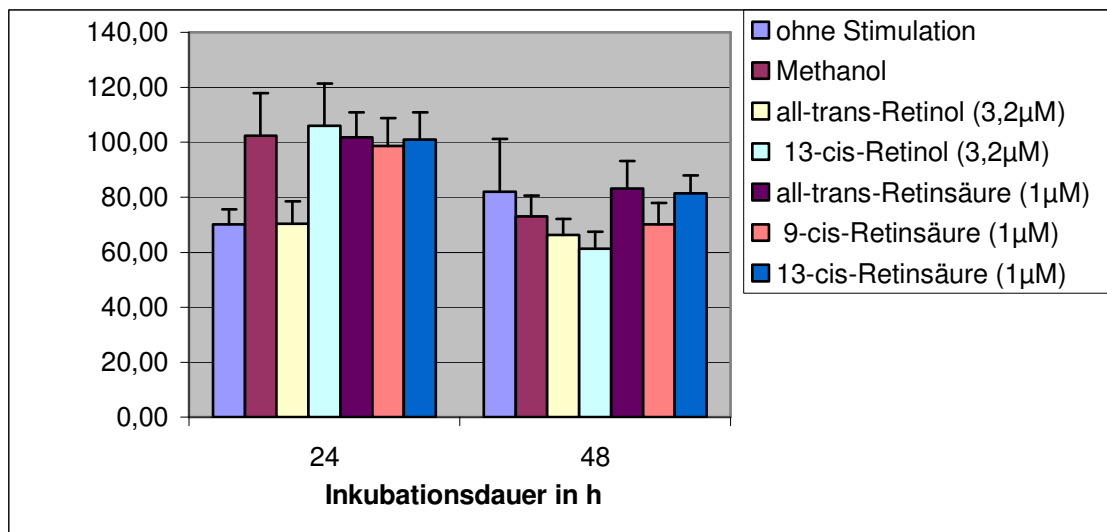


Abb.19: Einfluss von all-trans-Retinol (3,2 µM), 13-cis-Retinol (3,2 µM), all-trans-Retinsäure (1 µM), 9-cis-Retinsäure (1 µM) und 13-cis-Retinsäure (1 µM)) auf die ¹²⁵I-Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ¹²⁵I-Iodidzugabe (4kBq). ¹²⁵I-Iodidaufnahme wurde nach 24 und 48h Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.(zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.27 u.31im Anhang)

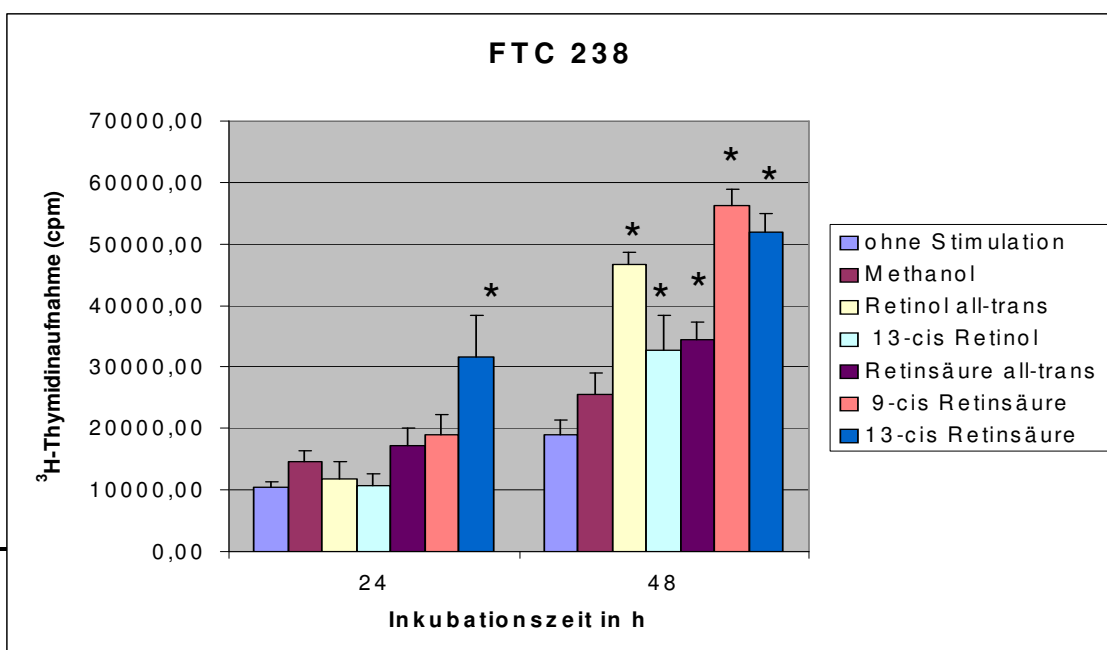


Abb.20: Einfluss von all-trans Retinol (3,2 µM), 13-cis Retinol (3,2 µM), all-trans Retinsäure (1 µM), 9-cis Retinsäure (1 µM) und 13-cis Retinsäure (1 µM)) ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humanen malignen Thyreozyten (FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-wells Platten. Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ³H-Thymidinzugabe (6kBq). Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 24 und 48h

*Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Zugehörige Zahlenwerte und Statistik im Anhang in Tab. 33-40. Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet.*

4.2.2 Einfluss von Apicidin, Valproinsäure, Troglitazon, 5-Aza-deoxycytidin und Mevinolin auf: a) die Apoptose und b) die NIS- und Pendrin-Expression in humanen Thyreozyten

Bei Aussaat wurden den humanen cancerogene Zellen der Zelllinie FTC-238 folgende Substanzen in deren Endkonzentration hinzugefügt:

- Apicidin (0,2 μM)
- Valproinsäure (1000 μM)
- Troglitazon (5 μM)
- 5-Aza-deoxycytidin (10 μM)
- Mevinolin (37 μM)

Angegeben sind die Endkonzentrationen.

Lösungsmittel für Apicidin, Valproinsäure, Troglitazon und 5-Aza-deoxycytidin war DMSO. Mevinolin wurde in Ethanol gelöst.

a) Apoptoserate: Nach einer 24- und 48-stündigen Inkubationszeit wurde der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers gemessen. Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der Apoptoseraten dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, denen das Lösungsmittel zugefügt wurde. Als zusätzliche Positiv-Kontrollgruppe diente Staurosporin.

Nach 24 Stunden war bei Mevinolin schon ein leichter Anstieg der Apoptoserate auf 21% zu beobachten. Nach 48 Stunden folgte unter Mevinolin ein drastischer Anstieg der Apoptoserate auf über 95%. Die restlichen Substanzen zeigten sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden keine bemerkenswerten Unterschiede im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen auf. Graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 21.

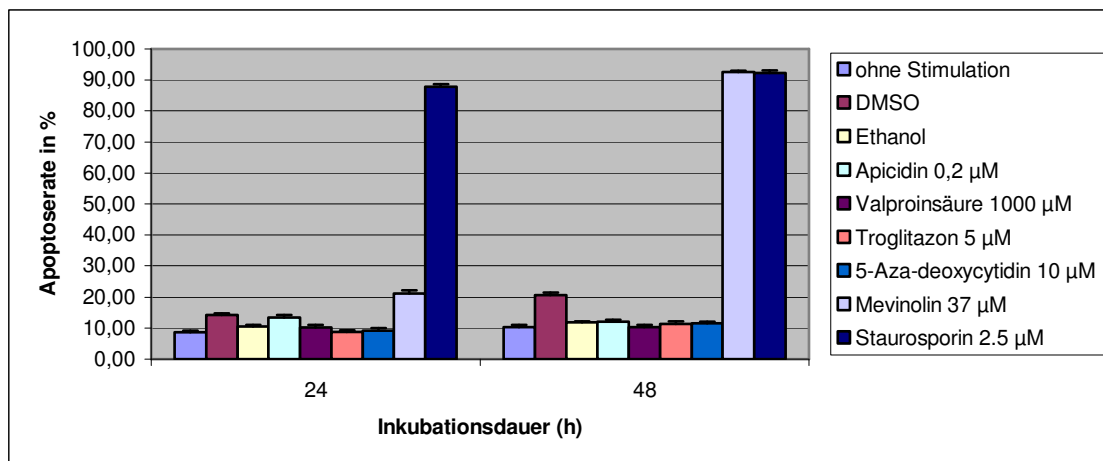


Abbildung 21: Einfluss von Apicidin (0,2 µM), Valproinsäure (1000µM), Troglitazon (5 µM), 5-Aza-deoxycytidin (10 µM) und Mevinolin (37 µM) auf die Apoptoserate der Zelllinie FTC-238. Zugabe der Stimulanzien erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Gemessen wurde die Apoptoserate nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte angegeben in Prozent, n=3. Als Kontrollgruppen dienten unstimulierte Thyreozyten, sowie Thyreozyten stimuliert mit den Lösungsmitteln DMSO und Ethanol, sowie als Positiv-Kontrolle mit Staurosporin stimulierte Thyreozyten. (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 19 u. 20 im Anhang)

b) NIS- und Pendrin-Expression: Als Kontrollgruppe für den zytochemischen Nachweis von NIS und Pendrin dienten unstimulierte und mit dem Lösungsmitteln DMSO und Ethanol stimulierte Zellen. Als Positiv-Kontrolle wurden unstimulierte Thyreozyten, welche zum Zeitpunkt der Aussaat auf die Objektträger gegeben wurden, verwendet (Nullwert). Fiel diese Qualitätskontrolle positiv aus, konnte der Versuch interpretiert werden.

NIS-Expression: In Abbildung 22 wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe alle Substanzen eine deutlich erniedrigte NIS-Expression auf. Unter dem Einfluss von Apicidin, Valproinsäure und Troglitazon zeigten sich etwa 20% weniger NIS-exprimierende Zellen, unter Mevinolin waren es 30% weniger. Unter der Wirkung von 5-Azadeoxycytidin betrug die Anzahl NIS-positiver Zellen 10%. Nach 48 Stunden kam es bei der Kontrolle zu einem drastischen Absinken der NIS-exprimierenden Zellen von 45% auf 5%. Im Vergleich dazu betrug die NIS-Expression unter Apicidin und Valproinsäure 15%. Im Vergleich zu den entsprechenden Werten nach 24 Stunden war es zu einer Reduktion der NIS-positiven Zellen um 50% gekommen. Unter dem Einfluss von 5-Azadeoxycytidin kam es ebenfalls zu einem Absinken der NIS-exprimierenden Zellen nach 48 Stunden. Mevinolin zeigte nach 48 Stunden die gleiche Anzahl positiver Zellen

als nach 24 Stunden. Troglitazon induzierte als einzige Substanz nach 48-stündiger Inkubationszeit einen Anstieg der NIS-Expression

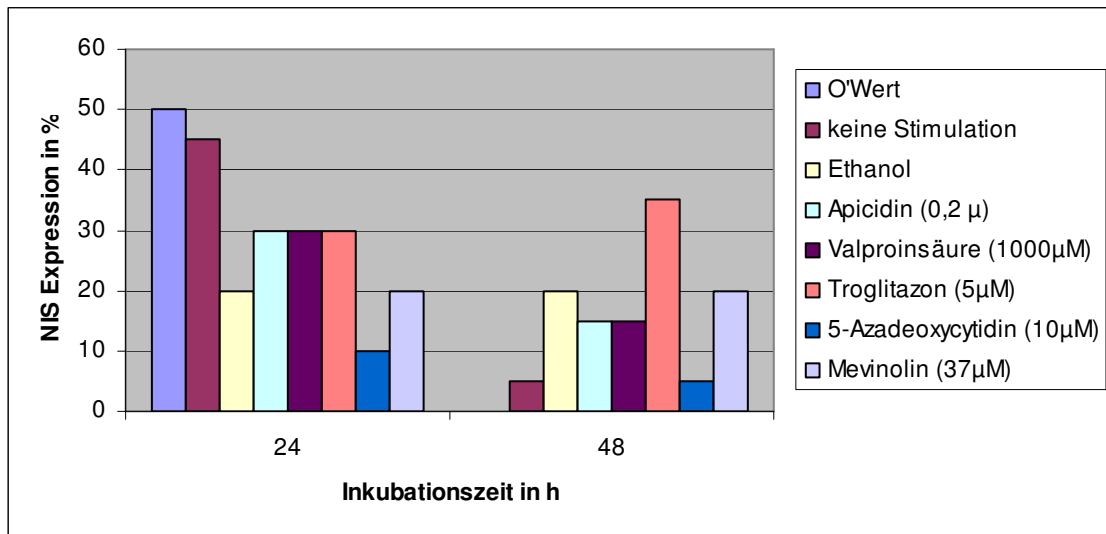


Abbildung 22: Einfluss von Apicidin (0,2 µM), Valproinsäure (1000µM), Troglitazon (5 µM), 5-Aza-deoxycytidin (10 µM) und Mevinolin (37 µM) auf die Expression des NIS-Symporters nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.21 im Anhang)

Abb.23:Pendrin-Expression: Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich nach einer 24-stündigen Inkubation unter der Stimulation mit Apicidin, Valproinsäure und Troglitazon eine deutlich erniedrigte Anzahl Pendrin-exprimierender Thyreozyten um bis zu 50%. Einzig Mevinolin zeigte im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg der Pendrin-Expression auf 60%. Unter 5-Azadeoxycytidin konnte sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden keine Pendrin-exprimierenden Zellen festgestellt werden. Nach 48 Stunden kam es bei Apicidin, Valproinsäure und Troglitazon gegenüber der Kontrollgruppe zu einem Anstieg der positiv-reagierenden Zellen. Unter dem Einfluss von Valproinsäure war dieser Anstieg von 20% auf 60% Zellen am ausgeprägtesten. Mevinolin zeigte dagegen ein drastisches Absinken der Pendrin-positiven Zellen von 60% auf 10%. (Abb. 23)

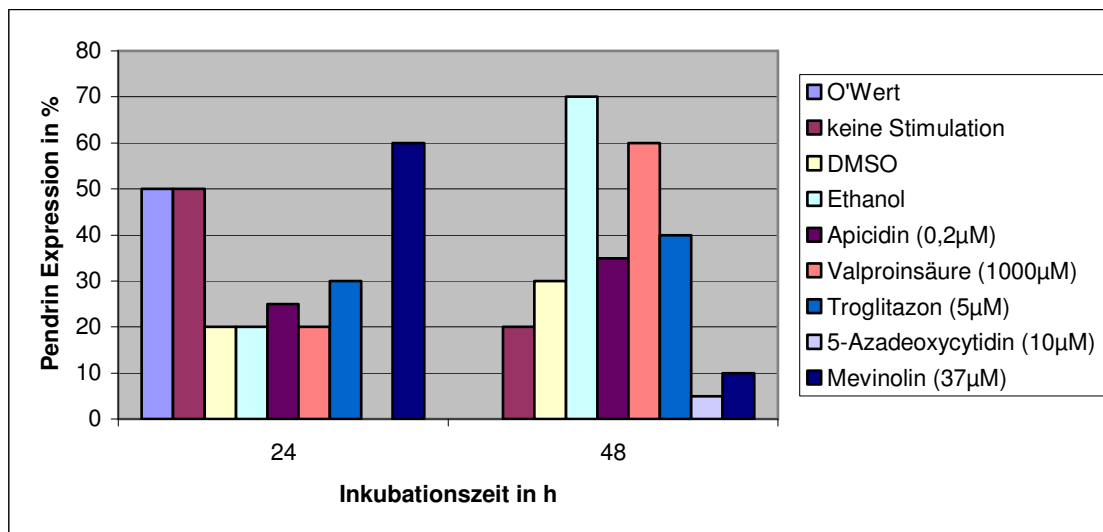


Abbildung 23: Einfluss von Apicidin (0,2 µM), Valproinsäure (1mM), Troglitazon (5 µM), 5-Aza-deoxycytidin (10 µM) und Mevinolin (37 µM) auf die Pendrin-Expression nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.22 Anhang)

Ebenfalls wurde in dieser Versuchsreihe zusätzlich die ^{125}I -Iodidaufnahme und ^3H -Thymidinaufnahme bestimmt. Alle Schilddrüsenzellen entstammten einer Population.

Als Kontrollgruppe hierfür dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, welche mit dem Lösungsmittel versetzt wurden. Die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymidineinbauraten in die Thyreozyten wurde nach 24 und 48 Stunden gemessen.

^{125}I -Iodidaufnahme: Abbildung 24 zeigt, dass es nach einer 24-stündigen Inkubationszeit unter der Wirkung Troglitazon und 5-Azadeoxycytidin zu leicht erniedrigten ^{125}I -Iodideinbauraten kam. Valproinsäure und Mevinolin zeigten leicht erhöhte Einbauraten. Allerdings waren keine der gemessenen Werte als statistisch signifikant gewertet worden. Nach 48 Stunden kam es insgesamt zu erhöhten ^{125}I -Iodideinbauraten im Vergleich zur Kontrolle, allerdings waren auch hier keine der gemessenen Werte statistisch signifikant.

^3H -Thymidinaufnahme: Abbildung 25 zeigt, dass es unter Apicidin, Troglitazon und 5-Azadeoxycytidin nach einer 24-stündigen Inkubation zu einem signifikanten Anstieg der ^3H -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten im Vergleich zur Kontrolle kam. Nach 48 Stunden zeigte sich unter 5-Azadeoxycytidin erneut ein signifikanter Anstieg der ^3H -Thymidininkorporation. Im Vergleich zu 24

Stunden war dieser Anstieg gegenüber der Kontrolle um 50% erhöht. Unter Valproinsäure kam es nach 48 Stunden ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der ^3H -Thymidinaufnahme. Unter Apicidin kam es nach 48 Stunden im Vergleich zum Wert nach 24 Stunden zwar zu einem leichten Rückgang der absoluten ^3H -Thymidinspeicherungen, jedoch war im Vergleich zur Kontrolle die Aufnahmerate weiterhin signifikant erhöht.

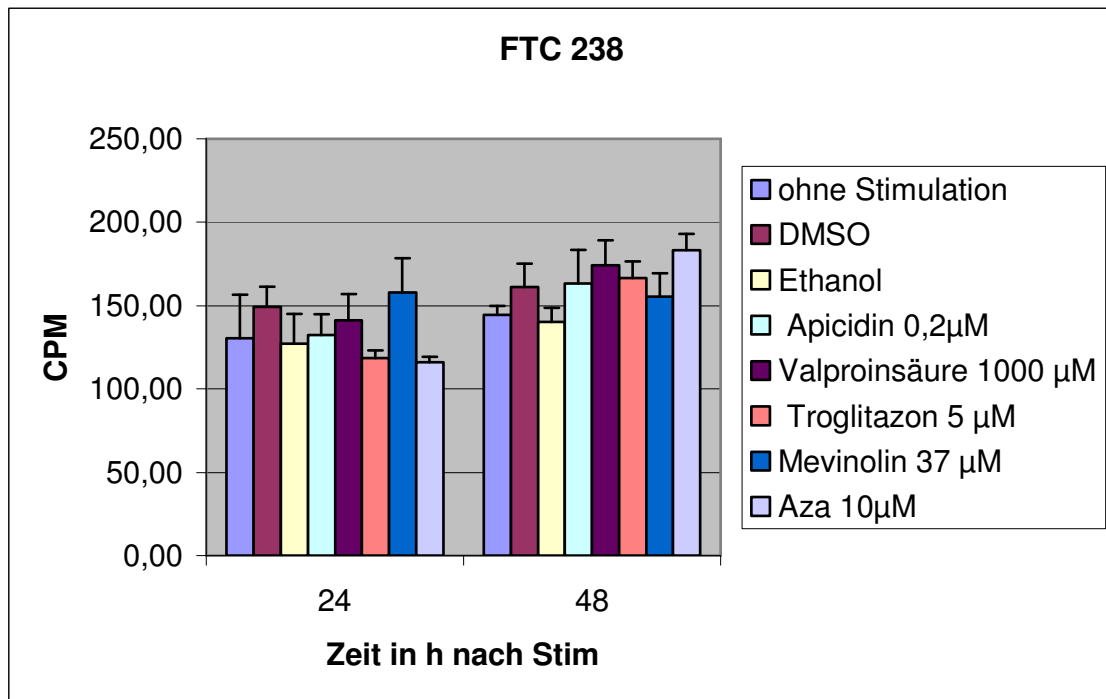


Abb.24: Einfluss von Apicidin (0,2 µM), Valproinsäure (1000 µM), Troglitazon (5 µM), 5-Aza-deoxycytidin (10 µM) und Mevinolin (37 µM) auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^{125}I -Iodidzugabe (4kBq). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 24h und 48h Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.41-46 im Anhang)

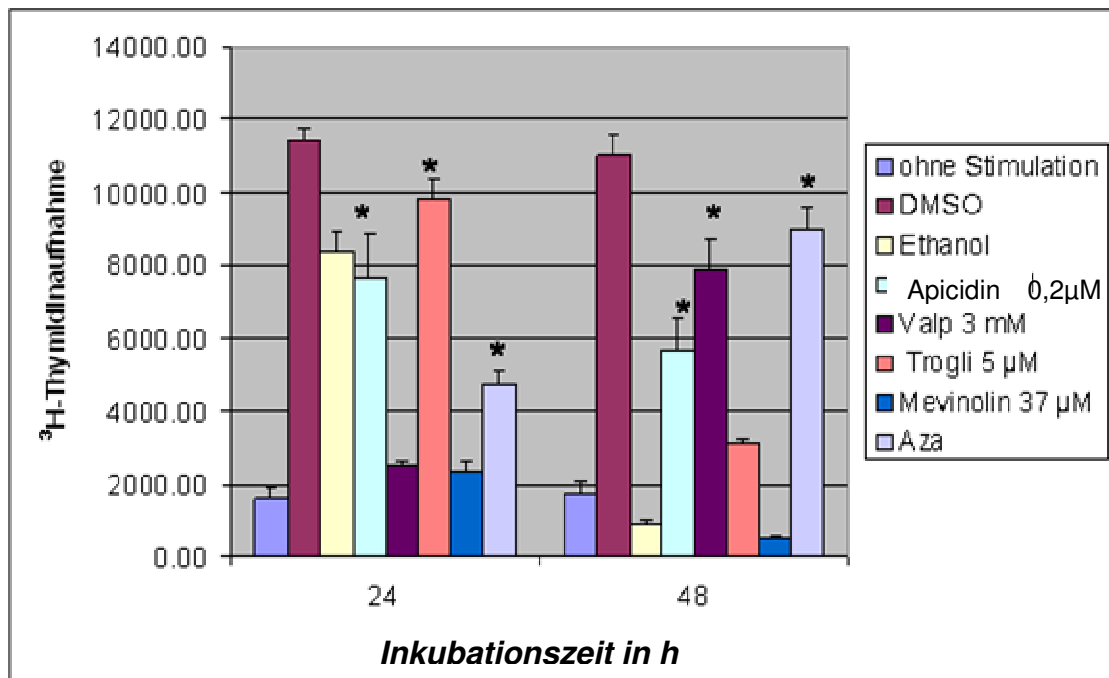


Abb.25: Einfluss von Apicidin (0,2 µM), Valproinsäure (1000 µM), Troglitazon (5 µM), 5-Aza-deoxycytidin (10 µM) und Mevinolin (37 µM) auf die ³H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane maligne Thyreozyten (FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 µl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ³H-Thymidinzugabe (6kBq). Die ³H-Thymidinaufnahme wurde nach 24 und 48h Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Signifikante Werte sind mit einem Stern (*) gekennzeichnet. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.47-54 im Anhang)

4.2.3 Einfluss von Akt-Inhibitor I und V mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid und von APHA Compound 8 auf: a) die Apoptose und b) die NIS- und-Pendrin Expression in humanen Thyreozyten

Bei Aussaat der humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 wurden folgende Substanzen hinzugefügt:

- Akt-Inhibitor I (20 μ M)
- Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M)
- Akt-Inhibitor V (20 μ M)
- Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M)
- Arsentrioxid (2 μ M)
- APHA Compound 8 (5 μ M) o

Angegeben sind die Endkonzentrationen. Lösungsmittel für alle Substanzen war DMSO.

a) Apoptoserate: Nach einer 24 und 48-stündigen Inkubationszeit wurde der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen mit Hilfe eines Durchfluss-Zytometers bestimmt. Als Kontrollgruppe zur Bestimmung der Apoptoseraten dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, welche mit dem Lösungsmittel versetzt wurden. Als zusätzliche Kontrollgruppe diente Staurosporin und H₂O₂.

