

Aus der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Jörg Barkhausen

**Einfluss von TSH-Analoga und eines RAR-selektiven
Retinoids auf den Radioiod-Uptake von
Schilddrüsenzelllinien in vitro**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Marcus Helmut Zimmermann
aus Ostfildern-Ruit

Lübeck 2010

1. Berichtstatterin: PD Dr. rer. nat. Birgit Meller

2. Berichtstatter: PD Dr. med. Morten Schütt

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2011

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.01.2011

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	12
1.1 Die Schilddrüse	12
1.1.1 Makroskopische Anatomie der Schilddrüse	12
1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Schilddrüse	12
1.2 Der Schilddrüsenstoffwechsel	12
1.2.1 Thyreotropin	13
1.2.2 Der TSH-Rezeptor	14
1.2.3 Der Natrium-Iodid-Symporter	15
1.3 Retinoide	15
1.3.1 Chemische Eigenschaften der Retinoide	15
1.3.2 Der Retinoidrezeptor	16
1.3.3 Rolle der Retinoide im Schilddrüsenstoffwechsel	17
1.4 Schilddrüsenerkrankungen	17
1.4.1 Benigne Schilddrüsenerkrankungen	18
1.4.2 Das Schilddrüsenkarzinom	18
1.5 In-vitro-Modelle in der Schilddrüsenforschung	21
1.5.1 FRTL-5-Zellen	22
1.5.2 ML-1-Zellen	22
1.6 Radioiodtherapie	23
1.6.1 ¹³¹ Iod	23
1.6.2 Indikation zur Radioiodtherapie	23
1.6.3 Radioiodtherapie von malignen Schilddrüsenerkrankungen	24
1.6.4 Radioiodtherapie von benignen Schilddrüsenerkrankungen	24
1.7 Klinische Anwendung von Retinoiden	25
1.7.1 Vitamin-A-Präparate und -Analoga in Forschung und Therapie	25
1.7.2 Therapeutische Anwendung von Retinoiden	25
1.7.3 Retinoide in der Therapie von Schilddrüsenerkrankungen	26
1.8 Zielsetzung	27
2. Materialien und Methoden	29
2.1 Zellkultur	29
2.1.1 Zelllinien	29

2.1.2 Umsetzen der Zellen	30
2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	30
2.2 Experimente.....	31
2.2.1 Zellkultivierung für die Experimente	31
2.2.2 Inkubation der FRTL-5-Zellen mit TSH-Analoga in unterschiedlicher Konzentration	32
2.2.3 Stimulation der ML-1-Zellen	33
2.2.4 Inkubation der ML-1-Zellen mit TSH-Analoga in unterschiedlicher Konzentration	33
2.2.5 ¹³¹ I-Uptake und Zellwachstum der FRTL-5- und ML-1-Zellen unter Einfluss von TTNPB	33
2.3 Radioiod.....	34
2.4 Inkubation mit Radioiod	34
2.5 Messung der applizierten Aktivitätsmenge.....	34
2.6 Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch ¹³¹ I.....	35
2.7 Uptake Messung.....	35
2.7.1 Ernten der Zellen.....	35
2.7.2 Bestimmung der Zellzahl.....	36
2.7.3 Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake	36
2.7.4 Leerwertbestimmung.....	36
2.8 Auswertungen der Uptake-Messung.....	37
2.8.1 Standardkurve	37
2.8.2 Rechnung.....	37
2.9 Statistische Auswertung.....	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Standardkurve	39
3.2 Proliferation.....	40
3.2.1 Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von bTSH	40
3.2.2 Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von rhTSH	42
3.2.3 Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von TSH TR1401.....	43
3.2.4 Vergleich der Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von bTSH, rhTSH und TSH TR1401	43
3.2.5 TTNPB-abhängige Proliferation der FRTL-5-Zellen	43
3.2.6 Proliferation der ML-1-Zellen unter Einfluss von bTSH	44
3.2.7 Proliferation der ML-1-Zellen unter Einfluss von rhTSH	45

3.2.8 TNPB-abhängige Proliferation der ML-1-Zellen	46
3.3 ¹³¹ I-Uptake	46
3.3.1 ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von bTSH	46
3.3.2 ¹³¹ I-Uptake von FRTL-5-Zellen unter Einfluss von rhTSH	48
3.3.3 ¹³¹ I-Uptake von FRTL-5-Zellen unter Einfluss von TSH TR1401	50
3.3.4 ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von rhTSH und TSH TR1401 im Vergleich.....	53
3.3.5 TNPB-abhängiger ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen.....	54
3.3.6 ¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen unter Einfluss von bTSH.....	55
3.3.7 ¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen unter Einfluss von rhTSH.....	56
3.3.8 TNPB abhängiger ¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen.....	56
4. Diskussion	57
4.1 Zellkulturen	57
4.2 Methodik	58
4.3 Zellproliferation bzw. Inkubation mit TSH.....	59
4.4 ¹³¹ I-Uptake von Schilddrüsenkarzinomzellen	60
4.5 Der ¹³¹ I-Uptake in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration und vom TSH-Analogen	62
4.6 TSH-Analoga in der Radioiodtherapie	64
4.7 Retinoide in der Radioiodtherapie.....	66
4.8 Neue Therapien	67
5. Zusammenfassung.....	69
6. Literaturverzeichnis	70
7. Danksagung	86
8. Lebenslauf	87

Abkürzungsverzeichnis

A(0)	Aktivität bei Zugabe von ^{131}I
A(t)	Aktivität zum Messzeitpunkt t
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
AG	Aktiengesellschaft
Aktivität _{Durchschnitt}	durchschnittliche Aktivität
AMP	Adenosinmonophosphat
ATRA	all-trans-Retinsäure
Bq	Becquerel
BRAF	B-rapidly growing fibrosarcoma
bTSH	bovines TSH
bzw.	beziehungsweise
Ca	Karzinom
ca.	circa
Caco2/TC7	Zelllinie
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementäre DNA
ClO_4^-	Perchlorat-Anion
cm^2	Quadratcentimeter
Co.	Compagnie
CO_2	Kohlendioxid
cpm	Zerfälle pro Minute
DIT	3,5-Diiodyrosin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
$E_{\text{Durchschnitt}}$	durchschnittliche Energie
E_{max}	maximale Energie
ERK	Extracellular-Signal-Regulated-Kinase

et al.	und andere
eV	Elektronenvolt
exp	Exponent
FBS	fötales bovines Serum
FRTL-5	Zelllinie
FTC-133	Zelllinie
FTC-238	Zelllinie
g	Gramm
GBq	Gigabecquerel
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
g/mol	Gramm pro Mol
GTP	Guanosintriphosphat
Gy	Gray
h	Stunde
I	elementares Iod
I ⁻	Iodid
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
inc.	incorporated
IU/l	internationale Einheiten pro Liter
J	Joule
K ⁺	Kalium-Ion
kBq	Kilobecquerel
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Kommanditgesellschaft
l	Liter
Lj.	Lebensjahr
ln2	natürlicher Logarithmus zur Basis 2
MAP	mitogen-aktivierte Proteinkinase
MBq	Megabecquerel
MEK	MAP-Kinase-Kinase
MeV	Megaelektronenvolt
mg	Milligramm
min	Minute
MIT	3-Monoiodtyrosin

ml	Milliliter
ML-1	Zelllinie
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
mU/l	Milliunits pro Liter
n	Anzahl
Na ⁺	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
NaI	Natriumiodid
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Na ⁺ /K ⁺ -Adenosintriphosphatase
NCS ⁻	Thiocyanat-Anion
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
n. s.	nicht signifikant
NSCLC	nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
O ₂	Sauerstoff
o. g.	oben genannten
p	Signifikanzniveau
PBF	PTTG-binding-factor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	negativer Logarithmus der Wasserstoff-Ionenkonzentration einer wässrigen Lösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PTTG	Pituitary-tumour-transforming-gene
R ²	Bestimmtheitsmaß
RA	Retinsäure
RAR	Retinsäurerezeptor
RARE	Retinsäure-Response-Element
ras	rat sarcoma (Onkogen)
RET	receptor tyrosine kinase (Onkogen)
rhTSH	rekombinantes humanes TSH
RIT	Radioiodtherapie
rpm	Umdrehungen pro Minute

RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Standardabweichung
SPECT	Single-Photon-Emissionscomputertomographie
s. o.	siehe oben
sog.	so genannte
t	Messzeitpunkt
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
T_3	Triiodthyronin
T_4	Thyroxin
Tab.	Tabelle
TcO_4^-	Pertechnetat-Anion
Tg	Thyreoglobulin
TPO	Thyreoperoxidase
TR1401	TSH TR1401
TRAK	TSH-Rezeptor-Autoantikörper
TRH	Thyreoliberin (Thyrotropin-releasing hormone)
TSH	Thyreotropin (Thyroid-stimulating hormone)
TSHR	TSH-Rezeptor
TTNPB	4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl]benzoic acid
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
VEGFR	Vascular-Endothelial-Growth-Factor-Rezeptor
z. B.	zum Beispiel
10-JÜR	10-Jahres-Überlebensrate
^{18}F -FDG	^{18}F -Fluordeoxyglucose
^{125}I	Iodisotop
^{131}I	Iodisotop
^{131}Xe	Xenonisotop
°C	Grad Celsius
α	Alpha
β	Beta
β^-	β^- -Strahlung
γ	Gamma
μg	Mikrogramm

μl	Mikroliter
%	Prozent
=	ist gleich
<	kleiner als
>	größer als

1. Einleitung

1.1 Die Schilddrüse

1.1.1 Makroskopische Anatomie der Schilddrüse

Die Schilddrüse (Glandula Thyroidea) liegt unterhalb des Schildknorpels auf Höhe des zweiten bis vierten Trachealknorpels. Die beiden Schilddrüsenlappen Lobus dexter und Lobus sinister liegen dem Schildknorpel auf beiden Seiten an und sind über den Isthmus miteinander verbunden (Schiebler, 2004).

1.1.2 Mikroskopische Anatomie der Schilddrüse

Histologisch besteht die Schilddrüse aus Schilddrüsenfollikeln, die bis zu 0,9 mm groß sein können. Die Follikel werden aus einem einschichtigen Epithel bestehend aus den Thyreozyten gebildet und enthalten das Kolloid. Das Kolloid besteht aus Thyreoglobulin, an das die Hormone Triiodthyronin (T_3), Thyroxin (T_4) und deren Vorstufen gebunden sind. Zwischen den Thyreozyten und Follikeln liegen die Calcitonin produzierenden C-Zellen, Bindegewebe, Blut- und Lymphgefäße (Schiebler, 2004).

1.2 Der Schilddrüsenstoffwechsel

Die Schilddrüse synthetisiert die Hormone T_3 und T_4 . Hierfür wird Iodid (I^-) über den auf der basalen Seite gelegenen Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in die Follikel­epithelzelle aufgenommen. Über das in der apikalen Zellmembran gelegene Protein Pendrin – ein Iodid-Chlorid-Transporter – gelangt das intrazellulär aufgenommene I^- ins Kolloid (Bizhanova und Kopp, 2009). Durch das ebenfalls an der apikalen Membran lokalisierte Enzym Thyreoperoxidase (TPO) wird I^- zu elementarem Iod (I) oxidiert und anschließend an Tyrosinreste des Proteins Thyreoglobulin gebunden. Dabei entstehen 3-Monoiodtyrosin- (MIT) und 3,5-Diiodtyrosinverbindungen (DIT). MIT und DIT werden durch die Peroxidase aneinander gekoppelt, wobei die Hormone T_3 und T_4 entstehen, die nach wie vor an das Thyreoglobulin gebunden sind. Das Thyreoglobulin mit den gekoppelten Hormonen wird im Kolloid gespeichert. Thyreoglobulin wird durch Pinozytose in die Thyreozyten aufgenommen. Durch hydrolytische Spaltung in sog. Phagolysosomen werden T_3 und T_4 aus dem Thyreoglobulin herausgelöst und in die Blutbahn abgegeben (siehe Abbildung 1) (Knepel, 2005).