Nach 24 Stunden Inkubation wurde unter dem Einfluss aller untersuchten Substanzen erhöhte Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Besonders hervorzuheben sind AKT-Inhibitor I und V mit und ohne zusätzlicher Stimulation mit Arsentrioxid. Hier waren die Apoptoseraten bis um das dreifache gegenüber dem Kontrollwert erhöht. Leicht erhöhte, dennoch analoge Ergebnisse im Vergleich zu 24 Stunden fanden sich bei der Messung der Apoptoserate nach 48 Stunden. Ergebnisse siehe Abb. 26.

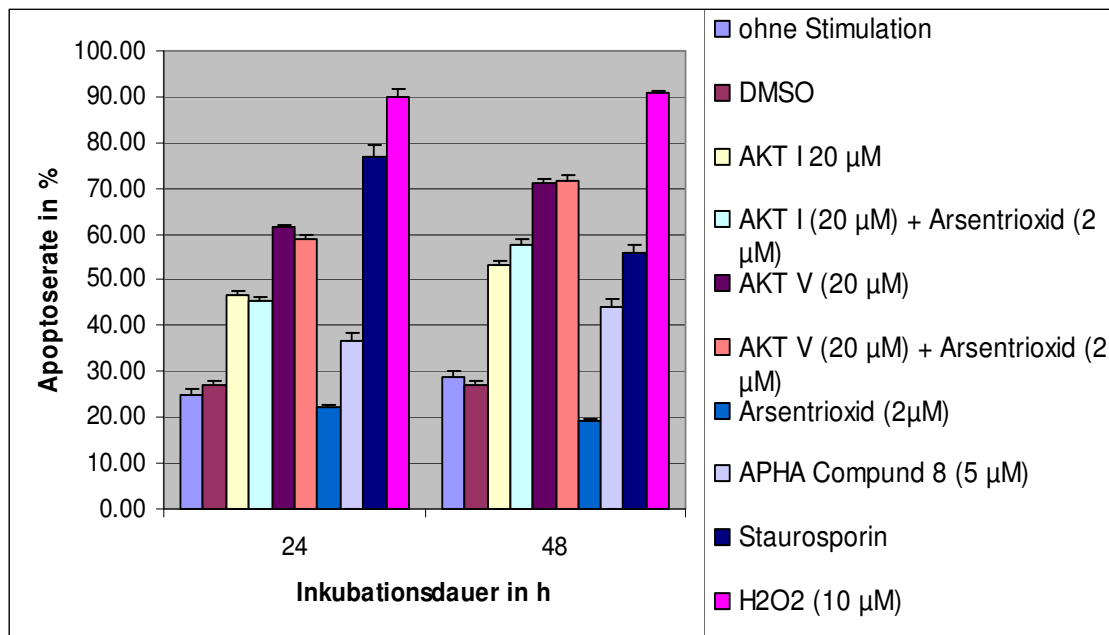


Abb.26: Einfluss von APHA, von 2 µM Arsentrioxid und von Akt Inhibitor I und V mit und ohne gleichzeitigem Zusatz von 2 µM Arsentrioxid, auf die Apoptoserate der Zellkulturen der Zelllinie FTC 238. Zugabe der Stimulanzen erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. Gemessen wurde die Apoptoserate nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte angegeben in Prozent, n=3. Als Kontrollgruppen dienen. Unstimulierte Thyreozyten, sowie Thyreozyten stimuliert mit dem Lösungsmittel DMSO und als Positiv-Kontrolle mit Staurosporin stimulierte Thyreozyten. (zugehörige Zahlenwerte in Tab. 23 u. 24 im Anhang)

b) NIS- und Pendrin-Expression: Als Kontrollgruppe für den zytochemischen Nachweis von NIS- und Pendrin dienten unstimulierte und mit dem Lösungsmitteln DMSO und Ethanol stimulierte Zellen. Als Positiv-Kontrolle wurden unstimulierte Thyreozyten, welche zum Zeitpunkt der Aussaat auf die Objektträger gegeben wurden, verwendet (Nullwert). Fiel diese Qualitätskontrolle positiv aus, konnte der Versuch interpretiert werden.

NIS Expression: Nach 24-stündiger Inkubation fand sich unter allen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelten Thyreozyten ein Anstieg der NIS-Expression. Der höchste Anstieg wurde unter der Wirkung von AKT Inhibitor V mit 50% gemessen. 40% positive Zellen wurden unter AKT Inhibitor V + Arsentrioxid und unter Arsentrioxid gemessen. Ein Anteil von 30% NIS-exprimierender Thyreozyten wurde unter Behandlung mit AKT Inhibitor I + Arsentrioxid und APHA festgestellt. Analoge Ergebnisse fanden sich bei Auswertung der NIS-Expression nach 48 Stunden. Ergebnisse siehe Abb. 27.

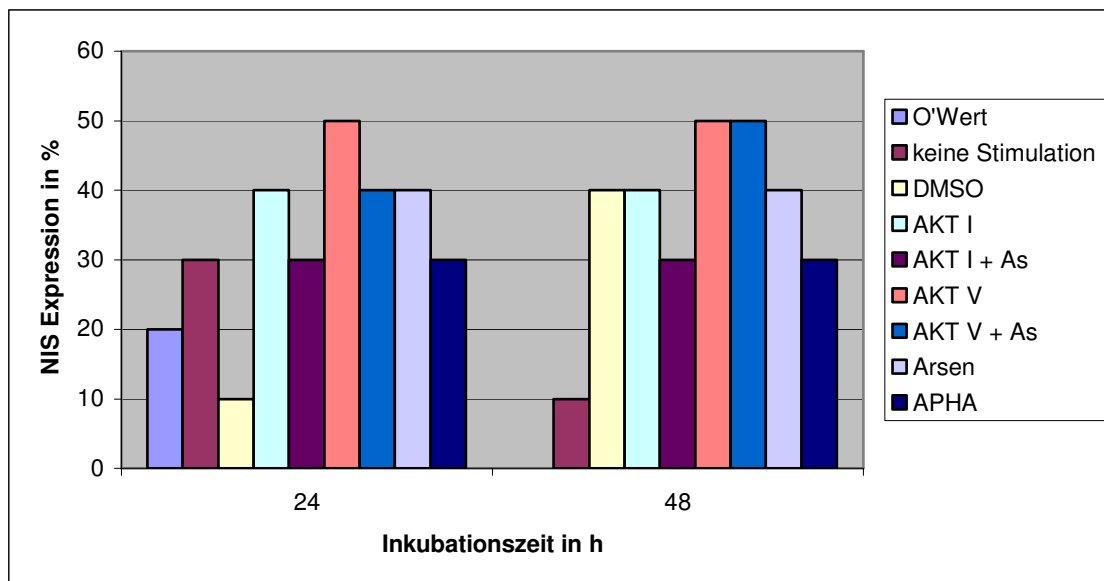


Abbildung 27: Einfluss von APHA, von Arsentrioxid 2 μ M und von Akt Inhibitor I und V mit und ohne zusätzlichem mit Arsentrioxid und von 2 μ M Arsentrioxid allein auf die Expression des NIS-Symporters nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.25 im Anhang)

Pendrin Expression: In Abb. 28 zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation ein Anstieg der Pendrin Expression unter allen Thyreozyten, die bei Aussaat mit den zu untersuchenden Stimulanzen behandelt wurden. Nach 48 Stunden fand sich eine Erhöhung der Pendrin Expression nur noch unter den mit AKT Inhibitor I + Arsentrioxid behandelten Zellen. Bei AKT-Inhibitor V und Arsentrioxid kam es zwar zu einer 10%igen Erhöhung der Pendrin-Expression, dennoch hoben sich diese Werte nicht von den Werten der Kontrollgruppe ab. Unter der Wirkung von APHA kam es nach 48 Stunden zu einem Rückgang der Pendrin-exprimierenden Zellen auf 10%.

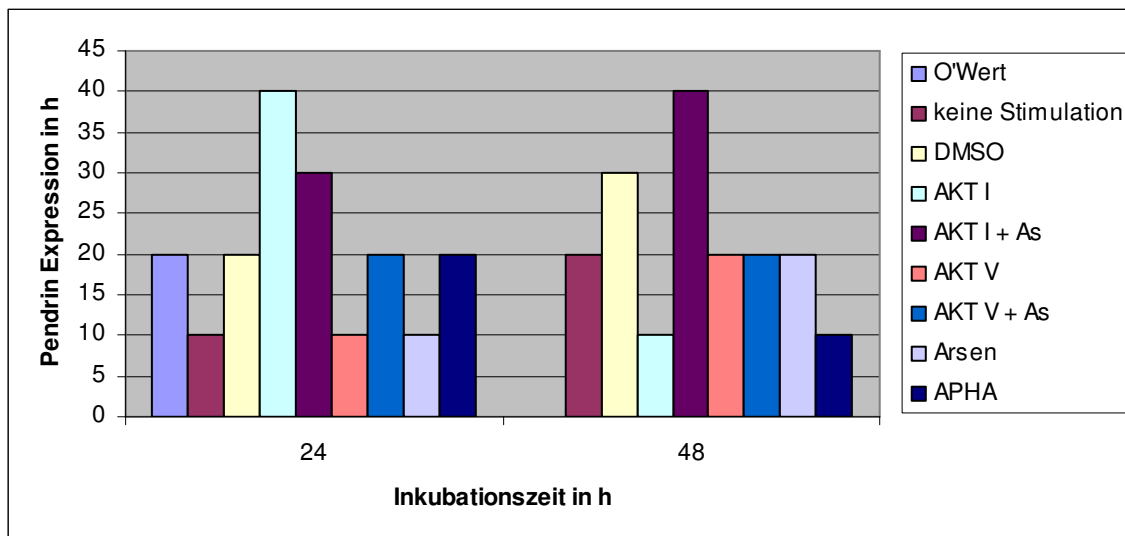


Abbildung 28: Einfluss von APHA, von Arsentrioxid 2 μM und von Akt Inhibitor I und V mit und ohne zusätzlichem mit Arsentrioxid und von 2 μM Arsentrioxid allein auf die Expression von Pendrin nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden. Die Stimulation erfolgte zum Zeitpunkt der Aussaat. (zugehörige Zahlenwerte in Tab.26 im Anhang)

Zusätzlich zur Apoptoserate und NIS und Pendrin Expression wurde die ^{125}I -Iodidaufnahme, sowie die ^3H -Thymidinaufnahme bestimmt. Alle Schilddrüsenzellen entstammten einer Population.

Als Kontrollgruppe hierfür dienten Thyreozyten ohne jegliche Stimulation und Thyreozyten, denen bei Aussaat nur das Lösungsmittel zugegeben wurde. Die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymidinaufnahme in die Thyreozyten wurde nach 5, 22, 42 und 46 Stunden gemessen.

^{125}I -Iodidaufnahme: Abbildung 29 zeigt, dass zu keiner der vier gemessenen Inkubationszeiten ein signifikanter Anstieg der ^{125}I -Iodidinkorporation im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen wurde.

^3H -Thymidinaufnahme: Nach 5-stündiger Inkubation wurde unter dem Einfluss von AKT Inhibitor I, AKT Inhibitor V + Arsentrioxid und APHA eine statistisch signifikant erniedrigte ^3H -Thymidininkorporation gemessen. Nach 22 Stunden kam es in der Kontrollgruppe zu einem markanten Anstieg der ^3H -Thymidinaufnahme. Im Vergleich dazu wurde unter AKT Inhibitor I und V mit und ohne gleichzeitige Stimulation mit Arsentrioxid, sowie unter APHA ein signifikanter Rückgang der ^3H -Thymidininaufnahme gemessen. Insgesamt war die Thymidininkorporation nach 22h gegenüber den Vorwerten nach 5 Stunden aber deutlich erhöht. Nach einer 42-stündigen Inkubation fand sich ein

signifikanter Anstieg der ^3H -Thymidineinbauraten nur noch unter Arsentrioxid. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt.

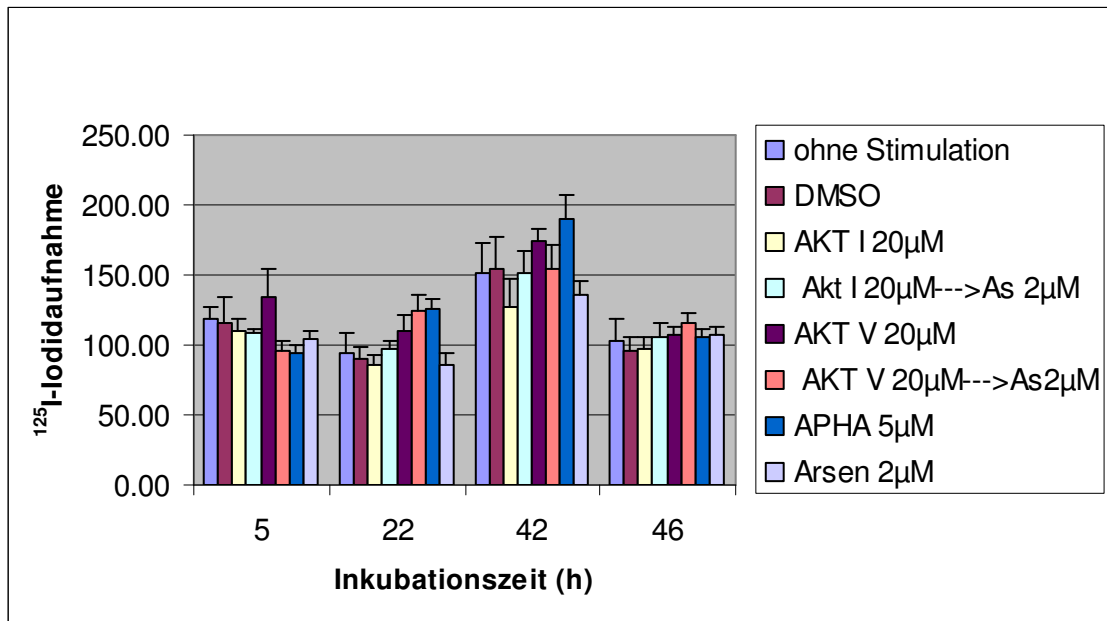


Abb.29: Einfluss von APHA, von Akt Inhibitor I und V mit und ohne zusätzlichem Arsentrioxid und von 2 μM Arsentrioxid allein auf die ^{125}I -Iodidinkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 48-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 130000 Zellen/ 200 μl Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die ^{125}I -Iodidzugabe (4kBq). Die ^{125}I -Iodidaufnahme wurde nach 5h, 22h, 42h und 46h Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=6. Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet. (zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.55-66 im Anhang)

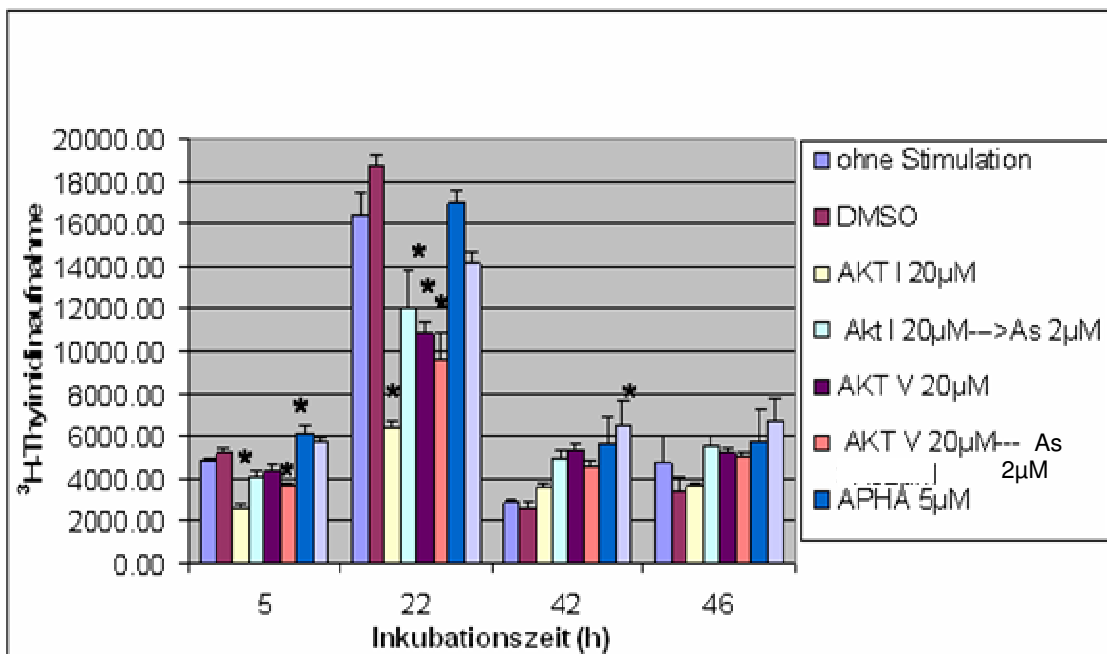


Abb.30: Einfluss von APHA, von Akt Inhibitor I und V mit und ohne zusätzlichem Arsentrioxid und von 2 μ M Arsentrioxid allein auf die 3 H-Thymidinaufnahme in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238). Die Zugabe der Substanzen erfolgte bei der Aussaat in 96-well-Platten. Pro Kulturloch wurden 65000 Zellen/ 100 μ l Medium eingesetzt. Direkt nach der Aussaat erfolgte die 3 H-Thymidinzugabe (6kBq). Die 3 H-Thymidinaufnahme wurde nach 5h, 22h, 42h und 46h Inkubationsdauer gemessen. Dargestellt sind Mittelwert und SEM, n=8. Signifikante Werte sind mit einem * gekennzeichnet. (zugehörige Zahlenwerte und Statistik in Tab.67-81 im Anhang)

4.3 Nachweis von NIS-Sympporter und Pendrin-Transporter mittels Westernblot

Westernblots zum Nachweis des NIS-Sympporters und des Transporterproteins Pendrin in die Thyreozyten wurden unter dem Einfluss aller vorne genannten Substanzen durchgeführt. Hierfür wurden die kultivierten malignen Thyreozyten mit den Substanzen 24 oder 48h lang inkubiert. Verwertbare Ergebnisse konnten nur bei der Bestimmung des NIS-Sympporters nach 24 h unter Akt-Inhibitor I (20 μ M), Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M), Akt-Inhibitor V (20 μ M), Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M), Arsentrioxid (2 μ M), APHA Compound 8 (5 μ M), erzielt werden. Die Veränderungen in den Westernblots unter dem Einfluss der verschiedenen Substanzen wurden visuell beurteilt.

Zu einer Bandenbildung bei 80-90 kDalton (NIS) kam es lediglich unter Akt-Inhibitor I (20 μ M), Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M), Akt-Inhibitor V (20 μ M), Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M), Arsentrioxid (2 μ M) und APHA Compound 8 (5 μ M). Die beobachteten Anstiege in der Bandenintensität stehen im Einklang mit den immunzytochemischen Daten.

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

Zuordnung der eingesetzten Substanzen:

- 1 Ohne Stimulation
- 2 DMSO
- 3 Akt-Inhibitor I (20 μ M)
- 4 Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M)
- 5 Akt-Inhibitor V (20 μ M)
- 6 Akt-Inhibitor (20 μ M) + Arsentrioxid (2 μ M),

- 7 Arsentrioxid (2 μM)
- 8 APHA Compound 8 (5 μM)

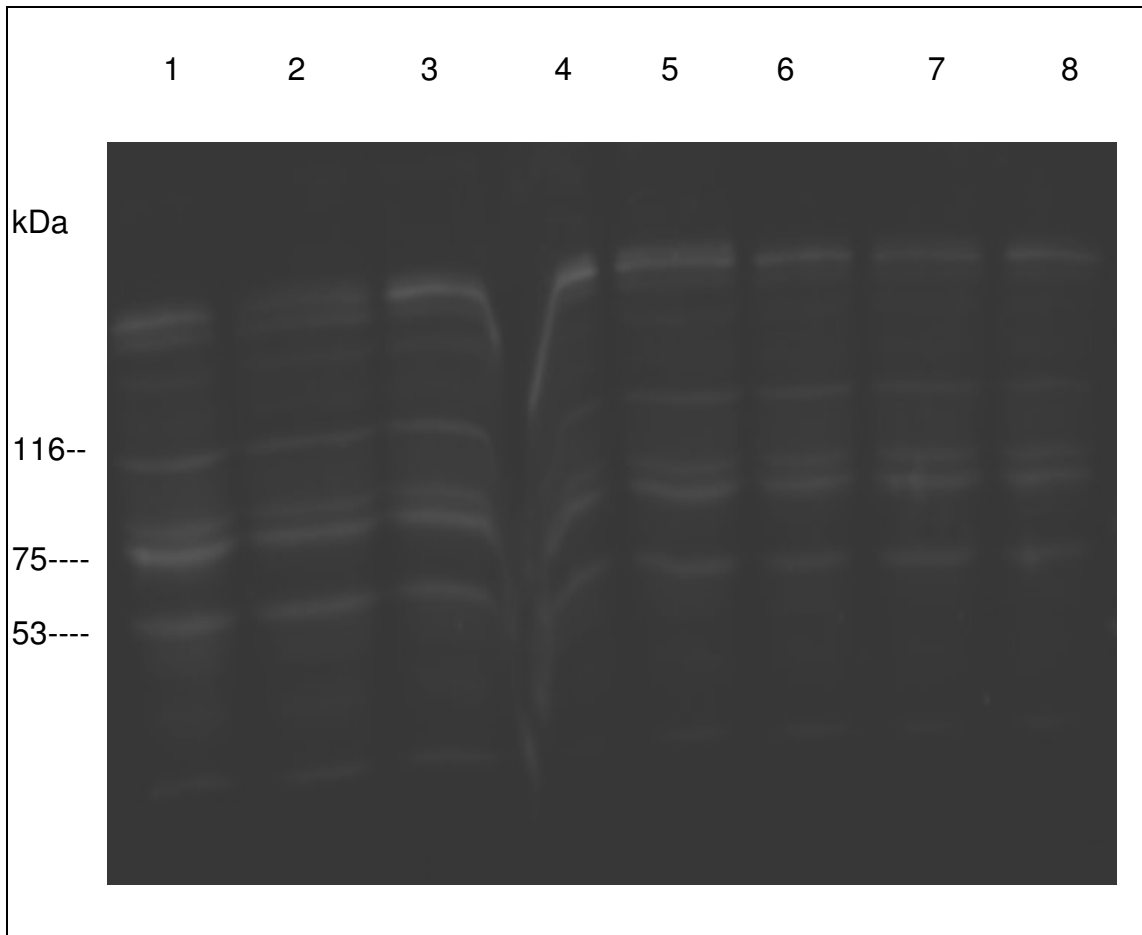


Abb. 31: Einfluss von Akt-Inhibitor I (20 μM), von Akt-Inhibitor (20 μM) + Arsentrioxid (2 μM), Akt-Inhibitor V (20 μM), von Akt-Inhibitor (20 μM) + Arsentrioxid (2 μM), von Arsentrioxid (2 μM) und von APHA Compound 8 (5 μM) auf die Expression des NIS-Proteins bei kultivierten kanzerogenen humanen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 nach einer Inkubationsdauer von 24 Stunden. Zugabe der Stimulanzen beim Aussäen. Darstellung von Blots einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels ECL-Entwicklung. Es wurde jeweils 30 μg 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 Transferrin (76 kDa) mit.