Der Schilddrüsenstoffwechsel wird wesentlich durch das Hormon Thyreotropin (Thyroid-stimulating hormone; TSH) beeinflusst. TSH stimuliert die I⁻-Aufnahme über den NIS, die Produktion und die Freisetzung von T₃ und T₄ und fördert das thyroideale Wachstum. Außerdem schützt TSH die Thyreozyten vor Apoptose und fördert die Ontogenese (Szkudlinski et al., 2002).

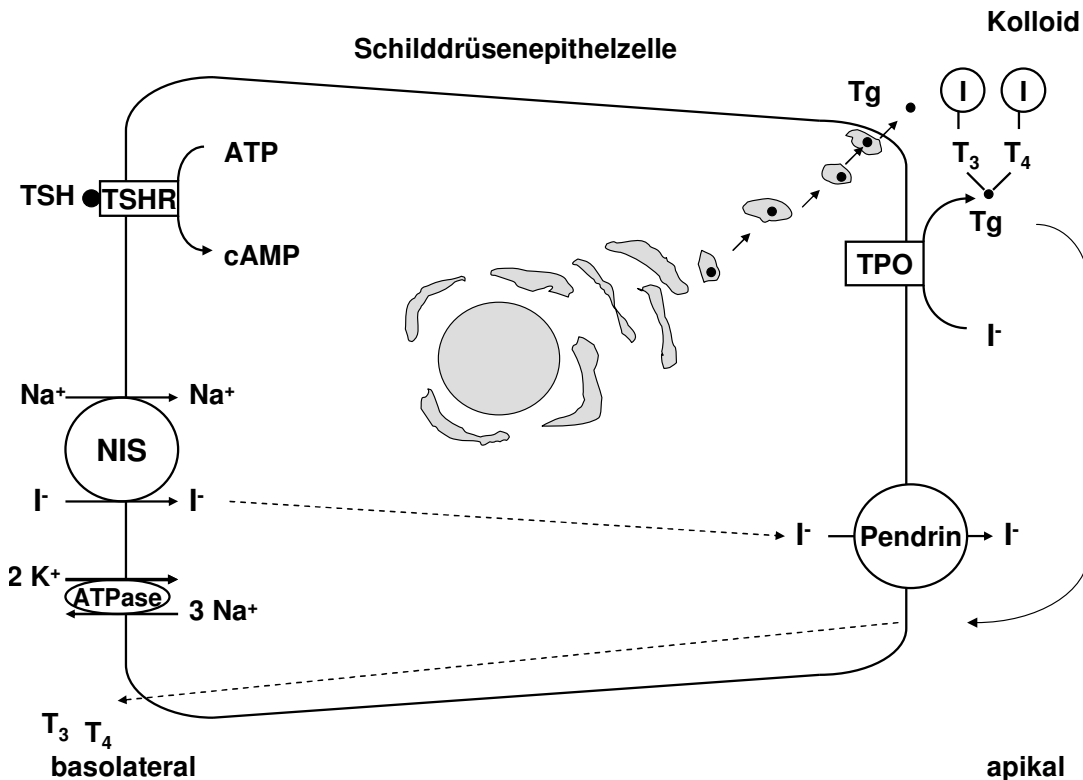


Abb. 1: Schematische Darstellung des I⁻-Transports und der Iodorganifizierung in der Schilddrüse (nach Spitzweg et al., 2001).

1.2.1 Thyreotropin

Die TSH-Synthese erfolgt in den basophilen Zellen des Hypophysenvorderlappens. Das im Hypothalamus gebildete Thyreoliberin (Thyreotropin-releasing hormone; TRH) stimuliert die TSH-Sekretion. TSH fördert innerhalb von Minuten die T₃- und T₄-Freisetzung. Umgekehrt hemmen die Schilddrüsenhormone in einer negativen Feedback-Schleife die TSH-Sekretion und -Synthese (Knepel, 2005).

Humanes TSH ist ein heterodimeres Glykoproteinormon. Das humane TSH-Molekül setzt sich zusammen aus einer mit anderen Glycoproteinen gemeinsamen α -Untereinheit und einer individuellen β -Untereinheit. Die α -Untereinheit besteht aus 92 Aminosäuren, die β -Untereinheit besteht beim Menschen aus 118 Aminosäuren. Beide Untereinheiten werden durch Gene auf den Chromosomen 1 und 6 kodiert (Szkudlinski et al., 2002).

1.2.2 Der TSH-Rezeptor

Der TSH-Rezeptor ist ein membranständiger, G-Protein-gekoppelter Rezeptor, bestehend aus sieben Transmembrandomänen mit einem intrazellulären Carboxylrest und einer extrazellulären terminalen Aminogruppe. Diese bestimmt die Bindungsspezifität für TSH und wird auch als α -Untereinheit bezeichnet. Letztere ist über Disulfidbrücken mit einer die Zellmembran durchspannenden β -Untereinheit verbunden. Der TSH-Rezeptor wird von zehn Exons auf Chromosom 14 kodiert und ist vorwiegend an die α -Untereinheit eines stimulierenden G-Proteins gebunden. Bindet TSH an den TSH-Rezeptor, so wird die Adenylatcyclase (AC) aktiviert und die intrazelluläre cAMP-Konzentration steigt an. Dieser second messenger aktiviert weitere Signalkaskaden, die die Gentranskription, die Zellproliferation und die Schilddrüsenhormonsynthese stimulieren (Baratti-Elbaz et al., 1999; De Lloyd et al., 2010). Eine dieser Signalkaskaden ist die der Proteinkinase A (PKA), die den I^- -Uptake stimuliert (Bläser et al., 2006). Das ras-Protein stimuliert für gewöhnlich über die MAP-Kinase-Kaskade und die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Kaskade die Zellproliferation und hemmt die Apoptose (siehe Abbildung 2) (Gire et al., 2000; Riesco-Eizaguirre und Santisteban, 2007; Prante et al., 2009).

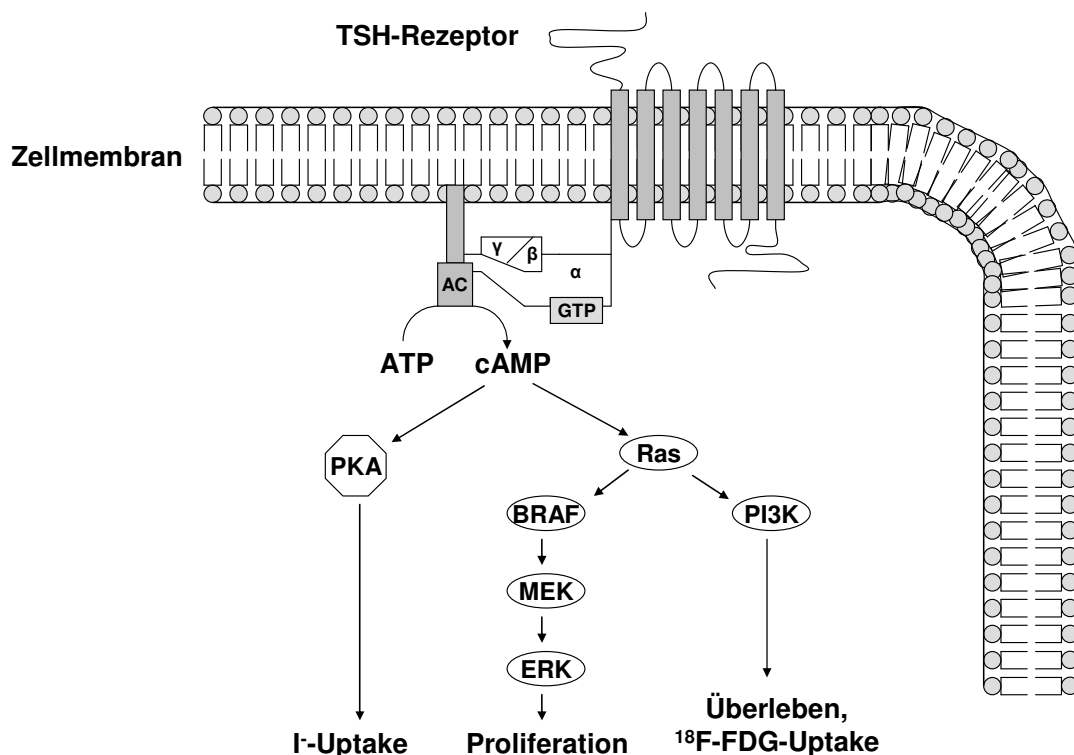


Abb. 2: Schematische Darstellung des TSH-Rezeptors und der physiologisch vorkommenden Signaltransduktion in der Schilddrüsenepithelzelle (nach Prante et al., 2009).

1.2.3 Der Natrium-Iodid-Symporter

Der NIS hat eine wichtige Bedeutung für die Synthese der Schilddrüsenhormone. Er vermittelt den I⁻-Transport gegen den Konzentrationsgradienten in die Thyreozyten und ist limitierender Faktor für die Schilddrüsenhormonsynthese. Das NIS-Gen liegt auf Chromosom 19p12-13.2 und kodiert ein Glykoprotein aus 643 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 70 kDa bis 90 kDa. Der NIS ist ein Membranprotein, das aus 13 Transmembrandomänen mit einem extrazellulären Aminosäure- und einem intrazellulären Carboxylrest besteht. Der NIS ist ein Cotransporter der zwei Natrium-Ionen (Na⁺) und ein I⁻-Ion oder andere große monovalente Anionen (ClO₄⁻, NCS⁻, TcO₄⁻) in die Zelle transportiert (Pfannenstiel et al., 1999 a). Dies geschieht entlang des durch die Na⁺/K⁺-ATPase generierten Natriumgradienten (Spitzweg et al., 2001). Innerhalb der Thyreozyten ist die I⁻-Konzentration bis zu dreißigmal so hoch wie im Extrazellulärraum.

TSH stimuliert durch Bindung an den TSH-Rezeptor die I⁻-Aufnahme. Dabei kommt es durch den Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration zur Transkription des NIS-Gens. Kogai et al. konnten 24 h nach Stimulation mit TSH eine 5,9-fach gesteigerte NIS-mRNA-Expression messen. Weiterhin konnte nach 36 h ein Anstieg der NIS-Protein-Synthese nachgewiesen werden (Kogai et al., 1997; Saito et al., 1997). Zusätzlich wird das NIS-Protein auch in Membranen intrazellulärer Vesikel exprimiert und kann durch TSH-Stimulation an die Zelloberfläche transportiert werden (Kaminsky et al., 1994).

Aufgrund seiner Schlüsselrolle im Schilddrüsenstoffwechsel und bei der I⁻-Aufnahme ist der NIS Grundvoraussetzung für die diagnostische Schilddrüsenzintigraphie und für die Radioiodtherapie (RIT) von benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen (Spitzweg et al., 2001).

1.3 Retinoide

Retinoide haben essentielle biologische Funktionen. Sie werden benötigt für die Sehfunktion, die Regulation des Immunsystems, die Differenzierung von Epithelien und die Kontrolle der embryonalen Entwicklung.

1.3.1 Chemische Eigenschaften der Retinoide

Retinoide sind Derivate des Vitamin A bzw. haben eine vergleichbare biologische Aktivität. Stammkomponente der Retinoide ist das all-trans-Retinol, ein primärer Alkohol mit einer molaren Masse von 286,46 g/mol. Durch Oxidation entstehen

daraus das all-trans-Retinaldehyd und die all-trans-Retinsäure (ATRA). Weiterhin spielen Isomere der Retinsäure (RA) wie die 9-cis-RA, die 11-cis-RA und die 13-cis-RA eine wichtige Rolle für die biologische Funktion der Retinoide.

Man kann die Struktur der Retinoide in drei Abschnitte einteilen: Ein hydrophober β -Iononring, eine konjugierte Tetraen-Seitenkette und eine polare Endgruppe (siehe Abbildung 3) (Arnhold, 2000).

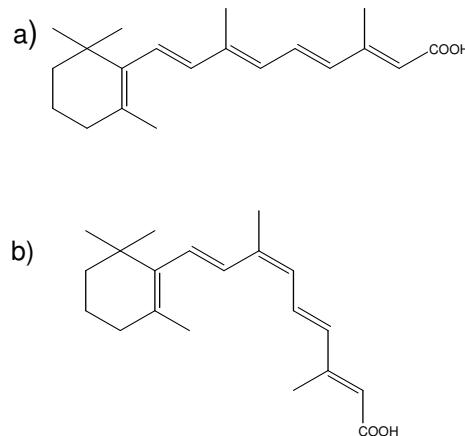


Abb. 3: Chemische Strukturformeln von a) ATRA und b) 9-cis-RA (nach Nagy et al., 1995).

Der Haupteffekt wird durch die RA – dem aktiven Metaboliten des Vitamin A – bestimmt. ATRA und 9-cis-RA spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Gentranskription, die sowohl Zellteilung, -wachstum, -differenzierung und -proliferation beeinflusst (Rigas und Dragnev, 2005).

1.3.2 Der Retinoidrezeptor

Retinoide binden an intranukleär liegende Rezeptoren. Diese Rezeptoren gehören zur Steroid/Thyroid-Superfamilie und sind an der selektiven Transkriptionsregulation von Genen beteiligt. Es gibt mindestens sechs verschiedene Retinoidrezeptoren, die zwei Rezeptorfamilien zuzuordnen sind: Den Retinsäurerezeptoren (RAR) und den Retinoid-X-Rezeptoren (RXR), jeweils mit den Subtypen α , β und γ . Diese Rezeptoren haben sowohl eine DNA-Bindungsdomäne als auch eine Ligandenbindungsdomäne. Die RAR-Familie wird durch ATRA und 9-cis-RA aktiviert. Die RXR-Rezeptorfamilie wird nur durch 9-cis-RA aktiviert. Jedoch binden auch weitere physiologisch vorkommende und synthetische Retinoide mit unterschiedlicher Affinität an die Rezeptoren.

Nicht ligandengebundene Retinoidrezeptoren sind an Co-Repressoren gebunden, die die Gentranskription unterdrücken. Durch die Bindung des Liganden an den Retinoidrezeptor dissoziieren Co-Repressor und Rezeptorprotein und es formieren

sich Retinoidrezeptor-Homodimere und -Heterodimere. Interessant ist, dass der RXR auch mit anderen nukleären Rezeptoren wie z. B. dem T₃- und dem Vitamin-D₃-Rezeptor Dimere bilden kann. Die Rezeptor-Homo- und -Heterodimere binden an das sog. Retinsäure-Response-Element (RARE) (Rigas und Dragnev, 2005). Das Hormon-Response-Element ist eine Promotorregion auf der DNA. Das Andocken des aktivierten Retinoidrezeptors führt zur Genexpression (Evans und Kaye, 1999; Löffler, 2003).

1.3.3 Rolle der Retinoide im Schilddrüsenstoffwechsel

Neben I⁻, TSH, T₃ und T₄ beeinflussen auch die Retinoide den Schilddrüsenstoffwechsel. Humane Schilddrüsenzellen exprimieren RAR-α und RXR-γ (Kim et al., 2009). Fröhlich et al. beschrieben für geringe Retinolkonzentrationen eine Steigerung der TSH-Rezeptorbindung im In-vitro-Modell. Die Folge war ein gesteigerter I⁻-Uptake und eine gesteigerte Iodination bei unveränderter NIS-Expression (Fröhlich et al., 2004). Weiterhin können RXR-selektive Retinoide, auch genannt Rexinoide, beim Menschen eine Hypothyreose auslösen. Ursächlich konnte für das synthetische Rexinoid LG268 eine TSH- und T₄-Level-Suppression im Mausmodell beobachtet werden (Sharma et al., 2006). Der aktivierte RXR bindet hierbei in den basophilen Zellen des Hypophysenvordelappens an das TSH-Gen auf der DNA und supprimiert dessen Expression (Wolf, 2002). Auf Ebene des NIS konnte für die Schilddrüsenkarzinomzelllinien FTC-133 und FTC-238 gezeigt werden, dass RA die NIS-mRNA-Transkription steigert (Schmutzler et al., 1997). Ursache hierfür scheint ein RARE in der Promotorregion des NIS-Gens auf der DNA zu sein (Schmutzler et al., 2002).

1.4 Schilddrüsenerkrankungen

Man unterscheidet funktionelle und morphologische Schilddrüsenerkrankungen. Diese können mit einer euthyreoten, hypothyreoten oder hyperthyreoten Stoffwechsellage einhergehen. Weiterhin unterscheidet man benigne von malignen Erkrankungen (Renz-Polster und Bätge, 2004). Im Folgenden werden Erkrankungen beschrieben, die mit einer RIT behandelt werden können.

1.4.1 Benigne Schilddrüsenerkrankungen

Zu den benignen Erkrankungen zählt die Struma. Dabei handelt es sich um eine Vergrößerung der Schilddrüse. Die häufigste Ursache ist der Iodmangel. Die Schilddrüsenfunktion kann hierbei euthyreot, hypothyreot oder hyperthyreot sein. Unter einer Hyperthyreose versteht man einen Überschuss an Schilddrüsenhormonen am Zielorgan. Ursache hierfür kann eine Schilddrüsenautonomie sein, bei der sich Schilddrüsenareale der Regulation durch TSH entzogen haben. Eine weitere Ursache ist der Morbus Basedow (eine Autoimmunkrankheit), bei der TSH-Rezeptor-Autoantikörper (TRAK) eine Dauerstimulation des TSH-Rezeptors verursachen, die eine Hyperthyreose zur Folge hat.

Weiterhin gibt es die Hypothyreose, bei der ein vermindertes Angebot an Schilddrüsenhormonen an den Zielorganen besteht, sowie verschiedene Formen der Entzündung der Schilddrüse, die sog. Thyreoiditiden (Renz-Polster und Bätge, 2004).

1.4.2 Das Schilddrüsenkarzinom

Das Schilddrüsenkarzinom ist ein maligner Tumor der Schilddrüse. Man unterscheidet vier Entitäten, die sich in ihrer Häufigkeit, Altershäufigkeit, Ausbreitungsart und Prognose unterscheiden (siehe Tabelle 1) (Stephenson, 2000).

Typ	Häufigkeit	Erkrankungsalter	Ausbreitung	Prognose
Papilläres-Ca	60-70 %	junges Erwachsenenalter	lymphogen	10-JÜR: > 95 %
Follikuläres-Ca	20-25 %	5. Lebensjahrzehnt	hämatogen	10-JÜR: > 90 %
Anaplastisches-Ca	10-15 %	hohes Lebensalter	aggressiv lokal	10-JÜR: 0-9 %
Medulläres-Ca	5-10 %	sporadisch: 50.-60. Lj. familiär: 10.-50. Lj.	lokal, lymphogen, hämatogen	10-JÜR: > 50 -70 % 10-JÜR: -100 %

Tab. 1: Schilddrüsenkarzinome (nach Stephenson, 2000; modifiziert nach Herold, 2007; Pfannenstiel et al., 1999 b).

Papilläre und follikuläre Schilddrüsenkarzinome werden auch als differenzierte Schilddrüsenkarzinome bezeichnet. Das medulläre und das anaplastische Schilddrüsenkarzinom werden in dieser Arbeit nicht weiter behandelt, da sie keinen Iodstoffwechsel aufweisen und deshalb keine primäre Indikation zur RIT besteht (Dietlein et al., 2007 a).

Differenzierte Schilddrüsenkarzinome sind relativ selten. Schilddrüsenkarzinome machen weniger als 1 % der Krebserkrankungen beim Menschen aus. Die jährliche Inzidenz schwankt je nach Region zwischen 0,5 und 10 Fällen pro 100 000 Einwohnern. Differenzierte Schilddrüsenkarzinome im Kindes- und Jugendalter sind im Normalfall selten. Bei Erwachsenen steigt die Inzidenz mit dem Alter an. Das mittlere Diagnosealter liegt bei 45 bis 50 Jahren. Frauen erkranken zwei- bis viermal häufiger an einem Schilddrüsenkarzinom als Männer (Schlumberger, 1998).

Ätiologisch werden Strahlenexposition, Bestrahlung des Halses und des Nackens und iodhaltiger radioaktiver Fall-out im Kindesalter diskutiert (Stephenson, 2000; Reiners et al., 2008). Für das follikuläre Schilddrüsenkarzinom ist ein gehäuftes Auftreten in Iodmangelgebieten beschrieben (Heitz et al., 2004).

Pathogenetisch spielen wie bei anderen bösartigen Tumoren Onkogene und Tumorsuppressorgene eine Rolle in der Entstehung von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen. Santoro et al. konnten in 33 von 177 (19 %) papillären Schilddrüsenkarzinomen Rearrangements des RET-Protoonkogens nachweisen (Santoro et al., 1992). In papillären Schilddrüsenkarzinomen von Kindern nach Strahlenexposition in Tschernobyl konnte in 60 % der Fälle eine Aktivierung des RET-Onkogens nachgewiesen werden (Bongarzone et al., 1996). Das RET-Onkogen kodiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor – einen Wachstumsfaktor-Rezeptor – mit konstitutiver Aktivierung. Dieser wird auf Thyreozyten normalerweise nicht exprimiert. Weiterhin wurden Mutationen im ras-Onkogen (Subtypen: Hras, KrasA, KrasB, Nras) v. a. in follikulären (bis 50 %), aber auch in papillären Schilddrüsenkarzinomen (bis 20 %) gefunden (Namba et al., 1990; Esapa et al., 1999). Ras-Proteine gehören zu den G-Proteinen (GTPasen), werden u. a. durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren aktiviert und sind ein Element von Signalkaskaden (siehe unter 1.2.2). Durch Punktmutationen können diese konstitutiv aktiviert sein, ohne dass ein Ligand an den zugehörigen Rezeptor bindet (Böcker et al., 2004). Ein weiteres in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen vorkommendes Onkogen ist das BRAF-Onkogen – eine Serin-Threonin-Kinase – die die MAP-Kinase-Kaskade und somit die mRNA- und Proteinsynthese aktiviert (Böcker et al., 2004; Fagin und Mitsiades, 2008).