5. Diskussion

5.1 Methoden

Die in dieser Studie verwendeten humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 stammen aus einer Lungenmetase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms eines 42-jährigen männlichen Patienten. Zur Kultivierung wurde das Medium DMEM/NUT.MIX.F-12 mit Glutamax-1 verwendet. Zur Optimierung der Wachstumsbedingungen wurde den Zellen fetales Rinderserum zugefügt und in engen regelmässigen Abständen das Kulturmedium gewechselt. Mycoplasmen-Kontaminationen wurden durch einen Mycoplasmen-Test ausgeschlossen. Eine Verfälschung der Thymidinaufnahme in die Thyreozyten durch Mykoplasmen ist somit wenig wahrscheinlich. Außerdem werden Mycoplasmen nicht durch die für die Zellernte verwendeten Glasfiltermatten zurückgehalten.

In- vitro Versuche an humanen cancerogenen Zelllinien bieten den Vorteil, dass es sich bei der Zellkultivierung um Klone einer Zelllinie handelt und die Zellen damit ein identisches Erbgut besitzen. Versuchsergebnisse sind reproduzierbar und zuverlässiger. Dennoch altern die Zellen im Laufe der Kultivierung und können somit nachteilig Untersuchungsergebnisse beeinträchtigen. Zudem haben in-vitro-Studien an Zelllinien den Nachteil, dass die verwendeten Zellen im Vergleich zu Primärkulturen weniger in-vivo-Eigenschaften besitzen und sich daher die gewonnenen Erkenntnisse nicht immer direkt auf die in-vivo-Verhältnisse übertragen lassen.

Als Parameter für eine Redifferenzierung der Zellen wurde die Iodidaufnahme gemessen. Indirekt kontrolliert wurde damit eine verstärkte NIS-Aktivität und/oder NIS-Expression. Die Messung der Expression von NIS erfolgte über den immunzytochemischen Nachweis und die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Western Blot). Die Pendrin-Expression wurde ebenfalls immunzytochemisch und über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfasst.

Die Zellproliferation wurde anhand der ³H-Thymidinaufnahme verfolgt. Da Thymidin nicht immer direkt in die DNA eingebaut wird und ein Anteil der

verabreichten Thymidinkonzentration im Zytosol verweilen kann, ist die ^3H -Thymidinaufnahme für den Nachweis der Zellproliferation möglicherweise nicht ausreichend spezifisch. Die Apoptose wurde mit Hilfe der FACS-Analyse anhand des Anteils hypodiploider Kerne bestimmt.

5.2 Wirkung von Retinoiden auf die Apoptose, die Proliferation und den Iodidstoffwechsel der humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC- 238

Karzinogene Thyreozyten haben die Fähigkeit zur Iodidaufnahme meistens verloren (Klutmann et al, 2001). Dadurch wird eine Ausschaltung von Restschilddrüsengewebe nach der Operation und eine Zerstörung nicht operabler Resttumoren und Metastasen mittels Radioiodtherapie erschwert (Reinwein, 1993; Kumar et al., 2003). Die Suche nach Maßnahmen zur Wiederherstellung der Radioiodaufnahme in diese Malignomzellen ist daher naheliegend. Die Induktion der Redifferenzierung der Zellen von Schilddrüsenkarzinomen könnte somit die Therapiemöglichkeiten und Heilungschancen dieser Malignome merklich verbessern. Substanzen, die dieses Potential besitzen, sind z.B. Retinoide (Simon et al, 2002). Ihre Wirksamkeit entfalten Retinoide über nukleäre Rezeptoren, die zur Superfamilie der Steroid-Thyreoidea-Hormonrezeptoren gehören. Zurzeit sind sechs unterschiedliche Retinsäurerezeptoren identifiziert. Sie werden in die Unterklassen RAR- und RXR-Rezeptoren, jeweils mit den Subtypen α , $-\beta$, und γ , eingeteilt (Baron et al, 2008). Die Verteilung dieser Rezeptoren im Gewebe, ihre Affinität zu den verschiedenen Liganden und ihre intrazelluläre Wirkung ist unterschiedlich. In Schilddrüsenkarzinomen werden alle Retinoidrezeptoren exprimiert (Schmutzler et al., 1998). Sie bilden somit die Grundlage für eine Redifferenzierungstherapie.

Untersucht wurden all-trans-, 9-cis- und 13-cis-Retinsäure in den Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM und 2 μM , sowie all-trans- und 13-cis-Retinol in den Konzentrationen 1,6 μM , 3,2 μM und 13 μM .

Unter all-trans-Retinsäure kam es in den humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238 lediglich zu einer leicht gesteigerten Iodidaufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Die höchste Iodeinbaurate wurde nach 24,5 Stunden unter 1 μM all-trans-Retinsäure gemessen. Die NIS-Expression (10 %) nach 24h war im Vergleich zur Kontrolle (20%) jedoch erniedrigt. Nach 48h stieg sie um das 6-fache auf 60% an, überstieg das Ergebnis der Kontrolle (60%) aber nicht. Diese Diskrepanz zwischen gesteigerter Iodidaufnahme und nicht vermehrter NIS-Expression nach 24h ist höchstwahrscheinlich auf methodische Probleme bei der Bestimmung der NIS-Expression zurückzuführen. Die Pendrin-Expression war nach 24h unter all-trans-Retinsäure (5%) im Vergleich zur Kontrolle (20%) ebenfalls erniedrigt, stieg aber nach 48h um das 8-fache auf 40%, während die entsprechende Expression bei der Kontrolle bei 10% lag. Nach 48h stehen die Ergebnisse der NIS- und Pendrin-Expression durchaus in Einklang mit der zugehörigen Iodideinbaurate. Schmutzler et al. (1997) konnten in den follikulären cancerogenen Thyreozyten der Zelllinien FTC-238 und FTC-133 gesteigerte NIS-mRNA-Spiegel unter 1 μM all-trans-Retinsäure nachweisen und die entsprechende Proteinexpression im Western Blot bestätigen. Da die Thyreozyten aber dennoch kein Iodid akkumuliert haben, war der Symporter NIS möglicherweise noch nicht in der Membran, dem eigentlichen Wirkort, sondern noch im Zytoplasma lokalisiert. In den eigenen Untersuchungen stieg die ^3H -Thymidinaufnahme sowohl bei den unbehandelten, als auch bei den mit all-trans-Retinsäure (0,5 μM , 1 μM , 2 μM) stimulierten Thyreozyten im Verlauf der Inkubationszeit graduell an. Unter 0,5 μM all-trans-Retinsäure kam es dabei zu der höchsten, und unter 1 μM all-trans-Retinsäure zur niedrigsten ^3H -Thymidinaufnahme im Vergleich zur Kontrolle. Schmutzler et al. (2004) beschreiben unter dem Einfluss von all-trans-Retinsäure eine erniedrigte Proliferation bei den Zelllinien FTC-133 und FTC-238. Die mit all-trans-Retinsäure vorbehandelten Thyreozyten der Zelllinie FTC-133 und FTC-238 zeigten im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe auch ein reduziertes Tumorwachstum in Xenotransplantations-Experimenten. Das reduzierte Tumorwachstum war in der Zelllinie FTC-238 jedoch weniger ausgeprägt, was auf eine verminderte Expression von RAR zurückzuführen

war. Die Autoren folgerten aus diesen Untersuchungsergebnissen, dass der Erfolg der Retinoid-Therapie bei follikulären Schilddrüsenkarzinomen von der Expression der Retinsäure-Rezeptoren RAR in den Thyreozyten abhängig ist. Die Apoptoserate war in der eigenen Zelllinie unter all-trans-Retinsäure nach 24 Stunden im Vergleich zur Kontrolle (5 %) nur leicht gesteigert und erreichte 10%. Nach 48 Stunden wurde zwischen den Zellen der Kontrolle und den behandelten Zellen kein Unterschied mehr gesehen.

Unter 9-cis-Retinsäure (1 und 2 μM) zeigte sich nach 5,5h Inkubation ein signifikanter Anstieg der Iodidaufnahme. Nach 18.5h war die Iodidaufnahme sowohl unter 9-cis als auch unter 13-cis-Retinsäure signifikant erhöht. Parallel hierzu war nach 24h die Zahl der NIS-exprimierenden Zellen sowohl unter 9-cis (60%)- als auch 13-cis-Retinsäure (80%) im Vergleich zur Kontrolle (20%) erhöht. Coehlo et al. (2003) konnten in einer klinischen Studie unter 13-cis-Retinsäure die Induktion einer Redifferenzierung sogar in vivo nachweisen. Bei einer Patientin, welche an einem follikulären Schilddrüsenkarzinom erkrankt war, konnte nach 5-wöchiger Gabe von 13-cis-Retinsäure eine erhöhte Iodidaufnahme in eine zuvor therapierefraktäre Lungenmetastase festgestellt werden. In den eigenen Zellen fand sich sowohl unter 9-cis- als auch unter 13-cis- Retinsäure nach 24h noch eine erniedrigte Pendrin-Expression (7.5%), während nach 48 Stunden die Anzahl Pendrin-exprimierender Zellen auf 25% (Kontrolle 10%) anstieg. Die ^3H -Thymidinaufnahme war ähnlich wie unter dem Einfluss von all-trans-Retinsäure auch unter 9-cis- und 13-cis Retinsäure gesteigert. Der mittels FACS-Analyse erfasste Verlauf der Apoptose in den Thyreozyten deckte sich unter dem Einfluß von 9-cis- und 13-cis- Retinsäure ebenfalls mit jenem unter all-trans-Retinsäure. Nach 24h waren die Apoptoseraten im Vergleich zur Kontrolle (5%) nur leicht erhöht (10%), nach 48 Stunden fand sich dagegen kein Unterschied mehr.

Bei den mit 13-cis-Retinol behandelten Zellen der Zelllinie FTC-238 konnte nach 30,5 Stunden bei allen getesteten Konzentrationen eine signifikant gesteigerte ^{125}I -Iodidaufnahme nachgewiesen werden, welche auf die Re-

Expression von NIS zurückzuführen ist. Parallel hierzu und zugleich als Erklärung für die verstärkte Iodid-Inkorporation kam es nämlich zwischen 24 und 48 Stunden zu einer Steigerung der NIS-Expression von 20 auf 90 %. Auch die Pendrin-Expression war sowohl nach 24h als auch nach 48h im Vergleich zur Kontrolle deutlich erhöht. Des Weiteren führte die Behandlung der Zellen mit 13-cis-Retinol (3,2 μ M, 6,5 μ M) zwischen 24 und 48 Stunden zu einer teils signifikant erniedrigten 3 H-Thymidinaufnahme und damit zu einer verminderten Proliferation.

Unter all-trans-Retinol war die 125 I-Iodidaufnahme im allgemeinen nur gering erhöht. Die einzig signifikant erhöhte Iodidaufnahme wurde unter der Konzentration 13 μ M nach 24h gemessen. Dies deckt sich jedoch nur teilweise mit den Ergebnissen der Immunzytochemie. Nach 24h kam es hier zu keinem Anstieg der NIS-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (20%). Dieses Ergebnis könnte auf Fehler in der Durchführung der Immunzytochemie zurückzuführen sein. Die Pendrin-Expression war nach 24h im Vergleich zur Kontrolle (5%) mit 35% dagegen erhöht. Unter all-trans-Retinol wurde nach anfangs erhöhter 3 H-Thymidin-Aufnahme nach 30.5h eine signifikant erniedrigte Thymidin-Inkorporation beobachtet. Bei unseren Untersuchungen konnte sowohl unter all-trans- als auch unter 13-cis-Retinol (3,2 μ M) keine erhöhte Apoptoserate festgestellt werden.

Allen untersuchten Retinoiden war gemeinsam, dass sie nach 48 Stunden Inkubation eine verstärkte Expression des NIS-Proteins induzierten. Die 125 I-Iodidaufnahme war dennoch nur unter 9-cis- und 13-cis-Retinsäure, sowie 13-cis Retinol erhöht. Die Gründe hierfür sind unklar. Möglicherweise war das NIS-Protein nicht oder nicht optimal in der Zellmembran lokalisiert. Nur 13-cis-Retinol (3,2 μ M) zeigte eine erhöhte 125 I-Iodidaufnahme mit erhöhter NIS- und Pendrin-Expression und gleichzeitig erniedrigter Proliferation. Allen Retinoiden war gemeinsam, dass es darunter zu keiner erhöhten Apoptose der Thyreozyten kam. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen von Iwata et al. (1992). Die Autoren zeigten in ihren Untersuchungen an Thymozyten, dass all-trans-Retinsäure selbst kaum Apoptose induziert, allerdings indirekt Einfluss auf die Glukokortikoid-induzierte Apoptose nimmt. Fröhlich et al. (1999) konnten

dagegen einen apoptoseinduzierenden Effekt von all-trans-Retinol an kultivierten Schweinethyreozyten nachweisen. Offensichtlich machen sich hier die Speziesunterschiede bemerkbar.

5.3 Wirkung von 5-Aza-2'-Deoxycytidin auf die Apoptose, die Proliferation und den Iodidstoffwechsel der humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 238

Die demethylierenden Substanzen 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabin) sind Pyrimidinabkömmlinge, die in nicht-zytotoxischen Konzentrationen zu einer Hemmung der DNA-Methyltransferase führen und in vitro eine Differenzierung myeloischer Zellen induzieren. Diese Zytostatika wurden bei Myelodysplastischen Syndrom (MDS) -Patienten eingesetzt, um die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die zu einem Proliferationsvorteil des aberranten Klons führen, rückgängig zu machen (epigenetische Therapie). Beide Substanzen wurden erfolgreich in einer Phase III-Studie bei Patienten mit fortgeschrittenem MDS, die nicht für eine intensive Chemotherapie in Betracht kamen, getestet. Im Vergleich zur supportiven Therapie führten sie zu einer Verlängerung der Zeit bis zur Transformation in eine AML oder zum Tod (Silvermann et al. 2002, Wijermans et al. 2000). Die therapeutische Wirkung von 5-Aza-2'-Deoxycytidin wurde an verschiedenen weiteren kultivierten malignen Zelllinien (z.B. Brust-, Ösophaguskarzinomzelllinie), Tiermodellen, aber auch an Patienten (Leukämie) getestet (Mompalmer, 2005; Wozniak, 2006; Liu et al, 2005). Des Weiteren wurde auch eine Wachstumshemmung bei malignen Brustkrebszelllinien beobachtet (Liu et al, 2005).

In unseren Untersuchungen an den humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 238 konnte unter 5-Aza-2'-Deoxycytidin nach 6, 18 und 48 Stunden eine signifikant erhöhte ¹²⁵I-Iodideinbaurate gemessen werden. Nach 24 h kam es in dieser Versuchsserie dagegen nur zu einer NIS Expression von 10 % und nach 48 h von gerade 5 %. Die zytochemisch erfasste NIS-Expression steht damit im Widerspruch zur gesteigerten Iodidaufnahme. Ursache hierfür dürfte am ehesten ein Fehler bei der Immunzytochemie sein. Die Proliferationsraten waren über 48 Stunden unter 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5

μM , 10 μM) gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht. Die Ergebnisse der Facs-Analyse zeigten unter dem Einfluss von 5-Aza-2'-Deoxycytidin gegenüber der Kontrolle (10%) keine Erhöhung der Apoptose der Zellen .

5.4 Wirkung von Mevinolin auf die Apoptose, die Proliferation und den Lipidstoffwechsel der humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC-238

In mehreren klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA)-Reduktase-Inhibitoren zu denen auch Mevinolin gehört, die Morbiditäts- und Mortalitätsrate von kardiovaskulären Erkrankungen reduzieren (Scandinavian Simvastatin Survival Study Group, 1994). Durch eine reduzierte Produktion von LDL-Proteinen (Low density lipoproteins) in der Leber regulieren sie den Cholesterinhaushalt und wirken somit cholesterinsenkend. Unabhängig von diesem Wirkprofil auf den Lipidstoffwechsel zeigten sie einen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von kultivierten malignen Zellen. Dieser Effekt beruht auf der Fähigkeit der Substanz die Isoprenylation von Proteinen, eingeschlossen der Ras-, Rho- und Rac-Proteine zu verhindern (Goldstein IJ et al., 1990; Fisher JE et al., 1999; Cox AD et al., 1997). Letztere gehören zur Gruppe der kleinen G-Proteine, einer Untergruppe der G-Proteine, welche eine Schlüsselposition in der Signaltransduktion zwischen Rezeptor und Second-Messenger-Systemen einnehmen und somit auch bei der Krebsentstehung von Bedeutung sind. Der proliferationsreduzierende Effekt, sowie der Apoptose-induzierende Einfluss von Mevinolin konnte bei Leukämie, bei Darmkrebs und in Brustkrebsszelllinien nachgewiesen werden (Park et al., 1999; Agarwal et al. 1998; Gray-Bablin et al. 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass Lovastatin und andere HMG-CoA-Reduktase-Hemmer einen redifferenzierungssteigernden Effekt in menschlichen monozytären Zellen, neuroektodermalen Sarkomzellen und Osteoblasten besitzen (Weber et al, 1995; Kim et al., 2000; Maeda et al, 2001).

In unseren Untersuchungen kam es in den Zellen der Zelllinie FTC 238 unter Mevinolin zu einer signifikanten Steigerung der ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6, 30 und 42 Stunden Inkubationszeit. Die immunzytochemischen Untersuchungen ergaben nach 48 Stunden eine erhöhte Anzahl NIS-exprimierender Zellen (20%) im Vergleich zur Kontrolle (5%). Die Pendrin-Expression nach 24 h (60%) war im Vergleich zur Kontrolle (50%) leicht erhöht. Nach 48 Stunden kam es zu einem deutlichen Absinken der Pendrin-exprimierenden Zellen auf 10% (Kontrolle 20%). Die ^3H -Thymidinaufnahme war zwischen 24 und 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht. Gegenüber anderen Versuchsansätzen fällt bei diesem Versuchsansatz auf, dass die absolute Thymidinaufnahme niedriger war. Die Apoptoserate war nach 48 Stunden von 21% auf 95% gesteigert. Auch Graaf et al. (2004) beschreiben unter Mevinolin eine Apoptoseinduktion.

5.5 Wirkung von Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Valproinsäure, Apicidin, APHA Compound 8) auf die Apoptose, die Proliferation und den Iodidstoffwechsel der humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 238

Abhängig vom Zelltyp, vom Wirkstoff und dessen eingesetzter Konzentration können Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDIs) verschiedene Wirkungen auf Zellwachstum und -überleben entfalten (Rosato and Grant, 2003). HDI hemmen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* das Tumorwachstum, induzieren Differenzierungsvorgänge und lösen Apoptose aus (Villar-Garea and Esteller, 2004; de Ruijter et al., 2003; Drummond et al., 2005). Der Wirkmechanismus der HDI ist noch nicht definitiv entschlüsselt. Es wird angenommen, dass die Hemmung der Histon-Deacetylase und die damit verbundene Hyperacetylierung der Histone zu einer Aktivierung der Transkription führen. Valproinsäure gehört strukturell in die Substanzklasse der kurzkettigen Fettsäuren und erst vor wenigen Jahren wurde dessen Histon-Deacetylase-inhibitorische Wirkung identifiziert (Phiel et al., 2001). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die vor allem als Antikonvulsivum eingesetzte Valproinsäure das Wachstum von Primärtumoren und Metastasen supprimieren

und eine Redifferenzierung von Tumorzellen in vitro und in vivo hervorrufen kann (Blaheta et al., 2002; Gottlicher et al., 2001).

Valproinsäure bewirkte zudem in einer Studie mit kultivierten malignen Thyreozyten eine erhöhte Iodidaufnahme durch gesteigerte NIS-Expression (Fortunati et al, 2004).

In den eigenen Versuchen induzierte Valproinsäure über die Versuchsdauer hinweg nur nach 42 Stunden Inkubationszeit eine erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahme. Im Vergleich zur Kontrolle kam es sonst nur zu erniedrigten ^{125}I -Iodidaufnahmeraten. Unter 3 mM Valproinsäure war die verminderte Speicherung nach 30 Stunden signifikant. Passend dazu waren die NIS- (30 %; Kontrolle 50%) und Pendrin- (25%; Kontrolle 50%) Expression nach 24 Stunden erniedrigt. Nach 48 Stunden war die Anzahl der NIS- (20%; Kontrolle 5%) und Pendrin- exprimierenden Zellen (35 %; Kontrolle 20%) erhöht. Die ^3H -Thymidinaufnahme unter Valproinsäure war eher erniedrigt. Trotz der in der Literatur beschriebenen Apoptose-induzierenden Wirkung von Valproinsäure in zwei anaplastischen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien (CAL-62 und ARO) (Catalano et al, 2005), nahm dieser HDAC-Inhibitor keinen Einfluss auf die Apoptoserate der eigenen Thyreozyten.

Bei den eigenen Thyreozyten, die mit Apicidin behandelt wurden, war die ^{125}I -Iodidaufnahme in die Zellen insgesamt im Verlauf des Versuches leicht erhöht. Die einzige signifikant erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahmerate fand sich nach 6 Stunden unter 0,5 μM Apicidin. Bei der Bestimmung der NIS- und Pendrin-Expressionen, kam es nach 24 Stunden zu einer erniedrigten NIS-/Pendrin-Expression (20%) im Vergleich zur Kontrolle (50%). Dies steht im Gegensatz zu den gemessenen ^{125}I -Iodeinbauraten, denn diese waren nach 24h unter 0,5 μM Apicidin deutlich erhöht. Nach 48 Stunden fand sich jedoch ein übereinstimmendes Ergebnis. Die NIS-Expression war deutlich erhöht (25 %) im Vergleich zur Kontrolle (5 %). Passend zu diesem Ergebnis war die Pendrin-Expression nach 48 Stunden auf 70% erhöht (Kontrolle 20%).

Die ^3H -Thymidinaufnahme war zwischen 6 und 42 Stunden im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht. Erst nach 48 Stunden kam es sowohl bei den mit

Apicidin stimulierten Zellen als auch bei der Kontrollgruppe zu einer Abnahme. Die Bestimmung der Apoptoserate ergab insgesamt keine auffällig erniedrigten bzw. erhöhten Werte im Vergleich zur Kontrolle.

Die ^{125}I -Iodidaufnahme in die malignen humanen Thyreozyten war unter Einfluss von APHA insbesondere nach 42,5 und 48 Stunden gesteigert. Nach 42,5 Stunden war der Anstieg der ^{125}I -Iodidinkorporation unter 0,5 μM , 1 μM und 5 μM APHA signifikant. Passend hierzu konnte sowohl nach 24 h (40%) als auch nach 48 h (40 %) eine erhöhte Anzahl NIS-exprimierender Zellen gemessen werden (Kontrolle: 24 h 20%, 48 h 10%). Die Pendrin-Expression fiel mit 20% nach 24 Stunden und 10% nach 48 Stunden aus dem Rahmen. Dies ist auf einen technischen Fehler bei der Versuchsausführung zurückzuführen. Die Messung der ^3H -Thymidinaufnahme ergab zwischen 6 und 42,5 Stunden konstant erhöhte Einbauraten. Nach 48 Stunden nahm, ähnlich wie unter Valproinsäure und Apicidin, die Thymidininkorporation ab. Passend hierzu konnte unter APHA nach 48 Stunden eine erhöhte Apoptoserate von 43% nachgewiesen werden (Kontrolle 28%). Die Apoptoseraten unter Valproinsäure und Apicidin waren jedoch nicht erhöht. Der Histon-Deacetylase-Inhibitor APHA war in dieser Versuchsreihe also am wirkungsvollsten.