Schilddrüsenkarzinomzellen zeigen im Vergleich zu differenzierten Schilddrüsenzellen Veränderungen des Stoffwechsels. Diese findet man z. B. auf den verschiedenen Ebenen des Iodstoffwechsels, was eine Verminderung des

¹³¹I-Uptake zur Folge hat. Klinisch äußert sich dies als kalter Knoten in der Schilddrüsenszintigraphie. In Schilddrüsenkarzinomzellen konnte eine verminderte TSH-Rezeptor-Expression nachgewiesen werden. Die Ergebnisse mehrerer experimenteller Arbeiten ergaben eine niedrige TSH-Rezeptor-mRNA-Expression von Schilddrüsenkarzinomzellen. Brabant et al. konnten weiterhin bei drei von vier Patienten mit anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen keine TSH-Rezeptor-mRNA-Expression mehr nachweisen. Folglich wird eine Korrelation der TSH-Rezeptor-Expression mit dem Grad der Differenzierung des Karzinoms vermutet (Brabant et al., 1991; Ohta et al., 1991; Brönnegård et al., 1994). Es wird angenommen, dass Methylierungen der TSH-Rezeptor-DNA für die reduzierte TSH-Rezeptorzahl verantwortlich sind (Xing et al., 2003). Neben quantitativen Veränderungen geht die Entdifferenzierung von Schilddrüsenzellen auch mit qualitativen Veränderungen des TSH-Rezeptors einher. Es konnten Punktmutationen im TSH-Rezeptor-Gen nachgewiesen werden, die einerseits eine Aktivierung des Rezeptors – gemessen an der cAMP-Konzentration – bewirkten, andererseits die TSH-Empfindlichkeit senkten (Russo et al., 1995). Auf Ebene des I⁻-Uptake in die Zelle konnte eine reduzierte NIS-Expression gemessen werden. Mehrere Studien haben gezeigt, dass die NIS-mRNA-Synthese im Vergleich zu differenzierten Schilddrüsenzellen vermindert war bzw. keine NIS-mRNA mehr nachgewiesen werden konnte. Für Tumore in höheren Stadien konnte eine niedrigere NIS-Expression nachgewiesen werden als für Karzinome in niedrigeren Stadien (Arturi et al., 1998; Lazar et al., 1999; Park et al., 2000). Auch hierfür werden Methylierungen der NIS-DNA als ursächlich diskutiert (Venkataraman et al., 1999). Weiterhin ist bekannt, dass in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen das Protoonkogen Pituitary-tumour-transforming-gene (PTTG) sowie der PTTG-binding-factor (PBF) überexprimiert werden. Boelaert et al. beschrieben, dass PTTG und PBF mit der Promotorregion des NIS-Gens interagieren und die NIS-mRNA-Expression inhibieren (Boelaert et al., 2007). In einer späteren Studie konnte gezeigt werden, dass PBF an das NIS-Protein bindet und dadurch die Expression am Wirkort – der Zellmembran – vermindert (Smith et al., 2009). Zusammenfassend sind sowohl eine verminderte Genexpression als auch ein verminderter Transport des fertigen NIS-Proteins an die Zelloberfläche für den reduzierten I⁻-Uptake verantwortlich.

1.5 In-vitro-Modelle in der Schilddrüsenforschung

Zur Untersuchung der Schilddrüsenfunktion und Schilddrüsenerkrankungen in vitro stehen verschiedene Modelle zur Verfügung. In den 70er Jahren untersuchten Williams und Malayan die I⁻-Aufnahme mit Hilfe von Mäuseschilddrüsenlappen (Williams und Malayan, 1975). Solche Modelle zur Untersuchung des I⁻-Transports sind sehr komplex, da es zur organischen Bindung von I⁻-Ionen im Gewebe kommen kann. Auch kann mit dieser Methode nur der gesamte Effekt der I⁻-Aufnahme in das Gewebe beurteilt werden und nicht die Prozesse auf zellulärer Ebene (Weiss et al., 1984 a).

Alternativ können auch Schilddrüsenschnitte als In-vitro-Modell genutzt werden. Diese eignen sich besonders zur Untersuchung von Vorgängen auf Follikelebene. Aber auch hier kann wiederum keine Trennung der einzelnen Prozesse des Schilddrüsenstoffwechsels vollzogen werden (Weiss et al., 1984 a). Je nach Präparation oder Herkunftsorganismus kann eine große Anzahl von angeschnittenen Follikeln vorliegen. Eine relative TSH-Unempfindlichkeit oder zentrale Nekrosen bei O₂-Mangel konnten nachgewiesen werden (Williams und Malayan, 1975). Folglich können auch hier eher der Einfluss von TSH auf das Schilddrüsengewebe an sich untersucht werden und weniger die molekularen Vorgänge.

Zur Untersuchung von zellulären und molekularen Vorgängen eignen sich besonders Zellkulturen. Hierbei unterscheidet man immortalisierte Zelllinien und Primärkulturen. In der Vergangenheit wurden vor allem Primärkulturen untersucht (Weiss et al., 1984 a). So isolierten Knopp et al. in den 60er und 70er Jahren Thyreozyten vom Rind für ihre Experimente zur Untersuchung des I⁻-Transports unter Einfluss von cAMP (Knopp et al., 1970). Allerdings traten beim Einsatz von Primärkulturen häufig Schwierigkeiten auf. So wurden für die Reproduzierbarkeit große Mengen an homogenen Zellpopulationen benötigt. Außerdem war die Kultivierung TSH-abhängig, so dass ein TSH-Entzug nicht möglich war. Deshalb konnten Experimente zur Untersuchung des akuten Effekts von TSH auf die I⁻-Aufnahme bzw. eine Variation der TSH-Konzentration nur eingeschränkt durchgeführt werden (Weiss et al., 1984 a). Weiterhin bestand bei der Isolierung von Primärkulturen die Gefahr der Verunreinigung mit Zellen, die nicht vom Schilddrüsenepithel stammen (Kimura et al., 2001).

Heutzutage werden Zelllinien zur Untersuchung von Einzelaspekten eingesetzt. Besonders FRTL-5-Zellen eignen sich für Experimente des Schilddrüsenstoff-

wechsels (Kimura et al., 2001). Nicht nur die physiologischen Vorgänge der Schilddrüse werden in vitro untersucht. Auch für Experimente, die Aufschluss über die Eigenschaften von Schilddrüsenkarzinomen geben sollen, werden In-vitro-Modelle genutzt. So gibt es die Zelllinie ML-1 sowie die Zelllinien FTC-133 und FTC-238. Alle drei entstammen follikulären Schilddrüsenkarzinomen (Schönberger et al., 2000; Hombach-Klonisch et al., 2006; Krause et al., 2008).

1.5.1 FRTL-5-Zellen

FRTL-5-Zellen („Fisher rat thyrocyte cell line no. 5“) wurden erstmals im Jahr 1980 beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie, die aus Rattenschilddrüsen-Epithelzellen isoliert wurde und in einem speziell dafür vorgesehenen Medium (siehe unter 2.1.1) kultiviert wird (Ambesi-Impiombato et al., 1980). Sie gehört zu den am besten beschriebenen In-vitro-Systemen zur Untersuchung der Thyreozytenfunktion (Kimura et al., 2001). FRTL-5-Zellen wachsen unter TSH-Einfluss kontinuierlich und haben funktionelle Gemeinsamkeiten mit humanen Schilddrüsenzellen wie I⁻-Uptake und Thyreoglobulinsynthese (Ambesi-Impiombato und Perrild, 1989). FRTL-5-Zellen exprimieren den TSH-Rezeptor, der seine Funktion über die cAMP-Kaskade vermittelt. Auch in FRTL-5-Zellen wird die NIS-Expression und Thyreoglobulinsynthese gleich humaner Thyreozyten über die cAMP-Kaskade vermittelt (Meller et al., 2006). Dennoch sind sie bis zu einem gewissen Grad entdifferenziert. Dafür spricht die Tatsache, dass FRTL-5-Zellen keine Follikel bilden. Da es sich um immortale Zellen handelt, sind grundlegende Mechanismen der Zellzykluskontrolle verloren gegangen (Kimura et al., 2001). Nach subkutaner Injektion und unter TSH-Stimulation sind FRTL-5-Zellen im Mausmodell tumorigen (Ossendorp et al., 1990).

1.5.2 ML-1-Zellen

Die ML-1-Zelllinie wurde im Jahre 1999 charakterisiert und etabliert. Es handelt sich hierbei um isolierte Zellen eines schlecht differenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinoms einer fünfzigjährigen Patientin. Bei der In-vivo-Diagnostik konnte eine beträchtliche Anreicherung von ¹⁸F-Fluordeoxyglucose (¹⁸F-FDG) und eine geringe Anreicherung von ¹³¹Iod (¹³¹I) gemessen werden.

Die ML-1-Zellen wachsen als Monolayerkulturen. Bei 92 % bis 95 % der Zellen konnten Thyreoglobulin- und Chondroitinsulfat-Antigene nachgewiesen werden,

90 % exprimierten Vimentin. Eine Sekretion von Thyreoglobulin und Chondroitinsulfat sowie Fibronectin wurde beschrieben.

Auch in vitro ist die Aufnahme von ^{18}F -FDG und ^{131}I nachgewiesen worden. Die ^{131}I -Aufnahme verhielt sich hierbei TSH-abhängig (Schönberger et al., 2000).

1.6 Radioiodtherapie

Die RIT ist ein Verfahren zur Behandlung von benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen. Man versteht hierunter die systemische Applikation von ^{131}I als Natriumiodid (NaI) zur selektiven Bestrahlung von iod-speicherndem Schilddrüsen- und Schilddrüsenkarzinomgewebe.

1.6.1 ^{131}I Iod

Zur RIT wird das Radioiod-Isotop ^{131}I verwendet. ^{131}I zerfällt zu ^{131}Xe (^{131}Xe). Die physikalische Halbwertszeit beträgt 8,02 Tage. Die dabei emittierte Strahlung besitzt einen 20 %igen β^- -Anteil und einen 80 %igen γ -Anteil. Deshalb ist sowohl der Einsatz in der Schilddrüsendiagnostik als auch in der Therapie möglich. Allerdings ist die diagnostische Anwendung von ^{131}I heutzutage auf die Therapiekontrolle beschränkt.

Die therapeutisch relevante β^- -Strahlung (β^-) hat eine mittlere Energie von 0,19 MeV. Die mittlere Reichweite beträgt 0,44 mm bei einer maximalen Reichweite von 2,2 mm. ^{131}I wird – wie das physiologisch über die Nahrung dem Körper zugeführte I – über den NIS in die Schilddrüsenzellen aufgenommen. Es wird besonders im Zellkern sowie in der apikalen Zellmembran und im Kolloid gespeichert (Bell und Grünwald, 1999; Schicha, 2000).

1.6.2 Indikation zur Radioiodtherapie

Bei allen differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (außer bei papillären Karzinomen im Stadium pT1aN0M0) wird im Anschluss an eine totale Thyroidektomie eine RIT durchgeführt. Weitere Indikationen sind Lokalrezidive, Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie nicht vollständig operativ entfernbare Tumoren, die ^{131}I speichern (Dietlein et al., 2007 a). Keine Indikation zur RIT besteht beim medullären und anaplastischen Schilddrüsenkarzinom, da diese kein ^{131}I aufnehmen (Bell und Grünwald, 1999; Schicha, 2000).

Auch bei einigen benignen Schilddrüsenerkrankungen ist eine RIT indiziert. Hierzu zählen die manifeste Hyperthyreose bei Autonomie und Morbus Basedow, die

latente Hyperthyreose bei Autonomie, die Struma mit oder ohne Autonomie und die Rezidivstruma mit und ohne funktionelle Autonomie (Dietlein et al., 2007 b).

1.6.3 Radioiodtherapie von malignen Schilddrüsenerkrankungen

Die Effektivität der RIT bei malignen Schilddrüsenerkrankungen ist abhängig von der Radioiodspeicherung. Diese hängt vom TSH-Spiegel ab. Die basale TSH-Konzentration sollte größer als 30 mU/l betragen. Dies ist in der Regel drei bis fünf Wochen nach Thyroidektomie oder vier bis fünf Wochen nach Absetzen einer T₄-Substitution erreicht. Diese Methode wird als endogene TSH-Stimulation bezeichnet. Alternativ besteht die Möglichkeit der exogenen TSH-Stimulation mit rekombinantem humanem TSH (rhTSH). Der Vorteil dabei ist, dass ein Schilddrüsenhormontzug nicht bzw. nur kurzzeitig notwendig ist.

Die RIT erfolgt aufgrund der Strahlenschutzverordnung in Deutschland unter stationären Bedingungen. ¹³¹I wird oral als Kapsel oder auch in flüssiger Form appliziert. Die Standardaktivität bei der RIT beträgt 2 GBq bis 3,7 GBq ¹³¹I, bei Hochrisikopatienten bis zu 30 GBq. Idealerweise soll eine Herddosis von mehr als 300 Gy erreicht werden. Zur RIT von Lokalrezidiven, Lymphknoten- und Fernmetastasen sowie nicht vollständig operativ entfernbaren Tumoren werden höhere Dosen ¹³¹I appliziert. Die Standardaktivität beträgt hierbei 4 GBq bis 30 GBq bzw. erfordert eine individuelle Aktivitätsabschätzung (Dietlein et al., 2007 a).

1.6.4 Radioiodtherapie von benignen Schilddrüsenerkrankungen

Die RIT der benignen Schilddrüsenerkrankungen unterscheidet sich von der der malignen Tumoren vor allem in der Dosierung des ¹³¹I und dem angestrebten Serum-TSH-Spiegel (Dietlein et al., 2007 b). Hierbei wird der TSH-Spiegel supprimiert und sollte je nach Erkrankung z. B. bei < 0,1 mU/l (funktionelle Autonomie) oder bei 0,3 mU/l bis 1,0 mU/l (Morbus Basedow) liegen. Durch die Suppression reichert sich ¹³¹I in den Arealen des pathologisch gesteigerten Stoffwechsels an. Das gesunde Schilddrüsenengewebe nimmt unter TSH-Suppression nur wenig ¹³¹I auf und wird geschont (Pfannenstiel et al., 1999 c).

1.7 Klinische Anwendung von Retinoiden

1.7.1 Vitamin-A-Präparate und -Analoga in Forschung und Therapie

Neben der in der Natur vorkommenden ATRA und 9-cis-RA werden in der Forschung und Therapie auch synthetische Retinoide – teilweise mit Rezeptorselektivität – zum Einsatz gebracht. Ein frühes RA-Analogon ist 4-[(E)-2-(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthalenyl)-1-propenyl]benzoic acid (TTNPB). TTNPB wurde als ein Analogon der all-trans Isoform der RA beschrieben und ist ein selektiver Agonist am RAR (siehe Abbildung 4) (Pattanayek und Newcomer, 1999; Lu et al., 2008).

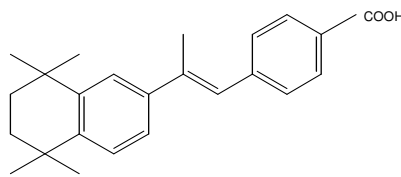


Abb. 4: Chemische Strukturformel von TTNPB (nach Nagy et al., 1995).

Zu den RXR-selektiven Retinoiden zählen LG268 und Bexaroten (LG1069, Targretin®). Sie werden auch als Rexinoide bezeichnet. Neben der RXR-Selektivität von Bexaroten, induziert dieses die Transkription des RAR-Rezeptors (Liu et al, 2006; Sharma et al., 2006; Golden et al., 2007).

1.7.2 Therapeutische Anwendung von Retinoiden

Retinoide finden in der Klinik ihre Anwendung in der Therapie von zahlreichen Erkrankungen. In der Dermatologie werden benigne Erkrankungen wie z. B. die Acne vulgaris und die Psoriasis sowie maligne Erkrankungen wie das kutane T-Zell-Lymphom mit Retinoiden behandelt (Thielitz und Gollnik, 2008; Horwitz, 2008; Lee und Li, 2009). Aber auch in der Kebstherapie und -prävention gewinnt die therapeutische Anwendung von Retinoiden wegen ihres grundlegenden Einflusses auf Wachstum und Differenzierung an Bedeutung (Schmutzler und Köhrle, 2000). So macht man sich die redifferenzierende Wirkung von ATRA in der Therapie der akuten Promyelozytenleukämie in Kombination mit Chemotherapeutika zu Nutze (Breitman et al., 1981; Tallman und Altman, 2008). Rizvi et al. zeigten, dass Bexaroten dosisabhängig den Tumorprogress von Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) im Anschluss an eine platinbasierte Chemotherapie verlangsamen kann (Rizvi et al., 2001). Ebenfalls

ergaben Studien zur Therapie von Brustkrebs mit Retinoiden erste positive Ergebnisse (Esteva et al., 2003).

1.7.3 Retinoide in der Therapie von Schilddrüsenerkrankungen

Auch in der Schilddrüsenforschung und der Therapie von Schilddrüsenerkrankungen werden heutzutage Retinoide angewendet. Vor allem die Wirkung der Retinoide in der Behandlung von Schilddrüsenmalignomen wird erforscht. Hierbei versucht man sich den positiven Effekt auf die Zelldifferenzierung (siehe unter 1.3) zu Nutze zu machen. In-vitro-Experimente haben gezeigt, dass RA das Tumorzellwachstum hemmt, indem sie die Apoptose induziert und die DNA-Synthese hemmt (Elisei et al., 2005). Außerdem konnte eine verminderte Invasivität – gemessen an der Expression von Adhäsionsproteinen – festgestellt werden (Lan et al., 2009). Ferner gibt es Hinweise auf eine redifferenzierende Wirkung der Retinoide in Schilddrüsenkarzinomzellen. Van Herle et al. konnten einen signifikant höheren ^{125}I -Uptake sowie eine vermehrte TSH-Bindung von Zellen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms, die mit 13-cis-RA behandelt wurden, beobachten (van Herle et al., 1990). Schreck et al. fanden heraus, dass RA die Aktivität der Iodothyronin-5-deiodinase, einem Enzym der Schilddrüsenhormonsynthese und Differenzierungsmarker, erhöht (Schreck et al., 1994). Außerdem konnte in Zellen follikulärer und anaplastischer Schilddrüsenkarzinome eine gesteigerte NIS-mRNA-Expression gemessen werden (Schmutzler et al., 1997).

In klinischen Studien wurde eine Erhöhung des Radioiod-Uptake nach Behandlung mit 13-cis-RA bei 42 % bis 50 % der Patienten beobachtet (Simon et al., 1998; Simon et al., 2002). Ähnlich gute Resultate konnten in anderen klinischen Studien nicht erbracht werden. Short et al. wiesen nur bei 1 von 16 Patienten (6 %) mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom, die über acht Wochen mit Isotretinoin behandelt wurden, einen erhöhten Radioiod-Uptake nach (Short et al., 2004). Kim et al. behandelten 11 Patienten mit 13-cis-RA über fünf Wochen und konnten bei 2 Patienten (18 %) eine Steigerung des ^{131}I -Uptake messen (Kim et al., 2009). Liu et al. konnten in klinischen Studien zum Radioiod-Uptake nach Vorbehandlung mit dem synthetischen Retinoid Bexaroten in der Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) einen vermehrten ^{131}I -Uptake nachweisen. Jedoch war der Uptake so gering, dass er nicht in der Ganzkörperszintigraphie nachweisbar war. Außerdem stimmte die in der SPECT

gesehene Tumorausbreitung nicht mit der in der Computertomographie (CT) gesehenen überein. Sechs Wochen nach Vorbehandlung mit Bexaroten konnte dieser Effekt nicht mehr nachgewiesen werden (Liu et al., 2006; Liu et al., 2008). Die Ergebnisse aus klinischen Studien sprechen dafür, dass trotz viel versprechender Resultate in In-vitro-Studien der Therapieerfolg der Retinoide begrenzt ist.

1.8 Zielsetzung

Ziele dieser Arbeit waren Untersuchungen zur pharmakologischen Beeinflussung des ^{131}I -Uptake in In-vitro-Modellen. Dabei sollten unterschiedliche pharmakologische Wirkprinzipien zum Einsatz kommen. Neben dem klassischen TSH-basierten Prinzip – hier sollte ein neues TSH-Analogon getestet werden – sollte der direkte Einfluss von Retinoiden auf den ^{131}I -Uptake untersucht werden. Basis für diese Untersuchungen ist eine NIS-Expression bzw. die Fähigkeit der Zellen des In-vitro-Modells, ^{131}I aufzunehmen. Aus diesem Grund wählten wir die Zelllinien FRTL-5 und ML-1 (Ambesi-Impiombato und Perrild, 1989; Schönberger et al., 2000).

Wie unter 1.6.3 beschrieben, ist der TSH-Spiegel für den Erfolg der RIT entscheidend. Allerdings zeigen Schilddrüsenkarzinome aufgrund einer verminderten NIS-Expression und einer verminderten TSH-Rezeptor-Expression (siehe unter 1.4.2) einen reduzierten Radioiod-Uptake. Deshalb wird versucht, potentere TSH-Analoga zu entwickeln. Es sollte verglichen werden, wie sich unterschiedliche Konzentrationen von TSH-Analoga auf den ^{131}I -Uptake in den gewählten In-vitro-Modellen auswirken. Neben dem Einfluss von bovinem TSH (bTSH) und rhTSH wurde TSH TR1401 auf seine Potenz zur Steigerung des ^{131}I -Uptake untersucht.

Die zweite Substanzklasse, die exemplarisch untersucht werden sollte, sind die Retinoide, welche auch in der Therapie von Schilddrüsenkarzinomen angewendet werden. Es konnte bereits in In-vivo- und In-vitro-Studien gezeigt werden, dass Retinoide den Radioiod-Uptake erhöhen. Unklar ist allerdings, ob es eine direkte Wirkung von Retinoiden auf die Schilddrüsenzellen gibt. So zeigten Schmutzler et al., dass ATRA die NIS-mRNA-Expression von FRTL-5-Zellen supprimiert und den ^{125}I -Uptake senkt (Schmutzler et al., 1997). Diese widersprüchlichen Ergebnisse wollten wir mit unserer Methode überprüfen. Wir untersuchten deshalb die

Wirkung des Retinoids TTNPB auf die oben genannten Zelllinien und erhofften uns einen positiven Effekt auf den ^{131}I -Uptake nachzuweisen.