5.6 Wirkung von Troglitazon auf die Apoptose, die Proliferation und den Iodidstoffwechsel der humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 238

Troglitazon ist ein sogenannter Insulinsensitizer, da er die Insulinresistenz herabsetzt. Die Insulinempfindlichkeit kann durch Bindung des Insulinsensitizers an den Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ) und seine dadurch ausgelöste Aktivierung verbessert werden (Debril, et al. 2001). Schultze et al. (2006) entdeckten jedoch eine weitere Eigenschaft dieser Substanz: Sie behandelten menschliche Gliom- und Neuroblastomzellen mit Troglitazon und stellten fest, dass diese Tumorzellen viel empfindlicher gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose werden. TRAIL steht für "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand" und ist ein sog. "Todesligand", d.h. er bindet an auf der Zelloberfläche befindliche Rezeptoren

und leitet auf diese Weise den programmierten Zelltod ein. Troglitazon stimuliert die Bildung von TRAIL-R2-Rezeptoren. In den Zellen fungieren bestimmte Proteine wie Survivin und FLIP als Apoptose-Gegenspieler, indem sie andere Enzyme hemmen, die letztlich zum Zelltod führen. Es konnte zudem nachgewiesen werden, dass durch Behandlung der Tumorzellen mit Troglitazon die Konzentration dieser antiapoptotischen Proteine signifikant zurückgeht. Hinsichtlich der Schilddrüse vermindert Troglitazon bei einigen humanen Schilddrüsentumorarten signifikant das Wachstum. Dieser tumorsuppressive Effekt von Troglitazon kann einen Fortschritt in der Therapie von Schilddrüsentumoren bedeuten (Park et al. 2003, Chung et al. 2002, Ohta et al. 2001). Wegen vereinzelt auftretender gravierender Nebenwirkungen wurde der Insulinsensitizer Troglitazon vom Markt genommen. Nachfolgeprodukte des Troglitazons, wie beispielsweise Rosiglitazon, zeigen ebenfalls Effekte auf Schilddrüsentumore.

Die Bestimmung der ^{125}I -Iodidaufnahme in die humanen cancerogenen Thyreozyten ergab, verglichen mit der Kontrolle, eine deutlich erhöhte ^{125}I -Iodidaufnahme nach 6 Stunden Inkubationszeit unter $2,5\ \mu\text{M}$ Troglitazon, nach 24 Stunden unter $10\ \mu\text{M}$ Troglitazon und unter allen getesteten Konzentrationen nach 42,5 Stunden Inkubationszeit. Keiner der gemessenen Werte wurde jedoch als signifikant gewertet. Die Ergebnisse der immunzytochemischen Bestimmung der NIS-Expression konnten diese Ergebnisse nur bedingt bestätigen. Unter $5\ \mu\text{M}$ Troglitazon kam es nach 24 Stunden (30%) zu einer im Vergleich zur Kontrolle (50%) erniedrigten NIS-Expression. Nach 48 Stunden kam es zu einer Erhöhung auf 35% NIS-exprimierender Zellen unter $5\ \mu\text{M}$ Troglitazon (Kontrolle 5 %). Im Einklang zu diesen Ergebnissen standen die Resultate der Pendrin-Expression. Die Proliferationsrate war über den Versuchszeitraum von 6 bis 42,5 Stunden im Vergleich zur Kontrolle leicht erhöht. Nach 48 Stunden kam es aber sowohl in den mit Troglitazon behandelten Zellen, als auch in den unbehandelten Zellen der Kontrollgruppe zu einem drastischen Abfall der Zellproliferation. Die Apoptoseraten nach 24 und 48 Stunden waren nicht erhöht.

5.7 Wirkung von Akt-Inhibitoren (Akt-Inhibitor I und Akt-Inhibitor V) auf die Apoptose, die Proliferation und den Iodidstoffwechsel der humanen cancerogenen Thyreozyten der Zelllinie FTC 238

In vielzelligen Organismen muß Zellproliferation, -differenzierung und Apoptose streng reguliert werden, um einen funktionsfähigen Gesamtorganismus aufrechtzuerhalten. Diese Aufgabe wird von Wachstumsfaktoren übernommen, die nach Rezeptorbindung an der Zelloberfläche spezifische Signalkaskaden auslösen. Die Serin/Threoninkinase PKB/c-Akt ist für eine Vielzahl von Zellen Schlüsselenzym für Zellproliferation und Antiapoptose (Coffer PJ et al. 1998, Datta et al. 1997, Dudek et al. 1997). Eine Phosphorylierung spezifischer Aminosäurereste dieser Kinase führt zu einer Aufhebung der inter-molekularen Hemmung und zur Aktivierung der Kinase. Im Signalweg oberhalb der PKB ist es die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die durch die Generierung der sekundären Botenstoffe PIP3 die wichtigste regulative Aufgabe im sogenannten PI3K/AKT-Signalweg einnimmt. Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges durch direkte oder indirekte mutagene Ereignisse findet bei vielen humanen Krebsarten statt und führt zur Deregulierung des PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweges. Deshalb sind Wirkstoffe, die in der Lage sind, den PI3K/Akt/mTOR-Signaltransduktionsweg zu inhibieren, interessante Targets für die Krebstherapie (Osaki et al, 2004). Unter anderem konnte der proliferationshemmende und apoptoseinduzierende Effekt eines Akt-Inhibitors (KP 372-1) in vitro an follikulären, papillären, sowie anaplastischen cancerogenen Thyreozyten (Mandal et al, 2002) nachgewiesen werden. Weitere Erfolge konnten in Untersuchungen an einer aus Leberzellen gewonnenen Zelllinie (Nakanishi et al, 2002) und einer Leukämiezelllinie (Martelli et al, 2003) erzielt werden. Arsenitrioxid führt zu einer Hemmung von Proteinkinase B. Heutzutage findet Arsenitrioxid seine Anwendung in der Behandlung der rezidierten und refraktären akuten Promyelozytenleukämie (APL). Es besitzt Effekte auf den programmierten Zelltod (Apoptose) und die Dedifferenzierung, auf Proliferation der Tumorzellen und einen antiangiogenen Effekt (Jr Miller WH, 2002).

In unseren Untersuchungen kam es in den mit Akt-Inhibitor I + 2 μ M Arsentrioxid stimulierten Thyreozyten der Zelllinie FTC 238 zu niedrigeren ^{125}I -Iodideinbauraten im Vergleich zu den Zellen, die nur mit Akt-Inhibitor I stimuliert wurden. Signifikant erniedrigte ^{125}I -Iodideinbauraten wurden nach 32h Inkubation unter 5 μ M, 10 μ M und 20 μ M Akt-Inhibitor I + 2 μ M Arsentrioxid gemessen. Nach 48-stündiger Inkubation konnte bei allen mit AKT-Inhibitor I + Arsentrioxid stimulierten Thyreozyten eine signifikant erniedrigte ^{125}I -Iodideininkorporation verzeichnet. Parallel hierzu konnte eine Steigerung der Expression von NIS unter Akt-Inhibitor I, Akt-Inhibitor I + Arsentrioxid und Arsentrioxid allein nach 24 und 48 Stunden nachgewiesen werden. Die Pendrin-Expression nach 24 h war unter Akt-Inhibitor I (40%) und Akt-Inhibitor I + Arsentrioxid (30%) ebenfalls erhöht (Kontrolle 10%). Nach 48 Stunden kam es unter Akt-Inhibitor I zu einem Absinken der Anzahl Pendrin-exprimierender Zellen auf gerade 10% (Kontrolle 20%). Die einzige statistisch signifikant erniedrigte ^3H -Thymidinaufnahme wurde nach einer Inkubationsdauer von 30 Stunden unter 2 μ M Arsentrioxid gemessen. Erniedrigte, jedoch statistisch nicht signifikante ^3H -Thymidinaufnahmeraten wurden in allen mit Akt I-Inhibitor+ Arsentrioxid stimulierten Zellen nach 6-stündiger Inkubation gemessen. Nach 24 als auch nach 48 Stunden kam es unter allen getesteten Substanzen zu erhöhten Apoptosraten im Vergleich zur Kontrolle. Dass es zu einer gesteigerten Apoptoserate durch Synergismus von Akt-Inhibitor I und Arsentrioxid kommt, konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Ein ähnliches Ergebnis wie unter Akt-Inhibitor I und Arsentrioxid fand sich bei den Schilddrüsenkarzinomzellen, die mit Akt-Inhibitor V und Arsentrioxid behandelt wurden. Mit Ausnahme von 10 μ M AKT Inhibitor V + 2 μ M Arsentrioxid, zeigten alle mit AKT V + 2 μ M Arsentrioxid behandelten Thyreozyten nach 6 Stunden eine deutlich niedrigere ^{125}I -Iodidaufnahme im Vergleich zu den Thyreozyten, die nur mit AKT Inhibitor V stimuliert wurden. Signifikant niedrige Einbauraten wurden unter 5 μ M und 20 μ M AKT V + 2 μ M Arsentrioxid nach 6h und 48h gemessen. Die immunzytochemische Darstellung von NIS ergab unter allen untersuchten Substanzen sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden eine gesteigerte Anzahl NIS-exprimierender Zellen im

Vergleich zur Kontrolle. Die Anzahl Pendrin-exprimierender Zellen hingegen war nach 24 Stunden unter Akt Inhibitor V (10%), sowie unter Arsentrioxid (10%) im Vergleich zur Kontrolle (20%) erniedrigt. Unter Akt Inhibitor V + Arsentrioxid jedoch kam es zu einer Pendrin Expression von 20%. Die ³H-Thymidinaufnahme war insgesamt unter allen untersuchten Substanzen im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden kam es hier zudem zu einer gesteigerten Apoptoserate durch Synergismus von Akt-Inhibitor V und Arsentrioxid.

5.8. Bewertung der untersuchten Substanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt verschiedener differenzierungssteigernder Substanzen auf Apoptose, Proliferation, Radiojodaufnahme, Thymidinaufnahme, Pendrin- und NIS-Expression in der cancerogenen Schilddrüsenzelllinie FTC 238 untersucht. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die in dieser Studie untersuchten Substanzen und ihren Einfluss auf ¹²⁵I-Iodidaufnahme, ³H-Thymidininkorporation, Apoptose, NIS- und Pendrin-Expression.

Mevinolin zeigte in dieser Studie den größten Effekt auf die ¹²⁵I-Iodidaufnahme, sowie die Apotoserate der Thyreozyten. Obwohl Retinoide und Troglitazon in der Literatur als wirksamere differenzierungssteigernde Substanzen beschreiben wurden (Fröhlich et al., 2005, Simon et al, 2002) haben sie in dieser Studie nur einen geringen Effekt gezeigt. Gründe hierfür könnten sein: eine zu hohe Passage der kultivierten Zelllinie und damit einhergehende De-differenzierung, Kontamination einzelner Kulturen mit Bakterien oder Mykoplasmen (letzteres ist durch einen als negativ zu beurteilenden Mykoplasmentest bei den eigenen Kulturen nur wenig wahrscheinlich), ungleichmäßige Zellzahlen in den verschiedenen Wells, Instabilität der Substanzen infolge Lagerung. Auffällig war zudem noch die fehlende Korrelation zwischen ¹²⁵I-Iodidaufnahme und NIS-Expression. Beim Nachweis der NIS- und Pendrin-Expression dürften insbesondere technische Probleme bei der Durchführung der Versuche vorgelegen haben.

Substanz	¹²⁵ I-Iodidaufnahme	³ H-Thymidinaufnahme	Apoptose	NIS	Pendrin
All-trans-Retinsäure	0	+	0	0	+
9-cis-Retinsäure	+	+	0	+	0
13-cis-Retinsäure	+	+	0	+	0
all-trans-Retinol	0	+	0	+	+
13-cis Retinol	+	-	0	+	+
5-Azadeoxcytidin	++	+	0	-	-
Mevinolin	++	+	++	0	0
Valproinsre.	-	-	0	0	+
Apicidin	+	0	0	0	+
APHA	+	0	0	+	-
Troglitazon	+	0	0	0	+
Akt I	0	-	+	+	+
Akt I + Arsentrioxid	-	-	+	+	+
Arsentrioxid	0	0	0	+	-
Akt V	0	--	+	+	-
Akt V + Arsentrioxid	0	--	+	+	0

Tab.2: Bewertung der untersuchten Substanzen in dieser Studie

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

6. Zusammenfassung

Routinetherapie bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist die Thyreoidektomie mit anschließender Radioiodtherapie. Ziel der Radioiodtherapie nach totaler Thyreoidektomie ist neben der Ablation von evtl. noch vorhandenem Restschilddrüsengewebe, der Nachweis bzw. die Ausschaltung von Iod-speichernden Lymphknoten und Fernmetastasen. Der therapeutische Nutzen der Radioiodtherapie von Schilddrüsenkarzinomen und ihren Metastasen ist dabei entscheidend von der Iodaufnahme und damit von dem charakteristischen Expressionsmuster eines funktionsfähigen Na^+/I^- Symporters abhängig. Bei den meisten entarteten Schilddrüsenzellen ist eine Iodaufnahme nur eingeschränkt oder nicht mehr möglich. In dieser Studie wurde nach Substanzen gesucht, die einen re-differenzierungssteigernden Effekt auf die Zellen der humanen cancerogenen Zelllinie FTC-238 haben. Als potentielle Redifferenzierungssubstanzen wurden untersucht:

- Retinoide: all-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure, 13-cis-Retinsäure, all-trans-Retinol, 13-cis-Retinol
- DNA-Methyltransferase-Hemmer: 5-Aza-2'-deoxycytidin
- Proteinkinase B Hemmstoffe: Akt Inhibitor I, Akt Inhibitor V und simultane Applikation von AKT-Inhibitoren + Arsentrioxid
- Histon-Deacetylase-Hemmer: Apicidin, APHA Compound 8, Valproinsäure
- Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase-Inhibitor: Mevinolin
- Thiazolidindione: Troglitazon
- Arsentrioxid

Die ^{125}I -Iodidaufnahme diente als Differenzierungsparameter, die ^3H -Thymidinaufnahme als Marker für die Proliferation. Untersucht wurden zudem die Protein-Expression von NIS und Pendrin, sowie die Apoptosrate.

Bis auf all-trans-Retinol und all-trans-Retinsäure führten die Retinoide zu einer gesteigerten ^{125}I -Iodidaufnahme. Die Konzentration 0,5 μM und 2 μM bei 9-cis-Retinsäure, sowie 0,5 μM , 1 μM und 2 μM bei 13-cis-Retinsäure stellten sich als besonders effektiv heraus. Die gesteigerte Iodaufnahme ging mit einer

gesteigerten Expression des NIS-Transporterproteins einher. Die ^3H -Thymidinaufnahme nahm ab bzw. unterschied sich nicht merklich von der Kontrollgruppe. Bei den mit Retinol stimulierten Zellen kam es zu einer Expression des Pendrins.

Unter dem Einfluss von 5-Aza-deoxycytidin kam es nach 6, 18 und 48 Stunden Inkubationszeit unter den getesteten Konzentrationen 1 μM , 5 μM und 10 μM es zu einer signifikanten Erhöhung ^{125}I -Iodidaufnahme. Die ^3H -Thymidinaufnahme war ebenfalls signifikant erhöht. Anstatt das Wachstum zu verlangsamen, beschleunigte das Cytidin-Derivat die Proliferation. Die Apoptose war im Vergleich zur Kontrolle nicht verstärkt. Eine Expression von NIS und Pendrin kann zytochemisch nicht bestätigt werden.

Der β -HMG-Reduktase-Inhibitor Mevinolin führte nach 6, 30 und 42 Stunden zu einer Steigerung der ^{125}I -Iodidaufnahme unter allen getesteten Konzentrationen. Die ^3H -Thymidinaufnahme war ebenfalls nach 24, 30, 42 und 48 Stunden signifikant gesteigert. Bei der Apoptoserate war nach 24 Stunden eine Verdopplung und nach 48 Stunden eine Verneunfachung zu beobachten.

Bei den Histon-Deacetylase-Inhibitoren war die ^{125}I -Iodidaufnahme unter Valproinsäure erniedrigt und unter Apicidin und APHA Compound 8 erhöht. Die Thyreozyten nahmen unter Valproinsäure lediglich nach 6 Stunden Inkubationsdauer verstärkt ^3H -Thymidin auf. Zu den übrigen Zeiten kam es unter Valproinsäure jedoch zu einer deutlichen Abnahme der ^3H -Thymidininkorporation. Unter Apicidin und APHA Compound 8 wichen die Werte nur wenig von den Aufnahmezeiten der Kontrollgruppe ab. Abgesehen von Valproinsäure kam es unter Apicidin und APHA Compound 8 erst nach 48 Stunden zu einer Steigerung der NIS-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Unter Valproinsäure (1 mM) kam es nach 24 (80%) als auch nach 48 Stunden (90%) zu einer gesteigerten NIS-Expression. Valproinsäure bewirkte zudem eine Steigerung der Pendrin exprimierenden Zellen (60%) nach 48 Stunden (Kontrolle 20%). Kein Histon-Deactelase-Inhibitor beeinflusste die Apoptoserate.

Troglitazon bewirkte eine leicht gesteigerte, jedoch nicht signifikante ^{125}I -Iodidaufnahme in die Thyreozyten nach 6, 18, 42.5 und 48 Stunden. Die ^3H -

Thymidinaufnahme war nach 6 Stunden unter 5 μ M Troglitazon signifikant erhöht, zwischen und 18 und 48 Stunden waren die Aufnahmeraten jedoch im Vergleich zur Kontrolle leicht erniedrigt. Nach 48 Stunden konnte unter Troglitazon sowohl eine gesteigerte NIS- (35%), als auch eine gesteigerte Pendrin-Expression (60%) nachgewiesen werden. Die Apoptoserate wurde nicht beeinflusst.

Unter dem Einfluss der Akt-Inhibitoren I und V, mit und ohne zusätzliche Stimulation mit Arsentrioxid, waren die 125 I-Iodidaufnahme sowie die 3 H-Thymidinaufnahme in die Zellen erniedrigt. Parallel dazu war die NIS- und Pendrin-Expression jedoch deutlich erhöht. Die Apoptoserate war nach 24 als auch nach 48 Stunden Inkubationszeit deutlich erhöht.

Mevinolin zeigte in dieser Studie, den größten differenzierungssteigernden Effekt auf die Zellen der Zelllinie FTC-238.

7. Literatur

Agarwal B, Halmos B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR

(1998) Lovastatin sensitizes colon cancer HT-29 cells to apoptosis induced by chemotherapeutic agents.
Proc Am Assoc Cancer Res 39:68

J.M Baron, C.Skazik, HF Merk

(2008) Retinoide und Retinoidstoffwechsel
Hautarzt, 59:745-746

Becker, J., Delayre-Orthez, C., Frossard, N., Pons, F.

(2006) Regulation of inflammation by PPARs: a future approach to treat lung inflammatory diseases?
Fundam ClinPharmacol; 20:429-447.

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.

Blaheta RA, Cinatl J Jr.

(2002) Anti-tumour mechanisms of valproate: a novel role for an old drug.
Med Res Rev; 22: 492–511.

Catalano MG., Fortunati N., Pugliese M.

(2005) Valproic acid induces apoptosis and cell cycle arrest in poorly differentiated thyroid cancer cells.
J Clin Endocrinol Metab; 90:1383-1389

Carrasco N.

(1993) Iodide transport in the thyroid gland.

Biochem Biophys Acta; 1154: 65-82.

Carrasco N.

(1997) Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter

J Biol Chem; 272 (43): 27230-8

Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P.

(2001) A PPAR γ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.

Mol Cell;7:161–171.

Chung SH, Onoda N, Ishikawa T, Ogisawa K, Takenaka C, Yano Y, Hato F, Hirakawa K

(2002) Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Activation Induces Cell Cycle Arrest via the p53-independent Pathway in Human Anaplastic Thyroid Cancer Cells.

Jpn J Cancer Res; 93:1358-1365

Cihak A.

(1974) 5-Azacytidine-induced exencephaly in mice

Oncology; 30: 405-422.

Cinatl J. Jr., Cinatl J., Hernáiz Driever P., Kotchetkov R., Pouckova P., Kornhuber B., Schwabe D.

(1997) Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells.

Anticancer Drugs; 8: 958-63

Cinatl J. Jr., Cinatl J., Scholz M., Hernáiz Driever P., Henrich D., Kabickova H., Vogel JU., Doerr HW., Kornhuber B.

(1996) Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells.

Anticancer Drugs; 7: 766-73

Coffer P.J., Jin, J. and Woodgett, J.R.

(1998) Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation

Biochem J; 335: 1-13

Cox AD, Der CJ

(1997) Farnesyltransferase inhibitors and cancer treatment: targeting simply Ras?

Biochim Biophys Acta; 1333:F51–F71

Datta S.R., Dudek H, Tao X

(1997) Akt Phosphorylation of BAD Couples Survival Signals to the Cell-Intrinsic Death Machinery

Cell.; 91:231-241.

Debril MB, Renaud JP, Fajas L & Auwerx J

(2001) The pleiotropic functions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.

J Mol Med; 79:30–47.

de Ruijter, A. J., A. H. van Gennip, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB

(2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family

Biochem J; 370(Pt 3): 737-49.

Di Matola T., D'Ascoli F., Luongo C., Bifulco M., Rossi G., Fenzi G., Vitale M.

(2001) Lovastatin-induced apoptosis in thyroid cells: involvement of cytochrome C and lamin B

Eur J Endocrinol; 145(5):645-50

- Drummond, D. C.**, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC
(2005) Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents.
Annu Rev Pharmacol Toxicol; 45:495-528.
- Dudek H.**, S.R. Datta, T.F. Franke, M.J. Birnbaum, R. Yao, G.M. Cooper, R.A. Segal, D.R. Kaplan, and M.E. Greenberg.
(1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt.
Science;. 275:661–665
- Eskandari**, Donald D. F. Loo, Ge Dai, Orlie Levy, Wright E.M. and Carrasco N.
(1997) Thyroid Na⁺/I⁻ Symporter; mechanism, stoichiometry and specificity
JBC ; 272:27230-27238.
- Fadeel**, B, Orrenius, S and Zhivotovsky, B
(1999b). Apoptosis in human disease: a new skin for the old ceremony?
Biochem Biophys Res Commun; 266(3): 699-717.
- Fisher JE**, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, Wesolowski G, Russell RG, Rodan GA, Reszka AA
(1999) Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro.
Proc Natl Acad Sci USA; 96:133–138
- 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.**, Witke A, Czarnocka B, Wahl R

Effects of retinol on follicular porcine thyrocytes in culture J Mol Med
1999 Jan; 77:189-92

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

Gottlicher M., Minucci S, Zhu P

(2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.
EMBO J 2001; 20: 6969–78.

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

(2002) Zellkern
Histologie; 21-34

Gray-Bablin J., Rao S, Keyomarsi K

(1997) Lovastatin induction of cyclindependent kinase inhibitors in human breast cells occurs in a cell cycleindependent fashion.
Cancer Res; 57:604–609

Goldstein JL., Brown MS

(1990) Regulation of the mevalonate pathway.
Nature; 343:425–430

Hanahan D., Weinberg RA

(2000) *The hallmarks of cancer.*
Cell; 100:57

Hoang-Vu C, Bull K, Schwarz I, Krause G, Schmutzler C, Aust G, Köhrle J, Dralle H (1999) Regulation of CD 97 protein in thyroid carcinoma
J Clin Endocrinol Metab; 84:1104 – 1109

Hülber M.

(2008) Charakterisierung des Effekts verschiedener differenzierungssteigernder Substanzen auf Proliferation, Apoptose und Iodidstoffwechsel in die transformierte Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie ONCO-DG 1
Inaug. Dissertation, Universität Tübingen

Iwata M.

Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors.
Int Immunol.; 15:1017–1025.

Jones PA, Taylor SM.

(1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation.
Cell 1980; 20:85-93.

Jung M.

(2001) Inhibitors of Histone Deacetylase as New Anti Cancer Agents.
Current Medicinal Chemistry; 8(12): 1505-1511

Kato, M., Kusumi, T., Tsuchida, S., Tanaka, M., Sasaki, M., Kudo, H.

(2004) Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in colon cancer cell lines by troglitazone.
J Cancer Res Clin Oncol:130, 73-79.

Kim JS, Pirnia F, Choi YH, Nguyen PM, Knepper B, Tsokos M, Schulte TW, Birrer MJ

(2000) Lovastatin induces apoptosis in a primitive neuroectodermal tumor cell line in association with RB down-regulation and loss of the G1 checkpoint.

Oncogene; 19:6082–6090

Klaassen CD

(1996) Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons
(5th Edition) McGraw-Hill, New York

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

Kumar A., Bal C.S.

(2003) Differentiated thyroid cancer.

Indian J Pediatr; 70(9): 707-13

Kurtz T.W., Gardner D.G.

(1998) Transcription-Modulating Drugs : A New Frontier in the Treatment of Essential-Hypertension.

Hypertension; 32:380-386

Landenberger C.

(2005) Untersuchungen an humanen Thyreozyten und humanen transformierten Thyreozyten.

Inaug. Dissertation, Universität Tübingen

Lee, K. S., Park, J. H., Lee, S., Lim, H. J., Jang, Y., Park, H. Y.

(2006) Troglitazone inhibits endothelial cell proliferation through suppression of casein kinase 2 activity.

Biochem Biophys Res Commun; 346:83-88.

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

Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N
(2001) Simastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells.
Biochem Biophys Res Commun; 280:874–877

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

Michaelis M., Michaelis UR., Fleming I., Suhan T., Cinatl J., Blaheta RA., Hoffmann K., Kotchetkov R., Busse R., Nau H., Cinatl J. Jr.
(2004) Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo
Mol Pharmacol, 65: 520-7

Michaelis M., Suhan T., Cinatl J., Hernáiz Driever P., Cinatl J. Jr.

(2004) Valproic acid and interferon-alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo
Int J Oncol; 25: 1795-9

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

Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM

(1998) Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.
Cell 17; 93(2):229-40.

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

- Ohta K**, Endo T, Haraguchi K, Hershman JM, Onaya T
(2001) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit growth and induce apoptosis of human papillary thyroid carcinoma cells.
J Clin Endocrinol Metab, 86(5):2170-2177
- Osaki M.**, Oshimura M., Ito H.
(2004) PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. Apoptosis; 9(6): 667-676
- Pandhare, J.**, Cooper, S.K., Phang, J.M.
(2006) Prolineoxidase, a proapoptotic gene, is induced by troglitazone: Evidence for both PPARgamma -dependent and independent mechanisms.
J Biol Chem; 281:2044-2052.
- Park JW**, Wong MG, Lobo M, Hyun WC, Duh QY, Clark OH
(2003) Modulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand induced apoptosis by chemotherapy in thyroid cancer cell lines. Thyroid,;13(12):1103-1110
- Park WH**, Lee YY, Kim ES, Seol JG, Jung CW, Lee CC, Kim BK
(1999) Lovastatin- induced inhibition of HL-60 cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis.
Anticancer Res ;19:3133–3140
- Phiel CJ**, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA & Klein PS
(2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen.
J Biol Chem; 276:36734–36741.
- Reinwein D.**, Röher H. D., Emrich D.
(1993) Therapie der Hyperthyreose aktueller Stand.

Ringel M.D.; N. Hayre, J. Saito, B. Saunier, F. Schuppert, H. Burch, V. Bernet, K.D.

Burman, L.D. Kohn, M. Saji

(2001) Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma
Cancer Res; 61: 6105-6111

Rosato RR, Grant S.

(2003) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy.
Cancer Biol Ther; 2(1):30-7

Roth, M., Black, J. L.

(2006) Transcription factors in asthma: are transcription factors a new target for asthma therapy?
Curr Drug Targets; 7, 589-595.

Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E, Cholesterol and Recurrent Events Trial Investigators

(1996) The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels.
N Engl J Med; 335:1001–1009

Scandinavian Simvastatin Survival Study Group

(1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).
Lancet; 344:1383–1389

Schicha H, Scheithauer K.

(1996) Therapie mit offenen radiaktiven Stoffen.

Thieme Stuttgart New York, 460-487

Schmutzler C, Brtko J, Winzer R

(1998) Functional retinoid and thyroid hormone receptors in human thyroid-carcinoma cell lines and tissues.

Int J Cancer; 76:368–376.

Schmutzler C., Hoang-Vu C., Ruger B.

(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 non transformed 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.

Shiau, C. W., Yang, C.C., Kulp, S.K., Chen, K.F., Chen, C.S., Huang, J.W., Chen, C.S.

(2005) Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of Bcl-xL/Bcl-2 functions independently of PPARgamma.

Cancer Res; 65:1561-1569.

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard CJ

(1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia.

N Engl J Med; 333:1301–1307

Silverman, L.R., et al.

(2002) Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group

B. J Clin Oncol; 20(10): 2429-40

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

Sorm F., Vesely J.

(1968) Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice.

Neoplasma; 15(4): 339-43

Varley, C. L., Stahlschmidt, J., Lee, W.C., Holder, J., Diggle, C., Selby, P.J., Trejdosiewicz, L.K., Southgate, J.

(2004) Role of PPARgamma and EGFR signalling in the urothelial terminal differentiation programme.

J Cell Sci; 117:2029-2036.

Verspohl E.J., Weiland F.

(2002) Insulinsensitizer.

Pharmazie in unserer Zeit; 280-292

Villar-Garea, A. and M. Esteller

(2004) Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents.

Int J Cancer; 112(2): 171-8.

Wang, Y. L., Frauwirth, K. A., Rangwala, S. M., Lazar, M. A., Thompson, C. B.

(2002) Thiazolidinedione activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma can enhance mitochondrial potential and promote cell survival.

J Biol Chem; 277:31781-31788.

Wang, XW

(1999). Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis.

Anticancer Res; 19(6A): 4759-71.

Weber C, Erl W, Weber PC

(1995) Lovastatin induces differentiation of Mono-Mac 6 cells.

Cell Biochem Funct; 13:273-277

Wijermans P., Lubbert M, Verhoef G

(2002) Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients.

J Clin Oncol; 18(5): p. 956-62.

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

Zhang P.

(1999) The use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia.

J Biol Regul Homeost Agents; 13: 195-200

8. Anhang

Tab.3 zu Abb.4: ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq Mean	Lower 95%	Upper 95%	signifikant
ohne Stimulation	5.5	34.82	27.97	43.36	
	18.5	34.76	27.91	43.28	
	24.5	69.46	55.78	86.48	
	30	38.37	30.82	47.78	
	42	56.85	45.66	70.79	
	48	50.63	40.67	63.05	
Methanol	5.5	38.52	28.57	51.94	
	18.5	40.15	29.77	54.13	
	24.5	102.71	76.17	138.5	
	30	43.18	32.03	58.23	
	42	49.76	36.91	67.1	
	48	59.47	44.1	80.19	
13-cis Retinsäure 0,5 μM	5.5	40.03	33.37	48.02	*
	18.5	44.05	36.72	52.84	
	24.5	98.41	82.04	118.06	
	30	38.56	31.74	46.85	
	42	44.6	37.18	53.5	
	48	59.86	49.9	71.81	
13-cis Retinsäure 1 μM	5.5	38.73	30.86	48.61	*
	18.5	34.62	27.59	43.45	
	24.5	88.78	70.74	111.42	
	30	49.41	39.37	62.01	
	42	58.05	46.25	72.85	
	48	50.38	40.14	63.23	
13-cis Retinsäure 2 μM	5.5	68.76	54.85	86.19	*
	18.5	112.98	90.13	141.61	
	24.5	84.85	67.69	106.36	
	30	43.96	35.07	55.1	
	42	41.7	33.27	52.27	
	48	40.74	32.5	51.07	
9-cis Retinsäure 0,5 μM	5.5	54.27	42.45	69.39	*
	18.5	123.11	96.29	157.4	
	24.5	90.63	70.89	115.87	
	30	52.23	40.85	66.78	
	42	37.46	29.3	47.89	

	48	41.42	32.4	52.96	
9-cis Retinsäure 1 μM	5.5	74.24	57.92	95.15	*
	18.5	137.39	107.19	176.09	
	24.5	111.88	87.3	143.4	
	30	44.77	34.93	57.38	
	42	39.08	30.49	50.08	
	48	39.78	31.04	50.98	
9-cis Retinsäure 2 μM	5.5	68.76	54.85	86.19	*
	18.5	112.98	90.13	141.61	*
	24.5	84.85	67.69	106.36	
	30	43.96	35.07	55.1	
	42	41.7	33.27	52.27	
	48	40.74	32.5	51.07	
all-trans Retinsäure 0,5 μM	5.5	127.14	107.1	150.93	
	18.5	39.79	33.52	47.24	
	24.5	60.67	51.11	72.03	
	30	43.74	36.84	51.92	
	42	38.9	32.76	46.17	
	48	63.56	53.54	75.46	
all-trans Retinsäure 1 μM	5.5	92.39	65.57	130.18	
	18.5	92.21	65.44	129.94	
	24.5	72.84	51.7	102.64	
	30	73.45	52.13	103.5	
	42	36.7	26.04	51.71	
	48	42.25	29.99	59.54	
all-trans Retinsäure 2 μM	5.5	34.86	26.83	45.29	
	18.5	40.33	31.04	52.39	
	24.5	70.8	54.5	91.98	
	30	41.51	31.95	53.93	
	42	37.8	29.09	49.1	
	48	68.75	52.92	89.32	

Tab.4 zu Abb.5: ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, $n=6$. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq Mean	Lower 95%	Upper 95%	signifikant
ohne Stimulation	5.5	848.75	715.05	1007.46	
	18.5	2697.53	2272.58	3201.94	
	24.5	5899.81	4970.39	7003.03	

	30	8720.82	7347	10351.54	
	42	13852.65	11670.39	16442.97	
	48	17044.64	14359.53	20231.83	
Methanol	5.5	881.07	731.97	1060.55	
	18.5	3073.06	2553	3699.04	
	24.5	5756.83	4721.77	7018.78	
	30	10855.83	9018.7	13067.18	
	42	16343.09	13577.36	19672.22	
	48	17696.05	14701.35	21300.77	
13-cis Retinsäure 0,5 µM	5.5	1034.91	802.97	1333.84	
	18.5	3381.49	2623.64	4358.23	
	24.5	7348.04	5701.23	9470.53	
	30	10341.92	8024.14	13329.19	
	42	19919.27	15455.06	25672.96	
	48	21970.85	17046.85	28317.14	
13-cis Retinsäure 1 µM	5.5	851.23	687.03	1054.67	
	18.5	2894.2	2335.92	3585.9	
	24.5	5254.81	4241.18	6510.68	
	30	8536.16	6889.58	10576.27	
	42	15543.35	12545.12	19258.14	
	48	19824.1	16000.13	24561.97	
13-cis Retinsäure 2 µM	5.5	1372.55	1175.84	1602.18	
	18.5	3354.54	2873.76	3915.75	
	24.5	7127.67	6106.13	8320.12	
	30	10265.7	8794.4	11983.14	
	42	17384.48	14892.91	20292.88	
	48	19624.12	16811.56	22907.21	
9-cis Retinsäure 0,5 µM	5.5	1282.7	1140.48	1442.65	
	18.5	3718.31	3306.04	4181.98	
	24.5	7404.54	6583.56	8327.88	
	30	12528.65	11139.54	14090.98	
	42	17323.67	15402.92	19483.93	
	48	19152.27	17028.77	21540.56	
9-cis Retinsäure 1 µM	5.5	1210.92	1003.14	1461.74	*
	18.5	3408.29	2823.47	4114.25	

	24.5	6827.52	5656	8241.7	
	30	9932.45	8228.15	11989.75	
	42	17442.34	14449.43	21055.16	
	48	20864.16	17284.11	25185.74	
9-cis Retinsäure 2 µM	5.5	1211.06	1079.7	1358.39	
	18.5	4431.04	3950.43	4970.12	
	24.5	7449.91	6641.86	8356.27	
	30	14541.03	12963.85	16310.09	
	42	21708.38	19353.79	24349.42	
	48	21969.95	19587	24642.81	
all-trans Retinsäure 0,5 µM	5.5	1772.22	1500.37	2093.32	
	18.5	4741.37	4014.08	5600.44	
	24.5	9078.67	7686.07	10723.59	
	30	12940.08	10955.17	15284.62	
	42	18018.09	15254.25	21282.69	
	48	19126.69	16192.8	22592.15	
all-trans Retinsäure 1 µM	5.5	1041.3	867.12	1250.46	
	18.5	3958.21	3296.12	4753.29	
	24.5	7329.86	6103.8	8802.2	
	30	11121.27	9261.02	13355.18	
	42	19803.44	16490.93	23781.33	
	48	20401.71	16989.12	24499.77	
all-trans Retinsäure 2 µM	5.5	1120.38	898.5	1397.05	
	18.5	3746.86	3004.84	4672.12	
	24.5	7357.8	5900.68	9174.75	
	30	12464.54	9996.09	15542.54	
	42	17992.92	14429.65	22436.1	
	48	19569.89	15694.32	24402.5	

Tab.5 zu Abb.6: ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq Mean	Lower 95%	Upper 95%	signifikant
ohne Stimulation	6	28.95	23.14	36.23	
	18	35.89	28.68	44.91	

	24	78.04	62.36	97.65	
	30.5	29.21	23.34	36.55	
	48	46.72	37.33	58.46	
Methanol	6	47.03	35.01	63.17	
	18	50.03	37.25	67.20	
	24	225.22	167.68	302.50	
	30	40.00	29.78	53.73	
	48	74.22	55.26	99.69	
13-cis Retinol (1,6 μM)	6	36.88	29.84	45.58	
	18	41.13	33.28	50.83	
	24	161.17	130.41	199.19	
	30.5	31.40	25.41	38.81	*
	48	61.31	49.61	75.77	
13-cis Retinol (3,2 μM)	6	58.92	42.32	82.03	*
	18	34.57	24.83	48.13	
	24	41.75	28.49	61.19	
	30.5	67.98	48.82	94.65	*
	48	47.50	33.34	67.66	
13-cis Retinol (6,5 μM)	6	90.26	64.12	127.06	
	18	55.56	39.47	78.21	
	24	81.15	57.65	114.24	
	30.5	131.92	93.72	185.70	*
	48	69.08	49.07	97.23	
13-cis Retinol (13 μM)	6	48.84	35.64	66.93	
	18	44.38	32.39	60.82	
	24	72.70	53.05	99.62	
	30.5	104.16	76.01	142.73	*
	48	73.09	53.34	100.16	
All-trans Retinol (1,6 μM)	6	40.73	27.88	59.51	
	18	34.53	23.63	50.45	
	24	85.39	56.93	128.07	
	30	80.71	53.81	121.05	
	48	54.55	38.15	77.99	
All-trans Retinol (3,2 μM)	6	36.53	29.78	44.81	
	18	44.43	36.22	54.50	
	24	73.54	59.95	90.21	
	30.5	40.48	33.00	49.65	
	48	65.02	53.00	79.75	
All-trans Retinol (6,5 μM)	6	42.69	35.31	51.62	
	18	52.83	43.69	63.89	
	24	131.03	108.36	158.43	

	30.5	29.27	24.20	35.39	
	48	60.05	49.66	72.61	
All-trans Retinol (13 μ M)	6	42.36	37.13	48.33	
	18	47.40	41.55	54.08	
	24	123.66	108.40	141.08	*
	30.5	26.89	23.57	30.68	
	48	59.16	51.86	67.49	

Tab.6 zu Abb.7: 3 H-Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq Mean	Lower 95%	Upper 95%	signifikant
ohne Stimulation	6	1246.25	1049.74	1479.54	
	18	3072.7	2588.2	3647.9	
	24	7105.19	5914.35	8535.79	
	30.5	8289.16	6982.13	9840.86	
	48	11255.21	9480.49	13362.14	
Methanol	6	1249.51	998.79	1563.17	*
	18	2820.64	2254.67	3528.69	*
	24	5309.92	4244.46	6642.83	
	30.5	8321.52	6651.77	10410.41	
	48	9602.12	7675.42	12012.48	
13-cis Retinol (1,6 μ M)	6	8036.82	6328.71	10205.95	
	18	1317.56	1020.56	1701	
	24	4052.18	3190.95	5145.86	
	30.5	9886.83	7785.53	12555.27	
	48	17590.54	13851.92	22338.2	
13-cis Retinol (3,2 μ M)	6	2145.64	1525.91	3017.08	*
	18	4225.4	3004.96	5941.52	
	24	10358.94	7366.92	14566.14	*
	30.5	14730.84	10476.07	20713.65	
	48	12788.94	8883.51	18411.29	
13-cis Retinol (6,5 μ M)	6	24206.74	19053.26	30754.11	*
	18	1566.29	1232.84	1989.94	*
	24	2449.49	1928.01	3112.03	*
	30.5	7388.85	5815.8	9387.36	
	48	9121.25	7179.39	11588.34	

13-cis Retinol (13 μ M)	6	10676.12	8198.49	13902.51	*
	18	21291.85	16055.2	28236.52	*
	24	1487.8	1142.52	1937.42	*
	30.5	4718.92	3623.79	6145	*
	48	9336.9	7170.06	12158.57	
All-trans Retinol (1,6M)	6	9371.77	7500.2	11710.38	*
	18	15063.53	12055.29	18822.44	*
	24	25970.56	20784.14	32451.18	*
	30.5	20794.84	16642.04	25983.93	*
	48	15528.59	12586.82	19157.91	*
All-trans Retinol (3,2 μ M)	6	22081.07	17888.19	27256.73	*
	18	19344.84	15169.23	24669.86	*
	24	1331.74	1044.28	1698.33	*
	30.5	2743.69	2222.7	3386.79	*
	48	5290.59	4285.99	6530.68	*
All-trans Retinol (6,5 μ M)	6	8095.17	6415.38	10214.8	*
	18	13594.81	10602.2	17432.14	*
	24	17131.47	13096.81	22409.05	
	30.5	1549.33	1227.84	1955.01	
	48	4116.67	3262.44	5194.58	*
All-trans Retinol (13 μ M)	6	10017.66	8077.71	12423.53	
	18	9180.18	7506.03	11227.74	
	24	11881.76	9714.93	14531.88	
	30.5	16435.75	13026.3	20737.56	
	48	886.13	724.53	1083.77	

Tab.7 zu Abb.8: ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95 %	Signifikant
ohne Stimulation	6	41.61	31.49	54.98	
	18	46.97	35.55	62.06	
	24	74.12	56.1	97.93	
	30	68.76	52.04	90.85	
	42	28.31	21.43	37.4	
	48	367.36	278.04	485.38	
Ethanol	6	82.57	62.71	108.72	*
	18	93.59	71.08	123.24	*

	24	107.22	81.43	141.18	
	30	88.18	66.97	116.11	
	42	36.64	27.82	48.24	
	48	980.45	744.61	1290.99	
DMSO	6	109.92	86.52	139.66	
	18	97.87	77.03	124.35	
	24	81.87	64.44	104.03	
	30	91.48	72	116.23	
	42	43.47	34.21	55.23	
	48	717.05	543.84	945.43	*
Mevinolin (1 μ M)	6	119.82	88.26	162.67	*
	18	143.47	105.68	194.78	
	24	121.91	89.79	165.51	
	30	111.84	82.38	151.84	*
	42	45.84	33.77	62.24	*
	48	966.02	711.54	1311.52	
Mevinolin (12,5 μ M)	6	109.21	86.01	138.68	*
	18	109.59	86.31	139.16	
	24	151.37	119.21	192.22	
	30	90.49	71.26	114.9	*
	42	41.81	32.93	53.1	*
	48	654.52	515.44	831.13	
Mevinolin (25 μ M)	6	62.6	41.62	94.17	*
	18	48.66	32.35	73.2	
	24	79.14	52.61	119.04	
	30	101.11	67.22	152.1	*
	42	37.87	25.17	56.96	*
	48	1042.93	693.32	1568.84	
Mevinolin (37 μ M)	6	115.51	93.77	142.3	*
	18	73.53	59.69	90.58	
	24	81.22	65.94	100.06	
	30	224.63	182.35	276.71	*
	42	155.59	126.31	191.66	*
	48	218.2	177.13	268.79	
Mevinolin (100 μ M)	6	114.54	95.64	137.17	*
	18	71.39	59.61	85.49	
	24	87.7	73.23	105.03	
	30	182.39	152.3	218.43	*
	42	126.22	105.4	151.17	*
	48	245.42	204.93	293.91	
5-Aza-deoxycytidin (0,5 μ M)	6	115.96	96.35	139.55	*
	18	65.77	54.65	79.15	
	24	88.43	73.48	106.42	

	30	158.55	131.75	190.81	
	42	120.34	99.99	144.82	
	48	232.7	190.91	283.65	
5-Aza-deoxycytidin (1 μ M)	6	182.01	144.55	229.16	*
	18	82.76	65.73	104.21	*
	24	101.02	80.23	127.2	
	30	169.85	134.9	213.85	
	42	141.5	112.39	178.16	
	48	260.68	207.04	328.21	*
5-Aza-deoxycytidin (5 μ M)	6	131.59	107.62	160.89	*
	18	64.14	52.46	78.42	*
	24	70.62	57.76	86.35	
	30	125.94	103	153.99	
	42	109.75	89.17	135.07	
	48	173.46	141.87	212.09	*
5-Aza-deoxycytidin (10 μ M)	6	78.5	65.3	94.38	*
	18	74.65	62.09	89.74	*
	24	95.06	79.07	114.28	
	30	111.84	93.03	134.46	
	42	39.8	33.11	47.85	
	48	549.5	451.3	669.06	*

Tab.8 zu Abb.9: ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95%	Signifikant
ohne Stimulation	6	5779.69	5101	6548.68	
	18	4880.37	4307.29	5529.71	
	24	3503.65	3092.23	3969.81	
	30	3534.48	3119.44	4004.74	
	42	3254.29	2872.15	3687.27	
	48	2562.09	2241.82	2928.13	
Ethanol	6	6231.84	4896.45	7931.42	*
	18	6015.39	4726.39	7655.93	*
	24	4740.66	3724.81	6033.56	*
	30	4265.71	3351.63	5429.07	*
	42	4461.93	3505.81	5678.82	*
	48	3214.19	2525.44	4090.78	*
DMSO	6	7925.57	6358	9879.62	