2. Materialien und Methoden

Die Zellkulturen wurden unter keimarmen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank Klasse 2 gehandhabt. Für die Kultivierung und die Experimente wurden sterile Einwegartikel und sterile Reagenzien benutzt. Lösungen, die nicht steril zur Verfügung standen, wurden durch Sterilfiltration in einem Stericup-Vakuum-Filterssystem (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) für den Gebrauch vorbereitet.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Für die Versuche wurde ein Subklon der an der Universität zu Lübeck vorhandenen Zelllinie FRTL-5 und der Zelllinie ML-1 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) verwendet.

Die FRTL-5-Zellen wachsen TSH-abhängig als Monolayerkulturen. Die Zellen wurden in Coon's Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) mit Ham's F12 Modifikation kultiviert. Dieses enthält 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000/10 mg/ml), 1 % Glutamin (200 mM), 5 % Newborn Calf Serum (alle PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) sowie 5 IU/l bTSH (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) und einen Hormon-Cocktail aus Glycyl-Histidyl-L-Lysin 1 µg/ml, Hydrocortison 0,362µg/ml, Insulin 1 mg/ml, Transferrin 500 µg/ml und Somatostatin 1 µg/ml (alle Hormone Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Das hier beschriebene Medium wird im Folgenden als H6-Medium bezeichnet.

ML-1-Zellen sind Zellen eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms. Ein ¹³¹I-Uptake unter Einfluss von TSH wurde beschrieben (Schönberger et al., 2000). Die Zellen wachsen wie bereits beschrieben als Monolayerkulturen. Das Kulturmedium enthielt 89 % Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (4,5 g/l Glucose; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) mit 2 mM L-Glutamin Natriumpyruvat, 10 % fötales bovines Serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 Units/10 mg/ml; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich). Dieses Medium wird im Folgenden als DMEM bezeichnet.

Beide Zelllinien wurde bei einer Temperatur von 37 °C und 5 % CO₂-Begasung im Brutschrank (Heraeus 6000, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Die Zellkulturgefäße (Greiner BIO-One GmbH, Frickenhausen,

Deutschland) hatten eine Anheftungsfläche von 75 cm². Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei bis vier Tage. Das Splitten bzw. Umsetzen (1:8) der beiden Zellkulturen erfolgte einmal pro Woche.

2.1.2 Umsetzen der Zellen

Im ersten Schritt wurde das Medium aus der Zellkulturflasche abgegossen. Danach wurde der Zellrasen zweimal mit 15 ml PBS-Puffer (ph 7,2; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA (1:250; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) über 10 min bei 37 °C vom Flaschenboden abgelöst. Danach wurde das Trypsin mit 5 ml Medium (entsprechend der jeweiligen Zelllinie) neutralisiert und in ein 15 ml Falcon Zentrifugenröhrchen (Greiner BIO-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) abgegossen. In der Zellkulturflasche verbliebene Zellen wurden mit 5 ml PBS-Puffer unter Schwenken aus der Kulturflasche herausgewaschen und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegossen. Die Zentrifugenröhrchen wurden verschlossen und für 10 min bei 1100 rpm und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Sepatech Varifuge 32RS, Heraeus, Osterode, Deutschland). Nach dem Zentrifugieren lagen die Zellen als Zellpellet mit Medium- bzw. PBS-Puffer-Überstand vor. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet mit dem entsprechenden Medium in der gewünschten Menge redispergiert. Anschließend wurde 1 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit einer Anheftungsfläche von 75 cm² pipettiert und mit 19 ml Medium aufgefüllt.

2.1.3 Einfrieren und Auftauen der Zellen

In regelmäßigen Abständen wurden Kulturflaschen der beiden Zelllinien eingefroren. Der Ablauf glich dem Umsetzen bis zum Abgießen des Überstandes nach dem Zentrifugieren. Dann wurde das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (CryoMaxx S, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gelöst und die Zellsuspension in ein Einfrierröhrchen pipettiert. Das Einfrierröhrchen wurde dann direkt in ein Einfriergefäß gestellt und bei -20 °C im Gefrierschrank eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen in einem anderen Gefrierschrank bei -80 °C für weitere 24 h eingefroren. Die endgültige Lagerung der Einfrierröhrchen erfolgte bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen aus dem Stickstoff genommen und das gefrorene Einfriermedium mit 1 ml Zellkulturmedium bei Raumtemperatur unter

Durchmischung mit einer 1 ml Eppendorfpipette aufgetaut. Nach dem Pipettieren der Zellsuspension in ein Zellkulturgefäß konnte dieses mit 19 ml Zellkulturmedium aufgefüllt werden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen im Brutschrank.

2.2 Experimente

2.2.1 Zellkultivierung für die Experimente

Die Zellen wurden für die Experimente in Zellkulturgefäße mit einer Anheftungsfläche von 25 cm² (Greiner BIO-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) umgesetzt und mit 7 ml Zellkulturmedium inkubiert. Während den Experimenten fand weder ein Umsetzen der Zellen noch ein Mediumwechsel statt. In Tabelle 2 sind die Versuche mit den entsprechenden Modalitäten, der Zielsetzung und den Messzeitpunkten zusammengefasst.

	Versuch	Durchführung/Variation	Zielsetzung	Messzeitpunkte
1.	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen	Inkubation mit TSH-freiem Medium	¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen Proliferation der FRTL-5-Zellen in TSH-freiem Medium	24, 48, 72 h
2.1	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von bTSH	Inkubation mit bTSH in den Konzentrationen 0,01 IU/l, 0,05 IU/l, 0,2 IU/l	Einfluss der TSH-Konzentration auf den ¹³¹ I-Uptake Einfluss der TSH-Konzentration auf die Zellproliferation	24, 48, 72 h
2.2	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von rhTSH	Inkubation mit rhTSH in den Konzentrationen 0,01 IU/l, 0,05 IU/l, 0,2 IU/l	Einfluss der TSH-Konzentration auf den ¹³¹ I-Uptake Einfluss der TSH-Konzentration auf die Zellproliferation	24, 48, 72 h
2.3	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von TSH TR1401	Inkubation mit TSH TR1401 in den Konzentrationen 0,002 IU/l, 0,01 IU/l, 0,05 IU/l, 0,2 IU/l	Einfluss der TSH-Konzentration auf den ¹³¹ I-Uptake Einfluss der TSH-Konzentration auf die Zellproliferation	24, 48, 72 h

	Versuch	Durchführung/Variation	Zielsetzung	Messzeitpunkte
3.	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von TTNPB	Inkubation der Zellen mit 0,03 mg TTNPB	Einfluss von TTNPB auf den ¹³¹ I-Uptake Einfluss von TTNPB auf die Zellproliferation	24, 48, 72 h
4.	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen	Inkubation mit TSH-freiem Medium	¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen Proliferation der ML-1-Zellen in TSH-freiem Medium	24, 48, 72 h
5.1	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen unter Einfluss von bTSH	Inkubation mit bTSH in den Konzentrationen 0,05 IU/l, 0,2 IU/l und 1,00 IU/l	Einfluss der TSH-Konzentration auf den ¹³¹ I-Uptake Einfluss der TSH-Konzentration auf die Zellproliferation	24, 48, 72 h
5.2	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen unter Einfluss von rhTSH	Inkubation mit rhTSH in den Konzentrationen 0,05 IU/l, 0,2 IU/l und 1,00 IU/l	Einfluss der TSH-Konzentration auf den ¹³¹ I-Uptake Einfluss der TSH-Konzentration auf die Zellproliferation	24, 48 h
6.	Bestimmung des ¹³¹ I-Uptake der ML-1-Zellen unter Einfluss von TTNPB	Inkubation der Zellen mit 0,03 mg TTNPB	Einfluss von TTNPB auf den ¹³¹ I-Uptake Einfluss von TTNPB auf die Zellproliferation	24, 48, 72 h

Tab. 2: Übersicht über alle Experimente. Es werden die Variationen, die Zielsetzung und die Messzeitpunkte beschrieben.

2.2.2 Inkubation der FRTL-5-Zellen mit TSH-Analoga in unterschiedlicher Konzentration

Die Zellkulturen wurden nach dem Splitten in dem unter 2.1.1 beschriebenen H6-Medium inkubiert. Nach 48-stündiger Inkubationszeit zum Anwachsen der Zellen wurde das Medium abgegossen. Nach zweimaligem Waschen des Zellrasens mit PBS-Puffer wurden die Zellen für weitere 144 h in Coon's Medium mit Ham's F12 Modifikation ohne TSH kultiviert. Dieses Medium enthielt 1 % Penicillin/Streptomycin (10 000 /10 mg/ml), 1 % Glutamin (200 mM), 5 % Newborn Calf Serum und den unter 2.1.1 beschriebenen Hormon-Cocktail. Es wird im Folgenden als H5-Medium bezeichnet. Nach drei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel mit H5-Medium. Die in TSH-freiem Medium gezogenen Zellen werden als „schlafend“ bezeichnet, weil sie nicht mehr proliferieren.

Im Anschluss wurden die schlafenden Zellen in H5-Medium mit bTSH, rhTSH (Thyrogen[®], Genzyme, Cambridge MA, USA) oder TSH TR1401 (Trophogen, Inc., Rockville, Maryland, USA) in den Konzentrationen 0,2 IU/l, 0,05 IU/l, 0,01 IU/l und 0,002 IU/l (nur TSH TR1401) inkubiert. 24 h nach TSH-Zugabe erfolgte die ¹³¹I-Applikation in das Zellkulturmedium (siehe unter 2.4). Als Kontrollgruppe wurde eine Population von TSH-freien Zellkulturen mit ¹³¹I inkubiert. Parallel zu den Experimenten mit rhTSH und TSH TR1401 wurde eine Versuchsreihe mit bTSH untersucht.

2.2.3 Stimulation der ML-1-Zellen

Die ML-1-Zellen wurden für die Versuche mit einem Gemisch aus den unter 2.1 beschriebenen Medien DMEM und H6-Medium im Verhältnis DMEM/H6-Medium 4:1 (entspricht 1 IU/l bTSH) inkubiert. Das TSH-haltige H6-Medium diente zur Stimulation der ML-1-Zellen. Die Zellkulturen wurden über mehrere Passagen stimuliert.

2.2.4 Inkubation der ML-1-Zellen mit TSH-Analoga in unterschiedlicher Konzentration

Für die Experimente wurden ML-1-Zellen verwendet, die in einem DMEM/H6-Medium-Gemisch mit einer TSH-Konzentration von 1 IU/l stimuliert wurden. Nach 48-stündigem Anwachsen der Zellen wurde das Medium abgegossen und der Zellrasen zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden nun für 72 h in dem unter 2.1 beschriebenen TSH-freiem DMEM inkubiert. Dann erfolgten ein Mediumwechsel und anschließend die Zugabe von bTSH bzw. rhTSH in den Konzentrationen 1,0 IU/l, 0,2 IU/l und 0,05 IU/l. 24 h später wurde den Zellkulturen ¹³¹I in das Medium appliziert (siehe unter 2.4). Parallel wurden ML-1-Zellen in TSH-freiem Medium als Kontrollgruppe mit ¹³¹I inkubiert.