	18	8334.83	6686.31	10389.78	
	24	7114.51	5707.36	8868.6	
	30	6547.85	5252.78	8162.23	
	42	6699.35	5374.31	8351.08	
	48	4616.58	3703.48	5754.79	
Mevinolin (1 μ M)	6	8286.82	6770.31	10143.02	
	18	10773.54	8801.95	13186.75	
	24	9648.65	7882.92	11809.89	*
	30	8810.48	7198.14	10783.98	*
	42	8713.5	7118.91	10665.27	*
	48	5919.34	4836.08	7245.23	*
Mevinolin (12,5 μ M)	6	7104.64	5911.87	8538.07	
	18	8786.29	7311.19	10559.01	
	24	8186.66	6812.23	9838.39	*
	30	7167.77	5964.4	8613.93	*
	42	8329.28	6930.91	10009.8	*
	48	5502.54	4578.74	6612.73	*
Mevinolin (25 μ M)	6	7059.83	5677.76	8778.31	
	18	4994.8	4016.99	6210.61	
	24	3966.76	3190.21	4932.33	*
	30	3799.77	3055.91	4724.7	*
	42	3357.52	2700.24	4174.8	*
	48	2449.16	2015.53	2976.09	*
Mevinolin (37 μ M)	6	5042.11	4445.56	5718.72	
	18	6773.73	5972.3	7682.7	
	24	6060.08	5343.09	6873.3	*
	30	5352.91	4719.58	6071.23	*
	42	6285.71	5542.02	7129.2	*
	48	5780.96	5096.99	6556.72	*
Mevinolin (100 μ M)	6	5844.34	5272.48	6478.23	
	18	6549.78	5908.89	7260.18	*
	24	6083.69	5488.41	6743.54	*
	30	5973.47	5388.98	6621.37	*
	42	6113.73	5515.51	6776.84	*
	48	5899.22	5321.99	6539.06	*
5-Aza-Deoxycytidin (0,5 μ M)	6	6377.93	5742.7	7083.43	
	18	7099.75	6392.62	7885.09	
	24	6425.63	5785.65	7136.4	

	30	6853.6	6170.99	7611.71	
	42	6235.22	5614.2	6924.93	
	48	5487.5	4940.95	6094.5	
5-Aza-Deoxycytidin (1 μ M)	6	6674.36	6004.17	7419.35	
	18	5638.29	5072.13	6267.63	
	24	6327	5691.69	7033.22	
	30	6011.95	5408.28	6683.01	
	42	5956.2	5358.12	6621.03	
	48	5682.89	5112.26	6317.22	
5-Aza-Deoxycytidin (5 μ M)	6	7031.18	6385.6	7742.03	
	18	8125.48	7379.42	8946.97	*
	24	7185.17	6525.45	7911.59	*
	30	7338.46	6664.67	8080.38	*
	42	7686.66	6980.89	8463.78	*
	48	6739.4	6120.61	7420.75	*
5-Aza-Deoxycytidin (10 μ M)	6	6193.09	4975.07	7709.3	
	18	5466.61	4391.48	6804.97	*
	24	4859.78	3903.99	6049.57	*
	30	4143.53	3328.61	5157.97	*
	42	4594.21	3690.65	5718.98	*
	48	3675.35	2952.51	4575.16	*

Tab.9 zu Abb.10: 125 I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95 %	Signifikant
ohne Stimulation	6	31.73	23.24	43.32	
	18	53.81	39.41	73.46	
	24	58.73	43.02	80.19	
	30	81.17	59.45	110.82	
	42	23.30	17.07	31.81	
	48	62.96	46.11	85.96	
DMSO	6	68.39	51.92	90.09	
	18	96.42	73.19	127.01	
	24	151.00	114.63	198.91	
	30	174.46	132.44	229.82	

	42	15.71	11.92	20.69	
	48	163.18	123.87	214.95	
Valproinsäure (0,5 mM)	6	53.48	39.24	72.87	
	18	76.34	56.03	104.03	
	24	133.99	98.33	182.58	
	30	120.50	88.43	164.20	
	42	17.29	12.69	23.56	
	48	139.21	102.16	189.69	
Valproinsäure (1 mM)	6	52.26	38.38	71.16	
	18	78.10	58.92	103.52	
	24	83.39	62.91	110.53	
	30	90.57	68.33	120.05	
	42	17.60	12.93	23.97	
	48	102.50	77.33	135.87	
Valproinsäure (3 mM)	6	112.76	88.62	143.48	
	18	77.63	61.01	98.78	
	24	134.54	105.74	171.19	
	30	106.44	83.66	135.44	
	42	16.07	12.34	20.92	
	48	112.93	88.75	143.69	
Troglitazon (2,5 μ M)	6	42.36	28.31	63.39	
	18	50.70	33.88	75.87	
	24	71.26	47.62	106.63	
	30	80.60	53.86	120.62	
	42	199.92	133.59	299.18	
	48	152.89	102.17	228.80	
Troglitazon (5 μ M)	6	40.07	27.24	58.94	
	18	23.94	16.27	35.21	
	24	122.10	83.01	179.59	
	30	80.26	54.57	118.05	
	42	245.73	167.06	361.44	
	48	156.29	106.25	229.88	
Troglitazon (10 μ M)	6	54.55	38.30	77.68	
	18	27.87	19.57	39.69	
	24	128.44	87.20	189.18	
	30	90.49	63.54	128.86	
	42	137.39	96.47	195.65	
	48	189.41	128.59	279.00	

Apicidin (10 nM)	6	38.85	27.06	55.77	
	18	19.09	13.30	27.40	
	24	94.91	66.11	136.26	
	30	74.16	51.66	106.47	
	42	57.85	40.29	83.05	
	48	125.82	87.64	180.63	
Apicidin (50 nM)	6	77.23	59.61	100.05	
	18	72.66	56.08	94.13	
	24	67.01	51.72	86.82	
	30	91.29	70.47	118.28	
	42	19.69	15.20	25.51	
	48	88.14	68.04	114.20	
Apicidin (100 nM)	6	53.87	33.14	87.56	
	18	52.02	32.01	84.56	
	24	31.19	19.19	50.70	
	30	59.56	36.64	96.81	
	42	22.02	13.55	35.79	
	48	63.49	39.06	103.20	
Apicidin (200 nM)	6	46.93	37.14	59.30	
	18	52.44	41.50	66.27	
	24	27.01	21.37	34.13	
	30	51.32	40.61	64.85	
	42	51.83	41.02	65.50	
	48	47.13	37.30	59.56	
Apicidin (500 nM)	6	28.17	21.58	36.77	*
	18	23.94	18.33	31.25	
	24	24.92	19.09	32.53	
	30	28.98	22.20	37.83	
	42	46.69	35.76	60.95	
	48	29.79	22.82	38.89	
APHA (0,5 μ M)	6	78.31	62.11	98.73	
	18	70.83	56.18	89.30	
	24	38.49	30.52	48.52	
	30	58.14	46.11	73.31	
	42	39.77	31.54	50.15	*
	48	56.98	45.19	71.84	
APHA (1 μ M)	6	50.77	42.23	61.04	
	18	58.60	48.74	70.46	
	24	27.97	23.26	33.62	
	30	74.73	62.15	89.84	
	42	36.33	30.22	43.68	*

	48	58.26	48.45	70.04	
APHA (5 µM)	6	42.26	34.20	52.23	
	18	54.16	43.82	66.93	
	24	34.29	27.75	42.38	
	30	50.66	40.99	62.61	
	42	34.41	27.85	42.53	*
	48	53.40	43.21	65.99	
APHA (10 µM)	6	39.56	24.86	62.96	
	18	22.63	14.22	36.01	
	24	70.92	44.57	112.86	
	30	43.49	27.33	69.20	
	42	50.55	31.76	80.43	
	48	89.48	56.23	142.39	

Tab.10 zu Abb.11: ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95 %	Signifikant
ohne Stimulation	6	4024.94	3244.72	4992.76	
	18	19303.55	15561.65	23945.21	
	24	26824.81	21624.95	33275.00	
	30	45704.15	36844.63	56694.00	
	42	40592.44	32723.80	50353.14	
	48	4748.37	3827.92	5890.14	
DMSO	6	6461.59	5236.68	7973.02	
	18	28993.62	23497.36	35775.51	*
	24	32172.89	26073.94	39698.44	
	30	46289.38	37514.40	57116.91	
	42	47004.57	38094.01	57999.39	
	48	3745.98	2992.12	4689.76	
Valproinsäure (0,5 mM)	6	4551.08	3054.55	6780.80	*
	18	27833.14	18680.81	41469.49	
	24	20868.39	14006.27	31092.48	
	30	43203.02	28996.63	64369.56	
	42	38034.41	25527.61	56668.69	
	48	5294.02	3553.20	7887.73	
Valproinsäure (1 mM)	6	5462.83	4085.31	7304.85	
	18	26926.08	20136.31	36005.30	
	24	25249.55	18882.54	33763.45	

	30	34416.39	25737.84	46021.27	
	42	20962.45	15676.49	28030.79	
	48	5204.80	3892.34	6959.81	
Valproinsäure (3 mM)	6	5681.82	4104.90	7864.52	
	18	23157.42	16730.35	32053.48	
	24	26998.99	19505.74	37370.82	
	30	40425.88	29206.16	55955.73	
	42	37876.95	27364.65	52427.61	
	48	5932.46	4285.98	8211.45	
Troglitazon (2,5 µM)	6	8908.62	7486.98	10600.20	
	18	36008.76	30262.47	42846.17	
	24	51135.83	42975.56	60845.59	
	30	56768.23	47709.14	67547.47	
	42	52846.43	44413.18	62881.00	
	48	4863.27	3978.73	5944.46	
Troglitazon (5 µM)	6	9576.06	8528.90	10751.79	*
	18	39690.76	35350.51	44563.89	
	24	51478.10	45848.89	57798.45	
	30	58455.63	52063.41	65632.67	
	42	54539.62	48575.63	61235.86	
	48	6378.42	5635.68	7219.03	
Troglitazon (10 µM)	6	5486.23	4296.75	7005.01	
	18	33619.07	26811.71	42154.79	
	24	43164.52	34931.07	53338.63	
	30	51635.66	41786.38	63806.47	
	42	46247.15	37425.71	57147.86	
	48	3420.47	2678.87	4367.37	
Apicidin (10 nM)	6	8286.77	6487.08	10585.75	
	18	40292.41	31541.84	51470.64	
	24	51062.91	39973.23	65229.16	
	30	59527.66	46599.64	76042.27	
	42	52708.53	41261.46	67331.32	
	48	8558.63	6699.89	10933.03	
Apicidin (50 nM)	6	6008.74	4984.50	7243.44	
	18	56006.34	46459.61	67514.78	
	24	67568.39	55332.23	82510.46	
	30	72423.90	60078.67	87305.90	
	42	56929.75	46620.16	69519.19	

	48	4088.42	3427.96	4876.13	
Apicidin (100 nM)	6	16049.76	9123.75	28233.45	
	18	18186.04	10338.15	31991.41	
	24	20299.01	10933.70	37686.19	
	30	20810.30	11829.95	36607.79	
	42	18865.21	10724.24	33186.16	
	48	7258.77	4126.36	12769.03	
Apicidin (200 nM)	6	11447.49	7819.43	16758.90	
	18	11340.13	7746.09	16601.73	
	24	12819.20	8756.41	18767.06	
	30	21261.02	14522.75	31125.72	
	42	15053.54	9915.26	22854.59	
	48	5815.00	3972.05	8513.04	
Apicidin (500 nM)	6	9335.20	6927.88	12579.03	
	18	7106.70	5274.06	9576.17	
	24	10912.93	8098.75	14704.99	
	30	16446.88	12205.63	22161.90	
	42	18333.52	13605.75	24704.12	
	48	10209.18	7576.48	13756.70	
APHA (0,5 μ M)	6	12478.21	10260.84	15174.75	
	18	21441.70	17305.34	26566.74	
	24	28682.71	22571.20	36449.01	
	30	25850.98	21257.29	31437.37	
	42	25214.43	20350.27	31241.24	
	48	5147.89	4233.12	6260.35	
APHA (1 μ M)	6	17398.27	12382.26	24446.25	
	18	20046.70	13811.44	29096.92	
	24	18290.06	13016.94	25699.30	
	30	32722.38	22544.51	47495.11	
	42	25080.35	17279.44	36403.04	
	48	3952.62	2723.21	5737.05	
APHA (5 μ M)	6	11628.45	8334.76	16223.73	
	18	26825.90	19227.61	37426.84	
	24	34479.78	23940.41	49658.95	
	30	28953.43	20752.53	40395.11	
	42	32219.23	23093.32	44951.49	
	48	5578.42	3998.37	7782.88	
APHA (10 μ M)	6	6652.17	4587.15	9646.81	
	18	32723.34	23113.33	46328.98	
	24	40317.54	28477.31	57080.67	
	30	48583.87	34316.03	68783.96	

	42	49000.62	34610.39	69373.99	
	48	7381.40	5213.67	10450.43	

Tab.11 zu Abb.12: ¹²⁵I-Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbaustanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95 %	Signifikant
ohne Stimulation	6	278.69	186.89	415.58	
	18	147.45	106.41	204.33	
	24	128.66	92.85	178.30	
	30	136.60	98.57	189.29	
	42	224.90	162.30	311.66	
	48	278.37	200.88	385.75	
DMSO	6	312.59	265.38	368.18	
	18	118.68	100.76	139.79	
	24	163.42	138.74	192.49	
	30	105.23	89.34	123.95	
	42	243.67	206.88	287.01	
	48	188.79	160.29	222.37	
Arsentrioxid (2 µM)	6	111.85	95.30	131.28	
	18	80.38	68.48	94.34	
	24	86.03	73.30	100.97	
	30	105.12	89.57	123.38	
	42	162.17	138.17	190.34	
	48	117.68	100.27	138.12	
AKT-Inhibitor V (1 µM)	6	332.36	273.29	404.19	
	18	106.16	87.29	129.10	
	24	141.65	116.48	172.27	
	30	112.63	92.61	136.97	
	42	195.26	160.56	237.46	
	48	183.78	151.12	223.50	
AKT-Inhibitor V (5 µM)	6	157.65	134.38	184.95	
	18	107.13	91.32	125.68	
	24	136.24	116.13	159.83	
	30	147.09	125.38	172.55	
	42	186.45	158.93	218.73	
	48	168.18	143.36	197.30	
AKT-Inhibitor V (10 µM)	6	325.70	285.47	371.61	

	18	115.70	101.41	132.01	
	24	120.41	105.53	137.37	
	30	110.79	97.10	126.40	
	42	217.53	190.66	248.19	
	48	211.02	184.95	240.76	
AKT-Inhibitor V (20 μ M)	6	141.16	114.70	173.72	
	18	100.68	81.81	123.90	
	24	103.04	83.73	126.81	
	30	131.27	106.67	161.55	
	42	166.10	134.97	204.41	
	48	164.63	133.77	202.60	
AKT-Inhibitor V (1 μ M)+ 2 μ M Arsentrioxid	6	332.77	285.10	388.40	
	18	113.67	97.39	132.67	
	24	106.88	91.57	124.75	
	30	109.82	94.09	128.18	
	42	223.19	191.22	260.50	
	48	234.45	200.86	273.64	
AKT-Inhibitor V (5 μ M)+ 2 μ M Arsentrioxid	6	126.60	109.59	146.25	*
	18	90.35	78.21	104.37	
	24	101.24	87.64	116.95	
	30	108.43	93.86	125.26	
	42	157.59	136.42	182.05	
	48	143.83	124.51	166.15	
AKT-Inhibitor V (10 μ M)+ 2 μ M Arsentrioxid	6	293.88	254.12	339.85	
	18	108.03	93.42	124.93	
	24	144.40	124.87	166.99	
	30	117.05	101.22	135.36	
	42	217.55	188.12	251.58	
	48	216.64	187.33	250.53	
AKT-Inhibitor V (20 μ M)+ 2 μ M Arsentrioxid	6	293.88	254.12	339.85	*
	18	108.03	93.42	124.93	
	24	144.40	124.87	166.99	
	30	117.05	101.22	135.36	
	42	217.55	188.12	251.58	
	48	216.64	187.33	250.53	*

Tab.12 zu Abb.13: ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95 %	Signifikant
ohne Stimulation	6	5549.30	4140.63	7437.19	
	18	14186.32	10116.38	19893.65	
	24	8482.56	6329.30	11368.38	
	30	11741.63	8373.05	16465.43	
	42	7424.44	5539.78	9950.28	
	48	11279.98	8416.61	15117.48	
DMSO	6	1226.46	1075.25	1398.94	*
	18	3281.88	2877.25	3743.42	
	24	3937.01	3451.60	4490.67	
	30	4006.70	3512.70	4570.17	
	42	3201.85	2807.08	3652.12	
	48	3119.45	2734.85	3558.14	
Arsentrioxid (2 μM)	6	1125.67	963.18	1315.57	
	18	2434.00	2082.66	2844.62	
	24	3277.13	2804.08	3829.98	
	30	2371.94	2029.55	2772.08	
	42	1758.43	1504.60	2055.08	
	48	1578.07	1350.28	1844.29	
AKT-Inhibitor V (1 μM)	6	1724.77	1428.61	2082.33	*
	18	5907.81	4893.38	7132.55	*
	24	6509.40	5391.66	7858.85	
	30	7522.73	6230.99	9082.25	
	42	6853.41	5676.60	8274.18	
	48	6047.47	5009.05	7301.15	
AKT-Inhibitor V (5 μM)	6	6234.39	4686.75	8293.07	*
	18	9977.29	7500.51	13271.93	*
	24	11919.88	8960.87	15856.00	
	30	6986.67	5252.28	9293.77	*
	42	8115.13	6100.62	10794.87	
	48	7966.74	5989.06	10597.48	*
AKT-Inhibitor V (10 μM)	6	1611.75	1342.76	1934.64	*
	18	5262.65	4384.34	6316.91	*
	24	5393.06	4492.99	6473.44	
	30	5841.63	4866.69	7011.88	
	42	5067.52	4221.78	6082.69	

	48	5808.09	4838.75	6971.62	
AKT-Inhibitor V (20 µM)	6	1391.61	1210.44	1599.89	*
	18	5706.79	4963.85	6560.92	*
	24	5582.67	4855.89	6418.23	
	30	4292.80	3733.94	4935.31	*
	42	4304.63	3744.23	4948.90	
	48	4342.37	3777.06	4992.30	*
AKT-Inhibitor V (1 µM)+ Arsentrioxid (2 µM)	6	1744.44	1496.12	2033.98	*
	18	5600.98	4803.68	6530.62	*
	24	5911.86	5070.30	6893.09	
	30	6653.21	5706.13	7757.50	
	42	5550.86	4760.69	6472.17	
	48	6947.88	5958.84	8101.07	
AKT-Inhibitor V (5 µM)+ Arsentrioxid (2 µM)	6	1377.20	1196.39	1585.34	*
	18	5370.06	4665.03	6181.64	*
	24	5327.57	4628.12	6132.73	
	30	5009.45	4351.76	5766.53	*
	42	5019.55	4360.54	5778.16	
	48	4443.66	3860.26	5115.24	*
AKT-Inhibitor V (10 µM)+ Arsentrioxid (2 µM)	6	1562.28	1387.69	1758.83	*
	18	5299.54	4707.31	5966.27	*
	24	6336.19	5628.11	7133.35	*
	30	5921.83	5260.06	6666.85	*
	42	5090.92	4522.00	5731.41	*
	48	5635.73	5005.93	6344.76	*
AKT-Inhibitor V (20 µM)+ Arsentrioxid (2 µM)	6	1165.25	971.75	1397.27	*
	18	5064.59	4223.59	6073.07	*
	24	4819.27	4019.00	5778.89	*
	30	4096.46	3416.22	4912.15	*
	42	3649.16	3043.19	4375.78	*
	48	3189.89	2660.19	3825.07	*

Tab.13 zu Abb.14: ^{125}I -Iodidaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95 %	Signifikant
ohne Stimulation	6	140.53	109.01	181.18	
	18	110.55	85.75	142.53	
	24	104.59	81.13	134.84	
	30	204.63	158.72	263.81	
	42	168.64	130.81	217.42	
	48	652.48	506.10	841.20	
DMSO	6	160.53	123.00	209.50	
	18	97.01	74.33	126.60	
	24	104.86	80.35	136.85	
	30	162.92	124.83	212.62	
	42	135.99	104.20	177.48	
	48	176.77	132.05	236.63	*
Arsentrioxid (2 µM)	6	76.27	64.01	90.87	
	18	63.80	53.54	76.01	
	24	48.90	41.05	58.27	
	30	83.18	69.82	99.11	
	42	150.30	126.15	179.08	
	48	91.26	76.60	108.74	*
AKT-Inhibitor I (1 µM)	6	130.41	85.65	198.56	
	18	114.78	75.39	174.77	
	24	77.53	50.92	118.05	
	30	186.97	122.79	284.68	
	42	164.05	107.74	249.79	
	48	275.09	180.67	418.86	*
AKT-Inhibitor I (5 µM)	6	94.68	80.90	110.82	
	18	94.47	80.71	110.56	
	24	114.64	97.95	134.18	
	30	138.22	118.09	161.78	
	42	167.22	142.88	195.72	
	48	95.18	81.32	111.40	*
AKT-Inhibitor I (10 µM)	6	78.93	59.85	104.09	
	18	66.26	50.24	87.38	
	24	99.11	75.15	130.70	
	30	213.94	162.23	282.13	
	42	150.61	114.21	198.62	
	48	156.77	115.78	212.27	*
AKT-Inhibitor I (20 µM)	6	74.84	59.68	93.86	

	18	65.12	51.92	81.66	
	24	49.06	39.12	61.53	
	30	143.89	114.74	180.46	*
	42	118.91	94.82	149.13	
	48	92.88	74.06	116.48	*
AKT-Inhibitor I (1 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	165.15	127.57	213.79	
	18	107.49	83.03	139.15	
	24	95.03	73.41	123.02	
	30	219.23	169.35	283.79	
	42	169.87	131.22	219.90	
	48	191.82	144.57	254.51	*
AKT-Inhibitor I (5 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	81.79	61.33	109.09	
	18	52.43	39.31	69.92	
	24	56.09	42.05	74.81	
	30	91.97	68.95	122.66	*
	42	112.01	83.98	149.40	
	48	85.47	64.08	113.99	*
AKT-Inhibitor I (10 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	143.63	116.00	177.84	
	18	97.42	78.68	120.62	
	24	107.63	86.93	133.27	
	30	181.58	146.65	224.83	
	42	169.58	136.96	209.98	
	48	168.33	133.21	212.72	*
AKT-Inhibitor I (20 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	72.18	60.18	86.56	
	18	97.26	81.10	116.64	
	24	48.61	40.53	58.30	
	30	87.42	72.89	104.84	*
	42	118.09	98.47	141.63	
	48	87.56	73.01	105.01	*

Tab.14 zu Abb.15: ^3H -Thymidinaufnahme in maligne humane Thyreozyten, gemessen in cpm. Die Ergebnisse werden als geometrische Mittel mit ihren 95%-Konfidenzintervallen dargestellt, n=6. Signifikante Werte (*) resultieren für eine Alpha-Adjustierung nach Bonferroni-Holm getrennt nach Einbausubstanz.

Stimulation	Erntezeit	Least Sq mean	Lower 95%	Upper 95%	Signifikant
ohne Stimulation	6	7991.71	4765.76	13401.30	

	18	15495.08	9240.31	25983.72	
	24	6043.58	3604.02	10134.49	
	30	14885.91	8877.03	24962.19	
	42	13542.21	8075.74	22708.95	
	48	9185.62	5477.74	15403.38	
DMSO	6	2640.45	2117.95	3291.84	
	18	8152.42	6539.22	10163.60	
	24	6760.39	5422.64	8428.15	
	30	8842.56	7092.79	11023.99	
	42	9882.64	7927.06	12320.66	
	48	7792.44	6250.46	9714.81	
Arsentrioxid (2 μ M)	6	2980.27	2452.73	3621.26	
	18	9455.40	7781.71	11489.06	
	24	8436.86	6943.46	10251.46	
	30	9401.03	7736.96	11423.00	*
	42	8788.10	7232.53	10678.24	
	48	8453.69	6957.31	10271.91	
AKT-Inhibitor I (1 μ M)	6	4437.79	3755.93	5243.43	
	18	17912.87	15160.59	21164.81	
	24	18405.22	15577.29	21746.54	
	30	17648.84	14937.13	20852.84	
	42	17577.87	14877.07	20768.99	
	48	13370.62	11316.25	15797.94	
AKT-Inhibitor I (5 μ M)	6	9877.91	7723.82	12632.75	
	18	13764.09	10762.54	17602.74	
	24	11192.97	8752.11	14314.57	
	30	4533.74	3545.06	5798.15	
	42	8535.78	6674.37	10916.31	
	48	8643.56	6758.65	11054.15	
AKT-Inhibitor I (10 μ M)	6	3808.63	2553.41	5680.88	
	18	13119.77	8795.87	19569.23	
	24	8919.71	5980.03	13304.49	
	30	11515.35	7720.22	17176.10	
	42	10630.41	7126.93	15856.15	
	48	7119.52	4773.13	10619.36	
AKT-Inhibitor I (20 μ M)	6	5052.66	4246.41	6012.00	
	18	13789.87	11589.42	16408.12	
	24	11706.70	9838.66	13929.43	
	30	11194.19	9407.93	13319.60	
	42	12423.33	10440.93	14782.11	

	48	9010.34	7572.56	10721.11	
AKT-Inhibitor I (1 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	4129.18	2930.18	5818.81	
	18	15161.12	10758.74	21364.92	
	24	10481.20	7437.74	14770.02	
	30	14660.52	10403.49	20659.48	
	42	12503.94	8873.13	17620.45	
	48	6652.08	4720.49	9374.05	
AKT-Inhibitor I (5 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	4115.61	3264.27	5188.97	
	18	13418.35	10642.70	16917.89	
	24	15316.11	12147.90	19310.60	
	30	13072.83	10368.65	16482.26	
	42	11902.02	9440.03	15006.10	
	48	10143.95	8045.63	12789.53	
AKT-Inhibitor I (10 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	3806.92	3006.37	4820.63	
	18	17467.70	13794.48	22119.03	
	24	11861.68	9367.33	15020.23	
	30	15752.88	12440.26	19947.58	
	42	13308.89	10510.21	16852.81	
	48	10035.22	7924.95	12707.42	
AKT-Inhibitor I (20 μ M)+ Arsentrioxid (2 μ M)	6	5168.87	3909.91	6833.19	
	18	15606.39	11805.23	20631.49	
	24	13935.33	10541.18	18422.37	
	30	13790.55	10431.66	18230.96	
	42	12906.58	9762.99	17062.36	
	48	8931.96	6756.45	11807.96	

Tab. 15 und 16 zu Abb.16. Apoptoserate der kultivierten malignen humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 in Prozent. Angegeben sind Einzelwerte, Mittelwert, sowie STABW und SEM.

Stimulanzen	24 Stunden				
	Wert 1	Wert 2	Wert	SD	SEM
ohne Stimulation	5,13	5,60	4,77	0,34	0,19
Methanol	4,03	4,25	4,43	0,16	0,09
All-trans Retinol (3,2 μ M)	4,80	6,68	4,92	0,86	0,50
13-cis Retinol (3,2 μ M)	5,59	5,54	10,76	2,45	1,41
All-transRetinsäure (1 μ M)	10,12	7,35	16,39	3,78	2,18
9-cis Retinsäure (1 μ M)	6,22	12,84	13,68	3,34	1,93
13-cis Retinsäure (2 μ M)	7,01	9,23	12,08	2,08	1,19
Staurosporin (2.5 μ M)	66,87	72,98	65,62	3,22	1,86

Stimulanzen	48Stunden				
	Wert 1	Wert 2	Wert	SD	SEM
ohne Stimulation	4,08	3,77	4,10	0,15	0,09
Methanol	3,18	2,92	3,23	0,14	0,08
All-trans Retinol (3,2 µM)	3,40	3,53	3,90	0,21	0,21
13-cis Retinol (3,2 µM)	3,67	3,10	4,13	0,42	0,24
All-transRetinsäure (1 µM)	3,57	7,38	3,97	1,71	0,98
9-cis Retinsäure (1 µM)	4,00	3,70	3,62	0,16	0,09
13-cis Retinsäure (2 µM)	3,68	4,12	3,75	0,19	0,10
Staurosporin (2.5 µM)	80,17	79,92	61,08	8,94	5,20

Tab. 17 zu Abb.17: Nachweis von NIS durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 24 und 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 \ Zeit in h	24	48
0'Wert	20	-
keine Stimulation	20	60
Methanol	50	80
Retinol	20	90
13-cis Retinol	20	90
Retinsäure	10	60
9-cis Retinsäure	60	90
13-cis Retinsäure	80	60

Tab. 18 zu Abb.18: Nachweis von Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungssubstanzen behandelt, nach 24 und 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 \ Zeit in h	24	48
Nullwert	20	
keine Stimulation	5	10
Methanol	0	5
Retinol	35	20
13-cis Retinol	30	40
Retinsäure	5	40
9-cis Retinsäure	7,5	25
13-cis Retinsäure	7,5	25

Tab. 19 u. 20 zu Abb.19. Apoptoserate der kultivierten malignen humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 in Prozent. Angegeben sind Einzelwerte, Mittelwert, sowie STABW und SEM.

Stimulanzen	24 Stunden				
	Wert 1	Wert 2	Wert	SD	SEM
ohne Stimulation	9,32	8,50	8,07	0,52	0,55
DMSO	14,00	13,87	14,90	0,46	0,51
Ethanol	9,83	11,37	10,00	0,69	0,63
Apicidin 0,2 µM	12,13	12,93	15,15	1,28	0,85
Valproinsäure 1000 µM	11,83	9,85	8,75	1,27	0,86
Troglitazon 5 µM	8,05	8,38	9,70	0,71	0,64
5-Aza-deoxycytidin 10 µM	10,28	7,60	9,43	1,12	0,80
Mevinolin 37 µM	18,80	22,25	22,40	1,66	0,98
Staurosporin 2.5 µM	86,53	89,65	87,10	1,36	0,88

Stimulanzen	48 Stunden				
	Wert 1	Wert 2	Wert	SD	SEM
ohne Stimulation	9,35	10,27	11,38	0,83	0,69
DMSO	21,40	18,73	21,83	1,37	0,89
Ethanol	11,25	11,78	12,30	0,43	0,49
Apicidin 0,2 µM	11,05	13,13	11,85	0,86	0,70
Valproinsäure 1000 µM	11,63	9,43	9,70	0,98	0,75
Troglitazon 5 µM	13,63	10,53	9,67	1,70	0,99
5-Aza-deoxycytidin 10 µM	11,42	12,18	11,07	0,46	0,52
Mevinolin 37 µM	92,80	92,82	91,97	0,40	0,48
Staurosporin 2.5 µM	91,22	92,08	93,63	1,00	0,76

Tab.21 zu Abb.20.: Nachweis von NIS durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungs-substanzen behandelt, nach 24 und 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 \ Zeit in h	24	48
	O'Wert	50
keine Stimulation	45	5
DMSO	10	50
Ethanol	20	20
Aicidin	30	15
Valproinsäure	30	60
Troglitazon	30	35
5-Azadeoxycytidin	10	5

Mevinolin	20	20
-----------	----	----

Tab.22 zu Abb.21.: Nachweis von Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungs-substanzen behandelt, nach 24 und 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.

Zeit in h Stimulation	24	48
Nullwert	50	
keine Stimulation	50	20
DMSO	20	30
Ethanol	20	70
Aicidin	25	35
Valproinsäure	20	60
Troglitazon	30	40
5-Azadeoxycytidin	0	5
Mevinolin	60	10

Tab. 23 u. 24 zu Abb.21. Apoptoserate der kultivierten malignen humanen Thyreozyten der Zelllinie ONCO-DG 1 in Prozent. Angegeben sind Einzelwerte, Mittelwert, sowie STABW und SEM.

Stimulanzen	24 Stunden				
	Wert 1	Wert 2	Wert	SD	SEM
ohne Stimulation	28,87	22,42	23,32	2,85	1,28
DMSO	27,80	28,75	24,07	2,02	1,08
AKT I 20 μ M	48,68	46,07	45,13	1,50	0,93
AKT I (20 μ M) + ATO (2 μ M)	44,83	47,30	44,70	1,20	0,83
AKT V (20 μ M)	60,22	62,00	62,12	0,87	0,70
AKT V (20 μ M) + ATO (2 μ M)	60,08	58,68	58,18	0,80	0,68
Arsentrioxid (2 μ M)	22,03	21,83	23,13	0,57	0,57
Staurosporin	61,28	85,07	84,23	11,02	2,52
H ₂ O ₂ (10 μ M)	96,53	83,83	88,95	5,22	1,73
APHA Compund 8 (5 μ M)	35,92	41,43	33,23	3,41	1,40

Stimulanzen	48 Stunden				
	Wert 1	Wert 2	Wert	SD	SEM
ohne Stimulation	32,38	29,43	24,08	3,44	1,40
DMSO	28,63	27,77	25,02	1,51	0,94
AKT I 20 μ M	51,82	51,95	55,82	1,86	1,03
AKT I (20 μ M) + ATO (2 μ M)	60,53	55,25	57,10	2,19	1,12
AKT V (20 μ M)	71,67	69,48	72,93	1,43	0,90

AKT V (20 μ M) + ATO (2 μ M)	74,42	71,15	69,82	1,93	1,06
Arsentrioxid (2 μ M)	19,55	19,72	18,57	0,51	0,54
Staurosporin	51,32	63,03	53,45	5,09	1,71
H ₂ O ₂ (10 μ M)	90,22	91,08	91,17	0,43	0,50
APHA Compund 8 (5 μ M)	37,65	45,98	49,12	4,84	1,67

Tab.25 zu Abb.22: Nachweis von NIS durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungs-substanzen behandelt, nach 24 und 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.

Zeit in h Stimulation	24	48
Nullwert	20	
keine Stimulation	30	10
DMSO	10	40
AKT I	40	40
AKT I + As	30	30
AKT V	50	50
AKT V + As	40	50
Arsen	40	40
APHA	30	30

Tab.26 zu Abb.23: Nachweis von Pendrin durch Immunzytochemie. Den kultivierten malignen humanen Thyreozyten wurden mit verschiedenen Differenzierungs-substanzen behandelt, nach 24 und 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.

Zeit in h Stimulation	24	48
Nullwert	20	
keine Stimulation	10	20
DMSO	20	30
AKT I	40	10
AKT I + As	30	40
AKT V	10	20
AKT V + As	20	20
Arsen	10	20
APHA	20	10

Auswertung der Ergebnisse der ¹²⁵I-Iodidaufnahme und ³H-Thymidinaufnahme Kapitel 4.2.1-4.2.3:

Anmerkungen zum Shapiro-Wilk-Test

Normalverteilungstests überprüfen die Verteilungsform von stetigen Zahlen einer Stichprobe. Eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung besteht bei $p < 0,05$; in diesem Falle sind für die betreffende Variablen nichtparametrische Tests zu benutzen. Die Durchführung von Normalverteilungstests erfolgt am häufigsten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Ist die Verteilungsfunktion unbekannt, sollte man die Lilliefors-Variante des Kolmogorov-Smirnov-Tests verwenden. Beträgt die Gesamtzahl der Stichprobe allerdings < 50 , so sollte man auf den Shapiro-Wilk-Test zurückgreifen.

Bei Analyse der Ergebnisse zeigt sich, dass alle Signifikanzen ($p > 0,05$) sind, also die Stichproben somit normalverteilt sind.

Bei den folgenden Mittelwertvergleichen der vorliegenden Stichproben liegen unabhängige Stichproben vor; d.h., dass die Werte in keinem direkten Zusammenhang stehen. Im Gegensatz dazu haben Messungen in einem Kollektiv, z.B. vor und nach Therapie, eine direkte Verbindung. Bei unabhängigen und verbundenen Stichproben kommen unterschiedliche Testverfahren zum Einsatz.

Beim Vergleich von 2 unabhängigen, normalverteilten Stichproben wird der t-Test verwendet, dagegen bei Vergleich von mehr als 2 Stichproben die einfaktorielle ANOVA. Bei signifikanten Ergebnissen der ANOVA weiß man, dass sich die getesteten Stichproben unterscheiden – welche Stichproben dies genau sind, kann man aufgrund der ANOVA nicht sagen. Daher wird eine sogenannte multiple t-Testung durchgeführt – also jeder mit jeder Gruppe. Im Nachfolgenden wird dazu der Bonferroni-Test verwendet.

Beim Vergleich von 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben wird der Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als 2 unabhängigen, nicht normalverteilten Stichproben der H-Test nach Kruskal und Wallis angewendet.

Noch einige Anmerkungen zur Signifikanz:

Eine Signifikanz bei einer statistischen Berechnung besteht, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ beträgt. Bei Angabe der Signifikanz kann entweder der exakte p-Wert (z.B. 0,003) oder das Signifikanzniveau (z.B. $p < 0,01$) angegeben werden. Es gibt folgende Signifikanzniveaus:

$p > 0,05$	nicht signifikant
$p \leq 0,05$	signifikant
$p \leq 0,01$	sehr signifikant
$p \leq 0,001$	höchst signifikant

Oftmals weichen Autoren von dieser strengen Einteilung ab und sprechen z.B. von einem hochsignifikanten Ergebnis, so dass man die Einteilung nicht zu eng sehen sollte.

SPSS gibt Ergebnisse, die $< 0,001$ sind, als ,000 an.

Signifikante Ergebnisse werden mit roter Schrift gekennzeichnet.

p-Werte, die knapp über 0,05 liegen (z.B. $p=0,06$ oder 0,07) sind statistisch nicht signifikant. Bei der Beschreibung dieser Ergebnisse verwenden viele Autoren Begriffe wie „grenzwertige Signifikanz“, was darauf hindeutet, dass der Autor z.B. in einem größeren Kollektiv eine Signifikanz erwartet. Streng statistisch ist dies falsch, wird jedoch oftmals so praktiziert.

Eine andere Möglichkeit ist, von einem „deutlichen Trend“ zu sprechen, also z.B.:

Beim Vergleich der Gruppen lässt sich zwar keine statistische Signifikanz nachweisen, jedoch kann man einen deutlichen Trend zu einer höheren Mortalität bei den älteren Patienten erkennen.

Grenzwertig signifikante Ergebnisse werden nachfolgend mit blauer Schrift gekennzeichnet.

ANOVA

Die ANOVA testet, ob es zwischen mehr als 2 unabhängigen Stichproben signifikante Unterschiede gibt. In diesem Fall ist p signifikant ($< 0,05$), so dass man daher sagen kann, dass es zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede gibt. Wenn die ANOVA ein signifikantes Ergebnis zeigt, besteht mindestens ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, wobei man durch die ANOVA nicht feststellen kann, wo der Unterschied liegt oder ob sogar mehrere signifikante Unterschiede bestehen.

In diesem Fall muss man jede Gruppe mit jeder vergleichen. Bei dieser so genannten multipler Testung besteht immer ein Risiko eines falsch positiven Ergebnisses (d.h., dass fälschlicherweise ein signifikanter Unterschied zwischen 2 Stichproben angenommen wird, der jedoch nur zufallsbedingt ist). Der Bonferroni-Test korrigiert durch Berechnung einer Signifikanz für die gesamte Testreihe das Risiko von falsch positiven Ergebnissen (so genannte α -Korrektur). Der Bonferroni-Test ist daher recht konservativ – z.B. im Gegensatz zu der LSD (geringste signifikante Differenz), bei der das Risiko falsch positiver Ergebnisse recht hoch ist, jedoch eher Signifikanzen nachgewiesen werden.

4.2.1 Abbildung: Einfluss von all-trans Retinol (3,2 μM), 13-cis Retinol (3,2 μM), all-trans Retinsäure (1 μM), 9-cis Retinsäure (1 μM) und 13-cis Retinsäure (1 μM) auf die ^{125}I -Iodid- und ^3H -Thymininkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC-238)

^{125}I -Iodidaufnahme - 24h

Tab.27 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	6	,794
Methanol	6	,260
Retinol	6	,277
13-cis Retinol	6	,445
Retinsäure	6	,544
9-cis Retinsäure	6	,128

13-cis Retinsäure	6	,165
-------------------	---	------

Tab.28 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	70,28	13,29	68,40	52,9	87,6	6
Methanol	102,40	38,126	107,15	36,6	155,5	6
Retinol	70,32	20,17	73,25	44,6	90,7	6
13-cis Retinol	105,98	37,89	107,60	55,4	146,4	6
Retinsäure	101,87	22,27	95,65	73,3	131,9	6
9-cis Retinsäure	98,62	24,96	88,55	71,7	131,0	6
13-cis Retinsäure	101	24,16	92,60	81,1	142,4	6
Insgesamt	92,92	29,07	89,95	36,6	155,5	42

Tab.29 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,096

¹²⁵I-Iodidaufnahme - 48h

Tab. 30 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

Einbaurate (cpm)	df	Signifikanz
keine	6	,042
Methanol	6	,417
Retinol	6	,734
13-cis Retinol	6	,961
Retinsäure	6	,867
9-cis Retinsäure	6	,297
13-cis Retinsäure	6	,632

Tab.31 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard-	Median	Minimum	Maximum	N
-------------	------------	-----------	--------	---------	---------	---

	t	abweichun g		m	m	
keine	81,933	47,4232	62,450	43,3	172,6	6
Methanol	73,017	18,8484	78,200	40,6	91,7	6
Retinol	66,400	13,9313	68,500	46,6	82,6	6
13-cis Retinol	61,250	15,1868	63,100	37,4	80,7	6
Retinsäure	83,233	24,5874	79,150	52,1	122,4	6
9-cis Retinsäure	70,133	19,1756	76,100	39,8	88,7	6
13-cis Retinsäure	81,350	16,4890	82,200	58,9	100,1	6
Insgesamt	73,902	24,1922	72,350	37,4	172,6	42

Tab.32 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,638

³H-Thymidinaufnahme - 24 h

Tab.33 Tests auf Normalverteilung

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	7	,919
Methanol	7	,361
13-cis Retinol	7	,485
Retinsäure	6	,566
9-cis Retinsäure	7	,586
13-cis Retinsäure	6	,878
Retinol all-trans	7	,009

Tab.34 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard- abweichun g	Media n	Minimu m	Maximu m	N
keine	10445,143	2534,9950	10329	6270,0	14309,0	7
Methanol	14522,286	4953,0599	15056	7773,0	20183,0	7
13-cis Retinol	10741,714	5414,7994	8075	4468,0	20083,0	7
Retinsäure	17168,833	8415,5126	14980	8073,0	29874,0	6
9-cis	18886,571	9698,2174	17868	5851,0	31802,0	7

Retinsäure 13-cis Retinsäure	39272,000	15648,322	41757	14241,0	59523,0	6
Retinol all- trans	11681,571	8037,8624	7528	6382,0	27513,0	7
Insgesamt	17076,298	12076,807	12174	4468,0	59523,0	47

Tab.35 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,000

Tab.36 Mehrfachvergleiche
Abhängige Variable: Einbaurate (cpm)

Bonferroni	keine	Methanol	1,000
		13-cis Retinol	1,000
		Retinsäure	1,000
		9-cis Retinsäure	1,000
		13-cis Retinsäure	,000
Methanol	keine	Retinol all-trans	1,000
		13-cis Retinol	1,000
		Retinsäure	1,000
		9-cis Retinsäure	1,000
		13-cis Retinsäure	,000
13-cis Retinol	keine	Retinol all-trans	1,000
		Methanol	1,000
		Retinsäure	1,000
		9-cis Retinsäure	1,000
		13-cis Retinsäure	,000
Retinsäure	keine	Retinol all-trans	1,000
		Methanol	1,000
		13-cis Retinol	1,000
		9-cis Retinsäure	1,000
		13-cis Retinsäure	,001
9-cis Retinsäure	keine	Retinol all-trans	1,000
		keine	1,000

	Methanol	1,000
	13-cis Retinol	1,000
	Retinsäure	1,000
	13-cis Retinsäure	,002
	Retinol all-trans	1,000
13-cis Retinsäure	keine	,000
	Methanol	,000
	13-cis Retinol	,000
	Retinsäure	,001
	9-cis Retinsäure	,002
	Retinol all-trans	,000
Retinol all-trans	keine	1,000
	Methanol	1,000
	13-cis Retinol	1,000
	Retinsäure	1,000
	9-cis Retinsäure	1,000
	13-cis Retinsäure	,000

³H-Thymidinaufnahme - 48 h

Tab.37: Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	7	,482
Methanol	8	,508
13-cis Retinol	8	,388
Retinsäure	6	,966
9-cis Retinsäure	8	,491
13-cis Retinsäure	7	,326
Retinol all-trans	6	,482

Tab. 38: Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard-abweichun g	Median	Minimum	Maximu m	N
keine	18940,14	6842,5263	16425,0	9880,0	27661,0	7
Methanol	25591,75	9850,9868	26076,0	13727,0	39985,0	8
13-cis Retinol	32814,12	15847,330	35098,0	13248,0	55223,0	8
Retinsäure	34422,33	8347,8406	33932,0	23362,0	46134,0	6
9-cis Retinsäure	56278,87	7155,8577	56997,5	46895,0	68091,0	8

13-cis Retinsäure	50482,57	10858,436	50580,0	31325,0	68275,0	7
Retinol all-trans	46642,00	5485,8911	45831,5	41113,0	56221,0	6
Insgesamt	37796,46	16009,721	40269,0	9880,0	68275,0	50

Tab.39 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,000

Tab.40 Mehrfachvergleiche
Abhängige Variable: Einbaurate (cpm)

(I) Stimulation	(J) Stimulation	Signifikanz
Bonferroni keine	Methanol	1,000
	13-cis Retinol	,215
	Retinsäure	,165
	9-cis Retinsäure	,000
	13-cis Retinsäure	,000
Methanol	Retinol all-trans	,000
	keine	1,000
	13-cis Retinol	1,000
	Retinsäure	1,000
	9-cis Retinsäure	,000
13-cis Retinol	13-cis Retinsäure	,000
	Retinol all-trans	,007
	keine	,215
	Methanol	1,000
	Retinsäure	1,000
Retinsäure	9-cis Retinsäure	,001
	13-cis Retinsäure	,029
	Retinol all-trans	,291
	keine	,165
	Methanol	1,000
9-cis Retinsäure	13-cis Retinol	1,000
	9-cis Retinsäure	,004
	13-cis Retinsäure	,125
	Retinol all-trans	,835
	keine	,000

	Methanol	,000
	13-cis Retinol	,001
	Retinsäure	,004
	13-cis Retinsäure	1,000
	Retinol all-trans	1,000
13-cis Retinsäure	keine	,000
	Methanol	,000
	13-cis Retinol	,029
	Retinsäure	,125
	9-cis Retinsäure	1,000
	Retinol all-trans	1,000
Retinol all-trans	keine	,000
	Methanol	,007
	13-cis Retinol	,291
	Retinsäure	,835
	9-cis Retinsäure	1,000
	13-cis Retinsäure	1,000