2.2.5 ¹³¹I-Uptake und Zellwachstum der FRTL-5- und ML-1-Zellen unter Einfluss von TTNPB

Die Zellkulturen zur Untersuchung des ¹³¹I-Uptake und des Zellwachstums unter Einfluss des Retinoids wurden je nach Zelllinie mit H6-Medium bzw. DMEM/H6-Medium (Verhältnis 4:1) inkubiert. Nach dem Anwachsen der Zellen wurden die Zellkulturen mit 0,03 mg TTNPB (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst in 150 µl

Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt, Germany) inkubiert. Die Dosierung orientierte sich an der therapeutischen Dosis von Retinoiden beim Patienten. Untersucht wurden das Zellwachstum und der ^{131}I -Uptake nach einfacher und mehrfacher TTNPB-Zugabe. Den Zellkulturen wurde hierzu entweder 48 h vor und zum Zeitpunkt der ^{131}I -Applikation (mehrfache TTNPB-Zugabe) oder nur zum Zeitpunkt der ^{131}I -Applikation (einfache TTNPB-Zugabe) TTNPB zugesetzt. Kulturen ohne TTNPB dienten als Kontrolle und wurden lediglich mit 150 μl DMSO inkubiert.

2.3 Radioiod

Für die Versuche wurde das Radionuklid ^{131}I (MDS Nordion S.A., Fleurus, Belgien) verwendet. ^{131}I wird im Kernreaktor erzeugt. Vom Hersteller wurde ^{131}I zum direkten Gebrauch in Phosphatpuffer gelöst geliefert. Die Ausgangskonzentration betrug 7400 MBq/ml. Zur besseren Dosierung wurde ^{131}I mit 0,9 %iger isotonischer NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt.

2.4 Inkubation mit Radioiod

Für die Uptake-Messungen wurden 100 μl ^{131}I in NaCl-Lösung in das Zellkulturmedium pipettiert. Zur Messung wurde ein Aliquot der ^{131}I -Lösung verwendet. Durch Festhalten des Zugabezeitpunktes konnten die Messergebnisse mit Hilfe des Zerfallsgesetzes später korrigiert werden. Für die Uptake-Messung wurde eine Aktivitätsmenge von 0,7 MBq appliziert.

2.5 Messung der applizierten Aktivitätsmenge

Die applizierte Aktivitätsmenge wurde in einem Aktivimeter (CRC-15R, Capintec, inc., Ramsey, USA) gemessen. Das Messprinzip beruht darauf, dass Radioaktivität in einer gasgefüllten Kammer Ionisationen erzeugt, die als Strom gemessen werden können. Dieser Strom ist proportional zur Aktivität eines bestimmten Radionuklids. Das Gerät verfügt über eingespeicherte Programme für unterschiedliche Isotope.

2.6 Abschätzung der Bestrahlungsdosis durch ^{131}I

Mit der Marinelli-Formel konnte die maximale Bestrahlungsdosis, die durch ^{131}I auf die Zellen gewirkt hat, berechnet werden:

$$\text{Energie [eV]} = E_{\text{Durchschnitt}} \times \text{Aktivität}_{\text{Durchschnitt}}^{131}\text{I} \times \text{Bestrahlungszeit}$$

Für β^- gilt: $E_{\text{Durchschnitt}} = 1/3 E_{\text{max}}$. Die Aktivität $_{\text{Durchschnitt}}^{131}\text{I}$ wurde berechnet aus der kumulativen Dosis über die Zeit (24 h ~ 95 % der Aktivität zu Anfang).

$$1 \text{ eV} = 1,602 \times 10^{-19}$$

$$\text{Dosis [Gy]} = \text{Energie [J]} / \text{Masse [kg]}$$

Die Menge des Kulturmediums wurde als Masse eingesetzt und der Uptake als 100 % angenommen. Die Annahmen ergaben die maximale Dosis in dem geschlossenen Kulturgefäß. Folglich ist das Ergebnis eine Einschätzung der maximalen Dosis, die auf die Zellen gewirkt hat. Die Bestrahlungsdosis durch β^- betrug 0,25 Gy nach 24 h, 0,48 Gy nach 48 h und 0,69 Gy nach 72 h.

2.7 Uptake Messung

Die Uptake-Messung und die Bestimmung der Zellzahl erfolgten bei allen Versuchen 24 h, 48 h und 72 h nach ^{131}I -Zugabe. Eine Ausnahme stellten die mit rhTSH inkubierten ML-1-Zellen dar, deren Uptake und Zellzahl 24 h und 48 h nach ^{131}I -Applikation gemessen wurden.

2.7.1 Ernten der Zellen

Vor der Uptake-Messung wurde das Medium der Zellkulturen abgegossen und der Zellrasen jeweils zweimal mit 5 ml PBS-Puffer gewaschen. Der Zellrasen wurde dann mit 1 ml Trypsin/EDTA für 10 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin mit 1,6 ml Medium neutralisiert und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon Zentrifugenröhrchen abgegossen. Im Kulturgefäß verbliebene Zellen wurden mit 1,6 ml PBS-Puffer herausgewaschen und zu den übrigen Zellen in das Zentrifugenröhrchen abgegossen. Die Zellen wurden nun 10 min bei 1100 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das aufgereinigte Zellpellet in 1,5 ml Medium redispergiert.

2.7.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach dem Trypanblau-Ausschluss-Verfahren. Dabei färben sich abgestorbene Zellen blau und können somit von vitalen Zellen differenziert werden. Hierfür wurden 100 µl Zellsuspension entnommen und in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen (Safe Seal Micro Tubes, Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, Deutschland) pipettiert und mit Medium weiter verdünnt. Anschließend wurde den Zellen 50 µl bis 100 µl Trypanblau (0,4 %; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) zugesetzt. Dann wurden die Zellen in eine Neubauer-Zählkammer (Assistent, Sondheim, Deutschland) pipettiert und unter einem Aufsichtmikroskop (Bx 40, Olympus-Europe, Hamburg, Deutschland) ausgezählt. Die Zellzahl ergab sich aus dem um den Verdünnungsfaktor korrigierten Mittelwert von 4 Werten.

2.7.3 Bestimmung des ¹³¹I-Uptake

Die Proben wurden in einem Bohrloch-Detektor (Multilogger LB 5310, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Die Messeinheit des Gerätes registriert Szintilationsblitze, die durch die Energie der absorbierten Strahlung in einem NaI-Szintilationskristall entstehen. Der Ausgabewert Zerfälle pro Minute (cpm) ist proportional zur Anzahl der Lichtblitze. Diese ist wiederum abhängig von der Aktivität, dem jeweiligen Isotop sowie der Messgeometrie.

Die Messung der Zellsuspension erfolgte in 1,4 ml Medium. Die Zerfälle pro Minute wurden anschließend auf ein Volumen von 1,5 ml umgerechnet, da – wie unter 2.7.2 beschrieben – 100 µl zur Auszählung der Zellen verwendet wurde. Die Messdauer betrug 1 min. Jede Probe wurde zweimal gemessen. Aus den beiden Werten wurde der Mittelwert berechnet. Der Messzeitpunkt wurde festgehalten und zur Zerfallskorrektur verwendet.

2.7.4 Leerwertbestimmung

Parallel zu den Zellkulturen wurde zu jedem Messzeitpunkt ein Leerwert bestimmt. Hierfür wurde am Tag der Aktivitätszugabe für jeden Messzeitpunkt eine mit 7 ml Medium gefüllte Flasche mit der für die Zellkulturen verwendeten Aktivitätsmenge befüllt. Die Flaschen zur Leerwertbestimmung wurden analog zu den Zellkulturflaschen behandelt. An den Messtagen wurde der Uptake bestimmt. Der Leerwert wurde schließlich vom Uptake der Zellkulturen subtrahiert, um den absoluten

Uptake der Zellen zu bestimmen. Dieses Verfahren wurde gewählt, um den Verbleib von ^{131}I -Spuren im Medium der geernteten Zellen und Aktivitätsverunreinigungen in den Gefäßen zu korrigieren.

2.8 Auswertungen der Uptake-Messung

2.8.1 Standardkurve

Im Vorfeld der Versuche wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurden jeweils dreimal 10 μl , 25 μl , 50 μl , 100 μl und 1500 μl einer ^{131}I -Lösung (86,5 kBq/ml) auf 1,5 ml aufgefüllt und gemessen. Anschließend wurde in Excel (Microsoft, Redmond, USA) aus der Standardkurve durch lineare Regression eine Geradengleichung ermittelt. Mittels dieser Gleichung wurden die Zerfälle pro Minute der Messung in MBq umgerechnet.

2.8.2 Rechnung

Bei der Interpretation des Messergebnisses wurde der radioaktive Zerfall berücksichtigt. Da dieser einer Kinetik nullter Ordnung unterliegt, ist die Aktivität zum Zeitpunkt (t) nur vom Messzeitpunkt und der Halbwertszeit des Isotops abhängig. Die Stoffmenge spielt für den Zerfall keine Rolle.

$$A(t) = A(0) \cdot \exp(-\ln 2 \cdot t / t_{1/2})$$

Nach linearer Umformung ergibt sich:

$$A(0) = A(t) / (\exp(-\ln 2 \cdot t / t_{1/2}))$$

(mit $A(0)$ = Aktivität bei ^{131}I -Zugabe, $A(t)$ = Aktivität beim Messzeitpunkt,
 t = Messzeitpunkt und $t_{1/2}$ = Halbwertszeit)

Der Messwert des Uptake wurde durch Einsetzen in die obige Gleichung korrigiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe der aus der Standardkurve erhaltenen Gradengleichung die Berechnung des Wertes in MBq. Das Ergebnis wurde auf die applizierte Aktivität pro ml bezogen. Da ein vom Zellwachstum unabhängiger Vergleichswert erzielt werden sollte, wurde der prozentuale Uptake anschließend auf 10^6 Zellen bezogen.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen erfolgten mittels SPSS 15.0 und SPSS 17.0 (SPSS, inc., Chicago, USA). Bestimmt wurden der Median, die 25. und 75. Quartile, die Standardabweichung und der Mittelwert. Außerdem wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Damit sollten signifikante Änderungen des ¹³¹I-Uptake und der Zellzahl zwischen den einzelnen Messzeitpunkten in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration und des TSH-Analogons bzw. TTNPB ermittelt werden. Als signifikant wurden Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ gewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Standardkurve

In der Standardkurve ist der lineare Zusammenhang zwischen den gemessenen Zerfällen pro Minute (cpm) und der applizierten Aktivität – gemessen in Becquerel (Bq) – dargestellt. Die Kurve wurde für ^{131}I erstellt. Mittels linearer Regression wurde dann die Geradengleichung ermittelt (siehe Abbildung 5).