4.2.2 Abbildung: Einfluss von Apicidin (0,2 µM), Valproinsäure (1000 µM), Troglitazon (5 µM), 5-Aza-deoxycytidin (10 µM) und Mevinolin (37 µM) auf die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidininkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC 238)

¹²⁵I-Iodidaufnahme – 24

Tab.41 Tests auf Normalverteilung

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	6	,054
Api	6	,958
DMSO	6	,152
Ethanol	6	,372
Valproinsäure	6	,416
Troglitarazon	6	,047
Aza	6	,992
Mevinolin	5	,239

Tab.42 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard -	Median	Minimum	Maximum	N

		abweichung				
keine	130,367	64,5310	119,500	76,0	254,2	6
Api	132,467	30,2360	136,250	85,0	170,6	6
DMSO	149,267	30,0583	139,450	118,0	188,4	6
Ethanol	127,200	44,0615	113,050	81,8	204,3	6
Valproinsäure	141,283	38,2386	143,350	75,3	193,6	6
Troglitarazon	118,617	10,9770	112,850	109,9	135,5	6
Aza	116,167	7,5717	115,900	105,9	127,6	6
Mevinolin	158,040	49,9403	144,800	107,5	214,5	5
Insgesamt	133,668	37,9052	127,400	75,3	254,2	47

Tab.43 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,592

¹²⁵I-Iodidaufnahme – 48 h

Tab.44 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	6	,443
Api	5	,160
DMSO	6	,445
Ethanol	6	,762
Valproinsäure	6	,641
Troglitarazon	6	,689
Aza	6	,827
Mevinolin	6	,625

Tab.45 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	144,350	14,0382	147,350	124,5	158,7	6
Api	163,520	49,2678	148,200	117,7	247,0	5
DMSO	161,283	33,9529	152,800	127,8	212,8	6

Ethanol	140,400	20,5356	137,050	116,7	171,7	6
Valproinsäure	174,133	37,2100	171,600	134,9	234,4	6
Troglitarazon	166,683	23,6458	168,050	136,9	197,9	6
Aza	183,033	24,4134	185,700	150,5	213,6	6
Mevinolin	155,217	34,4524	165,200	98,3	193,3	6
Insgesamt	161,026	31,5486	156,900	98,3	247,0	47

Tab.46 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,283

³H-Thymidinaufnahme - 24 h

Tab.47 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	8	,120
Api	8	,077
DMSO	8	,570
Ethanol	8	,228
Valproinsäure	8	,295
Troglitarazon	8	,622
Aza	8	,107
Mevinolin	6	,017

Tab.48 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	1639,375	764,73	1924,0	758	2814,0	8
Api	7672,75	3409,29	7011,5	4453	14973,0	8
DMSO	11425,87	894,37	11581,5	10001	12504,0	8
Ethanol	8359	1733,72	8842,5	5503	10105,0	8
Valproinsäure	2503	366,93	2457,0	2110	3163,0	8
Troglitaraz	9799	1695,40	9611,0	6574	12041,0	8

on						
Aza	4738,125	958,6367	4467,5	3785	6749,0	8
Mevinolin	2333,500	736,5704	2075,5	1725	3783,0	6
Insgesamt	6179,000	3844,4189	5463,5	758	14973,0	62

Tab.49 ANOVA -Einbaurrate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,000

Tab.50 Mehrfachvergleiche
Abhängige Variable: Einbaurrate (cpm)

	(I) Stimulation	(J) Stimulation	Signifikanz
Bonferroni	keine	Api	,000
		DMSO	,000
		Ethanol	,000
		Valproinsäure	1,000
		Troglitarazon	,000
		Aza	,010
		Mevinolin	1,000
Api	keine	keine	,000
		DMSO	,001
		Ethanol	1,000
		Valproinsäure	,000
		Troglitarazon	,319
		Aza	,018
		Mevinolin	,000
DMSO	keine	keine	,000
		Api	,001
		Ethanol	,011
		Valproinsäure	,000
		Troglitarazon	1,000
		Aza	,000
		Mevinolin	,000
Ethanol	keine	keine	,000
		Api	1,000
		DMSO	,011
		Valproinsäure	,000
		Troglitarazon	1,000

	Aza	,001
	Mevinolin	,000
Valproinsäure	keine	1,000
	Api	,000
	DMSO	,000
	Ethanol	,000
	Troglitarazon	,000
	Aza	,224
	Mevinolin	1,000
Troglitarazon	keine	,000
	Api	,319
	DMSO	1,000
	Ethanol	1,000
	Valproinsäure	,000
	Aza	,000
	Mevinolin	,000
Aza	keine	,010
	Api	,018
	DMSO	,000
	Ethanol	,001
	Valproinsäure	,224
	Troglitarazon	,000
	Mevinolin	,231
Mevinolin	keine	1,000
	Api	,000
	DMSO	,000
	Ethanol	,000
	Valproinsäure	1,000
	Troglitarazon	,000
	Aza	,231

³H-Thymidinaufnahme - 24 h

Tab.51 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

		df	Signifikanz
Einbaurate (cpm)	keine	8	,301
	Api	8	,188
	DMSO	8	,111
	Ethanol	8	,056
	Valproinsäure	8	,399
	Troglitarazon	8	,988
	Aza	8	,581

Mevinolin	8	,977
-----------	---	------

Tab.52 Einbaerate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	1727,75	944,99	1998,0	524,0	3105,0	8
Api	5649,62	2461,90	5556,5	2871,0	8838,0	8
DMSO	11041,62	1656,91	10874,5	9156,0	14619,0	8
Ethanol	890,50	400,09	987,5	275,0	1300,0	8
Valproinsäure	7875,62	2457,75	8221,0	3694,0	10899,0	8
Troglitarazon	3095,50	380,46	3079,0	2479,0	3673,0	8
Aza	9020,25	1599,54	9201,5	6468,0	10992,0	8
Mevinolin	556,50	47,83	547,5	484,0	633,0	8
Insgesamt	4982,17	4041,05	3287,5	275,0	14619,0	64

Tab.53 ANOVA -Einbaerate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,000

Tab.54 Mehrfachvergleiche
Abhängige Variable: Einbaerate (cpm)

	(I) Stimulation	(J) Stimulation	Signifikanz
Bonferroni	keine	Api	,000
		DMSO	,000
		Ethanol	1,000
		Valproinsäure	,000
		Troglitarazon	1,000
		Aza	,000
		Mevinolin	1,000
	Api	keine	,000
		DMSO	,000
		Ethanol	,000
		Valproinsäure	,141
		Troglitarazon	,041
		Aza	,001

	DMSO	Mevinolin	,000
		keine	,000
		Api	,000
		Ethanol	,000
		Valproinsäure	,003
		Troglitarazon	,000
		Aza	,292
	Ethanol	Mevinolin	,000
		keine	1,000
		Api	,000
		DMSO	,000
		Valproinsäure	,000
		Troglitarazon	,152
	Valproinsäure	Aza	,000
		Mevinolin	1,000
		keine	,000
		Api	,141
		DMSO	,003
		Ethanol	,000
		Troglitarazon	,000
		Aza	1,000
		Mevinolin	,000
	Troglitarazon	keine	1,000
		Api	,041
		DMSO	,000
		Ethanol	,152
		Valproinsäure	,000
		Aza	,000
		Mevinolin	,043
	Aza	keine	,000
		Api	,001
		DMSO	,292
		Ethanol	,000
		Valproinsäure	1,000
		Troglitarazon	,000
	Mevinolin	Mevinolin	,000
		keine	1,000
		Api	,000
		DMSO	,000
		Ethanol	1,000
		Valproinsäure	,000
		Troglitarazon	,043
		Aza	,000

4.2.3 Abbildung: Einfluss von Akt-Inhibitor I (20 µM) und V (20 µM) mit und ohne gleichzeitiger Stimulation mit Arsentrioxid (2 µM) und APHA Compound 8 (5 µM) auf die ¹²⁵I-Iodid- und ³H-Thymidininkorporation in kultivierte humane maligne Thyreozyten (Zelllinie FTC 238)

¹²⁵I-Iodidaufnahme - 5h

Tab.55 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurrate (cpm) keine	6	,002
DMSO	6	,897
AKT I	6	,980
AKT I + Arsen	6	,293
AKT V	6	,289
AKT V + Arsen	6	,462
Apha	6	,666
Arsen	6	,341

Tab.56 Einbaurrate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard-abweichun g	Median	Minimu m	Maximu m	N
keine	118,200	23,3104	111,150	102,1	165,1	6
DMSO	115,950	44,6580	118,800	59,1	186,1	6
AKT I	110,350	18,6825	109,150	86,7	138,5	6
AKT I + Arsen	108,583	7,5438	110,500	97,0	115,4	6
AKT V	134,733	46,3401	118,900	89,3	202,3	6
AKT V + Arsen	95,133	18,8686	98,150	62,5	113,6	6
Apha	94,450	14,9592	91,350	78,5	118,1	6
Arsen	104,183	13,8630	109,000	80,6	117,5	6
Insgesamt	110,198	27,9027	107,200	59,1	202,3	48

Tab.57 ANOVA -Einbaurrate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,225

¹²⁵I-Iodidaufnahme - 22h

Tab.58 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	6	,252
DMSO	6	,529
AKT I	6	,894
AKT I + Arsen	6	,953
AKT V	5	,811
AKT V + Arsen	6	,556
Apha	6	,033
Arsen	6	,824

Tab.59 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	93,733	37,0985	79,300	57,4	149,0	6
DMSO	89,433	21,5650	88,100	62,5	116,2	6
AKT I	85,950	16,5515	86,150	61,3	108,7	6
AKT I + Arsen	97,333	14,5263	97,250	75,2	115,7	6
AKT V	110,700	24,7190	117,400	75,4	137,8	5
AKT V + Arsen	124,367	27,9446	125,200	76,4	161,9	6
Apha	126,333	16,7636	117,000	113,0	153,0	6
Arsen	86,033	19,6587	84,900	63,3	115,8	6
Insgesamt	101,545	26,7045	99,800	57,4	161,9	47

Tab.60 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,013

¹²⁵I-Iodidaufnahme - 42h

Tab.61 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	6	,645
DMSO	6	,393
AKT I	6	,551

AKT I + Arsen	6	,530
AKT V	6	,363
AKT V + Arsen	6	,485
Apha	6	,783
Arsen	6	,101

Tab.62 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	150,717	54,1614	164,800	63,6	212,7	6
DMSO	154,317	57,5612	151,300	77,2	254,4	6
AKT I	127,583	46,3601	122,650	77,7	191,7	6
AKT I + Arsen	151,667	38,5383	139,550	106,5	209,1	6
AKT V	174,700	19,1630	180,700	147,9	194,9	6
AKT V + Arsen	154,883	39,3832	160,450	98,3	194,8	6
Apha	190,333	41,5001	197,650	129,3	240,6	6
Arsen	135,900	23,8582	147,500	97,4	157,4	6
Insgesamt	155,013	43,0617	153,350	63,6	254,4	48

Tab.63 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,251

¹²⁵I-Iodidaufnahme - 46h

Tab.64 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	6	,559
DMSO	6	,859
AKT I	6	,255
AKT I + Arsen	6	,254
AKT V	6	,524

AKT V + Arsen	6	,682
Apha	6	,747
Arsen	6	,388

Tab.65 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard- abweichun g	Median	Minimum	Maximum	N
keine	102,32	41,42	90,75	52,2	172,2	6
DMSO	95,78	24,43	91,45	66,0	133,5	6
AKT I	97,03	20,89	103,10	67,8	117,2	6
AKT I + Arsen	105,25	24,69	104,50	78,3	133,4	6
AKT V	107,37	12,32	106,40	91,4	121,4	6
AKT V + Arsen	115,57	19,12	117,30	82,4	139,1	6
Apha	105,53	15,28	101,30	86,9	128,8	6
Arsen	107,50	12,47	103,60	93,3	129,5	6
Insgesamt	104,54	22,12	103,60	52,2	172,2	48

Tab.66 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,866

³H-Thymidinaufnahme - 5h

Tab.67 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	8	,842
DMSO	8	,243
AKT I	8	,454
AKT I + Arsen	8	,812
AKT V	8	,927
AKT V + Arsen	8	,025
Apha	8	,241
Arsen	8	,755

Tab.68 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	4811,87	583,5606	4808,5	3959,0	5653,0	8
DMSO	5253,50	679,0979	5284,0	4354,0	6055,0	8
AKT I	2622,00	589,7542	2634,5	1622,0	3327,0	8
AKT I + Arsen	4084,62	905,7086	3973,0	2904,0	5701,0	8
AKT V	4381,50	844,1388	4287,5	3130,0	5658,0	8
AKT V + Arsen	3668,12	452,8763	3766,0	2655,0	4056,0	8
Apha	6191,50	793,6664	6299,0	5035,0	7027,0	8
Arsen	5792,25	509,7674	5767,0	4818,0	6505,0	8
Insgesamt	4600,67	1276,1859	4628,0	1622,0	7027,0	64

Tab.69 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,000

Tab.70 Mehrfachvergleiche
Abhängige Variable: Einbaurate (cpm)

	(I) Stimulation	(J) Stimulation	Signifikanz	
Bonferroni	keine	DMSO	1,000	
		AKT I	,000	
		AKT I + Arsen	1,000	
		AKT V	1,000	
		AKT V + Arsen	,043	
		Apha	,005	
		Arsen	,169	
		DMSO	keine	1,000
			AKT I	,000
			AKT I + Arsen	,035
AKT V	,391			
AKT I	AKT V + Arsen	,001		
	Apha	,237		
	Arsen	1,000		
	keine	,000		
	DMSO	,000		

	AKT I + Arsen	,002
	AKT V	,000
	AKT V + Arsen	,099
	Apha	,000
	Arsen	,000
AKT I + Arsen	keine	1,000
	DMSO	,035
	AKT I	,002
	AKT V	1,000
	AKT V + Arsen	1,000
	Apha	,000
	Arsen	,000
AKT V	keine	1,000
	DMSO	,391
	AKT I	,000
	AKT I + Arsen	1,000
	AKT V + Arsen	1,000
	Apha	,000
	Arsen	,004
AKT V + Arsen	keine	,043
	DMSO	,001
	AKT I	,099
	AKT I + Arsen	1,000
	AKT V	1,000
	Apha	,000
	Arsen	,000
Apha	keine	,005
	DMSO	,237
	AKT I	,000
	AKT I + Arsen	,000
	AKT V	,000
	AKT V + Arsen	,000
	Arsen	1,000
Arsen	keine	,169
	DMSO	1,000
	AKT I	,000
	AKT I + Arsen	,000
	AKT V	,004
	AKT V + Arsen	,000
	Apha	1,000

³H-Thymidinaufnahme- 22h

Tab.71 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	8	,991
DMSO	8	,011
AKT I	8	,780
AKT I + Arsen	8	,008
AKT V	8	,629
AKT V + Arsen	7	,170
Apha	8	,897
Arsen	8	,421

Tab.72 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard- abweichu ng	Median	Minimu m	Maximu m	N
keine	16373,00	3237,32	16383,0	11369,0	21492,0	8
DMSO	18726,87	1394,69	18123,0	17539,0	21178,0	8
AKT I	6442,62	828,24	6427,5	5442,0	7917,0	8
AKT I + Arsen	12010,75	5137,77	9788,5	8313,0	23008,0	8
AKT V	10843,87	1306,01	10565,0	9126,0	13421,0	8
AKT V + Arsen	10862,57	913,52	11181,0	9740,0	11847,0	7
Apha	16915,00	1840,68	16977,5	14368,0	19939,0	8
Arsen	14173,25 0	1461,56	14161,0	12274,0	16105,0	8
Insgesamt	13332,07 9	4459,93	13042,0	5442,0	23008,0	63

Tab.73 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,000

Tab.74 Mehrfachvergleiche
Abhängige Variable: Einbaurate (cpm)

	(I) Stimulation	(J) Stimulation	Signifikanz	
Bonferroni	keine	DMSO	1,000	
		AKT I	,000	
		AKT I + Arsen	,022	
		AKT V	,001	
		AKT V + Arsen	,002	
		DMSO	Apha	1,000
			Arsen	1,000
			keine	1,000
			AKT I	,000
			AKT I + Arsen	,000
AKT I	AKT V	,000		
	AKT V + Arsen	,000		
	Apha	1,000		
	Arsen	,014		
	keine	,000		
AKT I + Arsen	DMSO	,000		
	AKT I + Arsen	,001		
	AKT V	,020		
	AKT V + Arsen	,028		
	Apha	,000		
AKT V	Arsen	,000		
	keine	,022		
	DMSO	,000		
	AKT I	,001		
	AKT V	1,000		
AKT V + Arsen	AKT V + Arsen	1,000		
	Apha	,005		
	Arsen	1,000		
	keine	,001		
	DMSO	,000		
	AKT I	,020		
	AKT I + Arsen	1,000		
	AKT V + Arsen	1,000		
	Apha	,000		
	Arsen	,251		
	keine	,002		
	DMSO	,000		
	AKT I	,028		
	AKT I + Arsen	1,000		
	AKT V	1,000		

Apha	Apha	,000
	Arsen	,332
	keine	1,000
	DMSO	1,000
	AKT I	,000
Arsen	AKT I + Arsen	,005
	AKT V	,000
	AKT V + Arsen	,000
	Arsen	,833
	keine	1,000
	DMSO	,014
	AKT I	,000
	AKT I + Arsen	1,000
AKT V	,251	
AKT V + Arsen	,332	
Apha	,833	

³H-Thymidinaufnahme - 42h

Tab.75 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm) keine	8	,204
DMSO	8	,304
AKT I	8	,583
AKT I + Arsen	8	,395
AKT V	8	,202
AKT V + Arsen	8	,500
Apha	7	,014
Arsen	8	,042

Tab.76 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standard- abweichu ng	Median	Minimum	Maximu m	N
keine	2878,25	584,29	2842,0	2128,0	4112,0	8
DMSO	2626,87	641,31	2519,0	1796,0	3933,0	8
AKT I	3609,62	676,53	3510,5	2590,0	4475,0	8
AKT I + Arsen	4972,62	855,22	4655,0	3952,0	6474,0	8
AKT V	5393,00	722,50	5580,0	4090,0	6116,0	8

AKT V + Arsen	4645,12	461,82	4612,0	3980,0	5204,0	8
Apha Arsen	4825,43	3043,32	3699,0	2441,0	9504,0	7
Insgesamt	6572,50	3056,82	4907,0	3612,0	11081,0	8
	4434,32	1960,65	4112,0	1796,0	11081,0	63

Tab.77 ANOVA -Einbaurate (cpm)

	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	,000

Tab.78 Mehrfachvergleiche
Abhängige Variable: Einbaurate (cpm)

	(I) Stimulation	(J) Stimulation	Signifikanz
Bonferroni	keine	DMSO	1,000
		AKT I	1,000
		AKT I + Arsen	,311
		AKT V	,073
		AKT V + Arsen	,861
		Apha	,611
		Arsen	,001
DMSO	keine	AKT I	1,000
		AKT I + Arsen	,133
		AKT V	,028
		AKT V + Arsen	,398
		Apha	,282
		Arsen	,000
AKT I	keine	DMSO	1,000
		AKT I + Arsen	1,000
		AKT V	,820
		AKT V + Arsen	1,000
		Apha	1,000
		Arsen	,013
		AKT I + Arsen	keine
AKT I	1,000		
AKT V	1,000		
AKT V + Arsen	1,000		
	1,000		

	Apha	1,000
	Arsen	1,000
AKT V	keine	,073
	DMSO	,028
	AKT I	,820
	AKT I + Arsen	1,000
	AKT V + Arsen	1,000
AKT V + Arsen	Apha	1,000
	Arsen	1,000
	keine	,861
	DMSO	,398
	AKT I	1,000
	AKT I + Arsen	1,000
Apha	AKT V	1,000
	Apha	1,000
	Arsen	,530
	keine	,611
	DMSO	,282
	AKT I	1,000
Arsen	AKT I + Arsen	1,000
	AKT V	1,000
	AKT V + Arsen	1,000
	Arsen	1,000
	keine	,001
	DMSO	,000
	AKT I	,013
	AKT I + Arsen	1,000
	AKT V	1,000
	AKT V + Arsen	,530
	Apha	1,000

³H-Thymidinaufnahme - 46h

Tab.79 Tests auf Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test)

	df	Signifikanz
Einbaurate (cpm)	keine	,001
	DMSO	,000
	AKT I	,200
	AKT I + Arsen	,033
	AKT V	,212
	AKT V + Arsen	,815
	Apha	,015

Arsen	8	,298
-------	---	------

nachfolgend wird hier aufgrund des hohen Anteils an fehlender Normalverteilung der Kruskal-Wallis-Test als nichtparametrisches Verfahren verwendet.

Tab.80 Einbaurate (cpm)

Stimulation	Mittelwert	Standardabweichung	Median	Minimum	Maximum	N
keine	4754,62	3484,53	3166,0	2540,0	12617,0	8
DMSO	3420,75	1741,72	3003,0	2263,0	7644,0	8
AKT I	3658,25	521,03	3857,0	2779,0	4293,0	8
AKT I + Arsen	5572,62	1223,54	5120,5	4566,0	7832,0	8
AKT V	5211,12	724,33	4892,0	4363,0	6310,0	8
AKT V + Arsen	5067,25	430,11	5060,5	4448,0	5660,0	8
Apha	4686,43	3306,37	3054,0	2052,0	9511,0	7
Arsen	6691,75	3005,235	5648,0	3204,0	11104,0	8
Insgesamt	4885,97	2246,88	4659,0	2052,0	12617,0	63

Tab.81 Kruskal-Wallis-Test

	Einbaurate (cpm)
Asymptotische Signifikanz	,002

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wahl für die Überlassung des Themas, sowie für seine vielen hilfreichen Ratschläge und unentliche Geduld bei der Korrektur meiner Arbeit. An zweiter Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Inge Fink für ihre Hilfe und gute Betreuung im Isotopenlabor bedanken.

Bei der Auswertung der Ergebnisse gilt mein Dank:

- Frau Elke Mayer, Anatomisches Institut Universität Tübingen (Immunhistochemie)
- Frau Stephan und Frau Schuster der AG von Prof. Brossart, Abt.II, Medizinische Klinik und Poliklinik der Universität Tübingen (FACS-Analyse)
- Herrn Prof. Dietz, Institut für Medizinische Biometrie (statistische Beratung) bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt zudem Frau Prof. Fröhlich, die mir jederzeit bei der Auswertung der Ergebnisse hilfreich zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder David und meinem Freund Adam bedanken. Ohne eure Unterstützung wäre all dies nicht möglich gewesen!

Lebenslauf

Name: Sabrina Wegenast
Geburtsdatum: 17.11.1981
Geburtsort: Heilbronn
Eltern: Gerhard Wegenast, Mechanikermeister
Angelika Wegenast, Zahnmedizinische Fachangestellte
Geschwister: David Wegenast, Student der Medizintechnik

Schulbildung:

1988-1992 Grundschohle Walheim
1992-2001 Christoph-Schrempf Gymnasium, Besigheim

Studium:

2002-2009 Studium der Zahnmedizin an der Eberhard Karls
Universität Tübingen
Naturwissenschaftliche Vorprüfung im März 2003
Zahnärztliche Vorprüfung im Juni 2005
Staatsexamen am 17.6.2009
August 2009- Assistenz Zahnärztin (Foundation Dentist) bei Dr. Alan
Juli-2010 Moffatt, Pitsmoor Dental Health Centre, Sheffield,
Großbritannien
seit August 2010 Senior House Officer, Mund-Kiefer-und Gesichtschirurgie,
King's Mill Hospital, Sutton-in-Ashfield, Grossbritannien