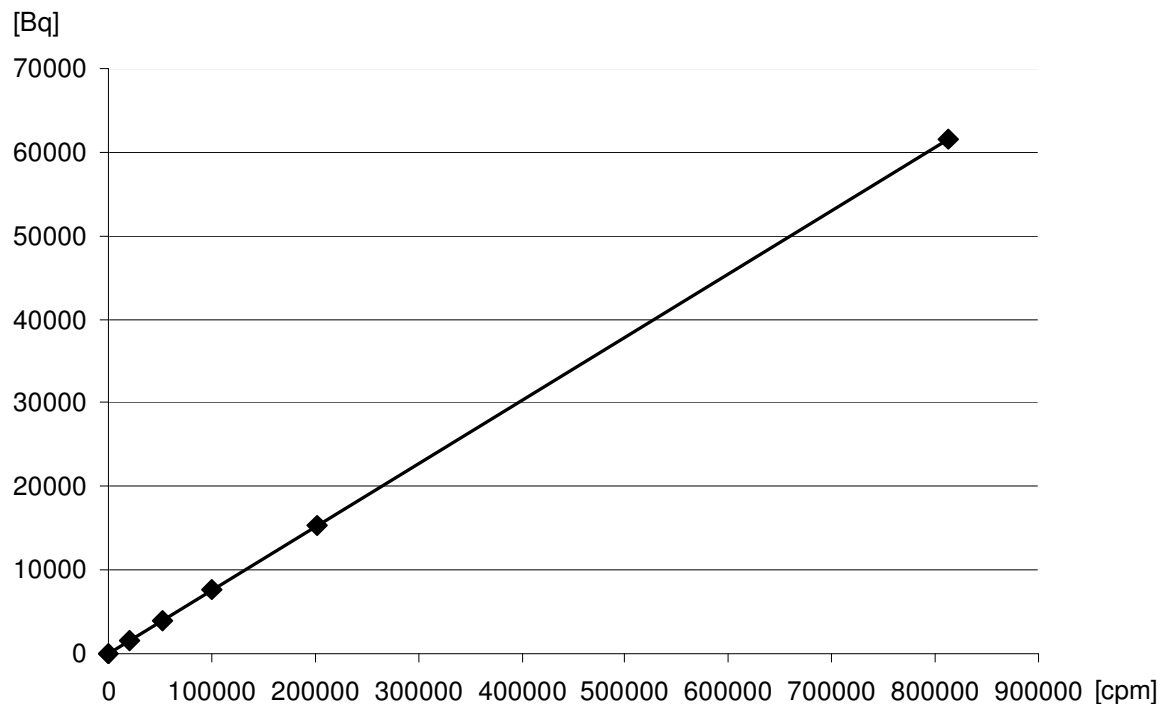


Abb. 5: Standardkurve für ^{131}I mit eingezeichneter Trendlinie. Die gemessenen Zerfälle pro Minute (cpm) wurden gegen die eingesetzten Becquerel (Bq) aufgetragen.

Aus der Abbildung geht für ^{131}I der Zusammenhang hervor:

$$y = 0,0807x \text{ mit } R^2 = 0,9986$$

R^2 steht in diesem Zusammenhang für das Bestimmtheitsmaß.

Durch Einsetzen der zerfallskorrigierten gemessenen Zerfälle pro Minute in die Gleichung erhält man die entsprechende Aktivität in Becquerel.

3.2 Proliferation

Die Zellzahl bzw. die Zellproliferation zu den Messzeitpunkten wurde parallel zu allen Uptake-Messungen bestimmt. Dies war aus methodischen Gründen unabdingbar, da die gemessenen ¹³¹I-Uptake-Werte auf die Zellzahl bezogen wurden. Zusätzlich konnte die Auswirkung der drei TSH-Analoga bzw. des TTNPB auf die Zellproliferation untersucht werden. Die Proliferation unter rekombinantem humanem TSH (rhTSH) und TSH TR1401 wurde jeweils parallel zu den zeitgleich abgelaufenen Experimenten mit bovinem TSH (bTSH) untersucht. Für die Auswertung der Zellproliferation wurden die Mittelwerte der Einzelergebnisse verwendet.

3.2.1 Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von bTSH

FRTL-5-Zellen werden üblicherweise in TSH-haltigem H6-Medium kultiviert (Ambesi-Impiombato et al., 1980). In TSH-freiem Medium wurden FRTL-5-Zellen als nicht mehr proliferierend beschrieben und als „schlafend“ bezeichnet (siehe unter 2.2.2).

In Tabelle 3 ist die Zeitabhängigkeit der Proliferation der FRTL-5-Zellen über den gesamten Versuchszeitraum dargestellt. Demnach wuchsen die Zellkulturen, die mit bTSH in der hohen bzw. mittleren Konzentration (0,2 IU/l bzw. 0,05 IU/l) inkubiert wurden, über den gesamten Versuchsverlauf. Im Vergleich zur ersten Bestimmung nach 24 h stieg die Zellzahl nach 48 h um 33 % bis 42 % an ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Im Verlauf war ein weiterer Anstieg der Zellzahl bis auf 147 % bzw. 153 % des Ausgangswertes nachzuweisen. Nach 72 h lag die Zellzahl damit signifikant über der Zellzahl der 24-h-Messung ($p < 0,05$).

Bei geringen TSH-Konzentrationen von 0,01 IU/l bTSH stagnierte das Zellwachstum im Untersuchungszeitraum. Obwohl die Zellzahl der unbehandelten Zellen (ohne TSH) nach 48 h signifikant höher lag als nach 24 h, war nach 72 h keine signifikante Zellzahländerung messbar.

Zusammenfassend bewirkten hohe und mittlere bTSH-Konzentrationen (0,2 IU/l und 0,05 IU/l) bei FRTL-5-Zellen eine Proliferation über den gesamten Versuchsverlauf. Bei Inkubation mit niedrigen TSH-Konzentrationen bzw. TSH-freiem Medium war nach 72 h keine signifikante Proliferation nachweisbar.

	24 h	48 h	72 h
0,20 IU/l bTSH	100 % ± 52	142 % ± 35 **	153 % ± 60 *
0,05 IU/l bTSH	100 % ± 40	133 % ± 30 *	147 % ± 53 *
0,01 IU/l bTSH	100 % ± 50	96 % ± 27	97 % ± 43
0,00 IU/l bTSH	100 % ± 41	135 % ± 35 *	111 % ± 33

Tab. 3: Zellwachstum der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit bovinem TSH (bTSH) und ¹³¹I. Die Zellzahl ist auf den 24-h-Wert der jeweiligen TSH-Konzentration normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt dargestellt (n=10; *p<0,05; **p<0,01). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten der Zellzahl bei gleichen TSH-Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

In Abbildung 6 ist das konzentrationsabhängige Wachstum der FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit bTSH dargestellt. Nach 24 h lag die Zellzahl der mit der höchsten Dosis bTSH (0,2 IU/l) inkubierten Zellen um 30 % bzw. 39 % höher als die Zellzahl der mit 0,05 IU/l inkubierten und unbehandelten Zellen (p<0,05 und p<0,01). Nach 48 h lag die Zellzahl der mit 0,2 IU/l bTSH inkubierten Zellen um 39 % bis 60 % höher als die mit niedrigeren TSH-Dosen inkubierten und unbehandelten Zellen (p<0,05). Nach 72 h lag die Zellzahl der mit den beiden höchsten bTSH-Konzentrationen (0,2 IU/l und 0,05 IU/l) inkubierten Zellen signifikant höher als die der mit 0,01 IU/l inkubierten und unbehandelten Zellen (p<0,05 und p<0,01). Die Zellzahl der mit 0,2 IU/l inkubierten Zellen war nach 72 h – mit im Mittel 1.875.750 Zellen – fast doppelt so hoch (192 %) als die Zellzahl der unbehandelten Proben.

Somit konnte für unseren Versuchszeitraum von 72 h verifiziert werden, dass das Zellwachstum sowohl von der Konzentration des bTSH als auch von der Inkubationsdauer abhängt.

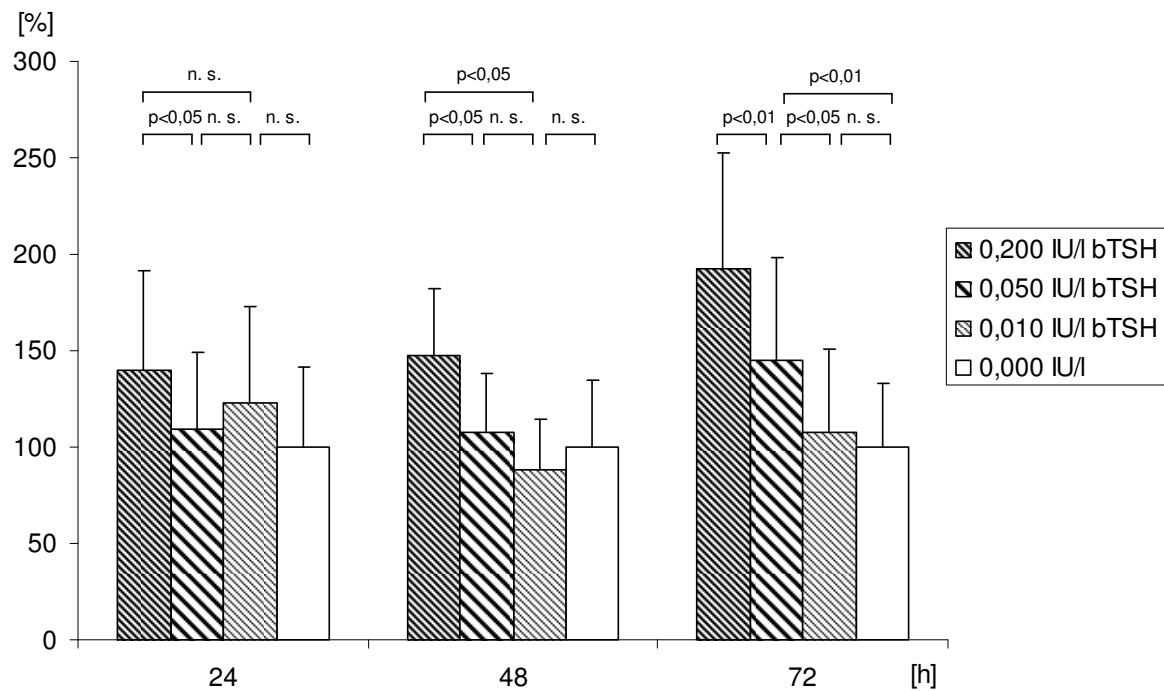


Abb. 6: Zellzahl der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit bovinem TSH (bTSH) und ^{131}I . Die Zellzahl ist auf den Wert der unbehandelten Zellen (ohne TSH) zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=10$). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten der Zellzahl bei unterschiedlichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

3.2.2 Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von rhTSH

Nach Inkubation mit rhTSH stieg die Zellzahl der mit 0,2 IU/l inkubierten Zellen über den gesamten Versuchszeitraum um 45 % an ($p<0,01$). Die mit niedrigeren Dosen rhTSH inkubierten Zellen zeigten keine signifikante Zellzahlvermehrung im Beobachtungszeitraum.

Obwohl nach 24 h die Zellzahl der mit 0,05 IU/l rhTSH inkubierten Zellen über der, der unbehandelten Zellen lag, konnten zu diesem Zeitpunkt keine konzentrationsabhängigen Unterschiede in der Zellproliferation gemessen werden. Nach 48 h und 72 h war die Zellzahl der mit der höchsten Konzentration (0,2 IU/l) rhTSH inkubierten Zellen signifikant höher als die Zellzahl der mit niedrigeren Dosen inkubierten und unbehandelten Zellen ($p<0,05$ und $p<0,01$). Nach 72 h lag die Zellzahl der mit 0,05 IU/l und 0,01 IU/l inkubierten Zellen signifikant über der Zellzahl der unbehandelten Zellen ($p<0,05$).

Somit konnte auch für mit rhTSH behandelte FRTL-5-Zellen ein konzentrationsabhängiges Wachstum nach längerer Inkubation beobachtet werden (ohne Abbildung).

3.2.3 Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von TSH TR1401

Die FRTL-5-Zellen wurden mit dem TSH-Analogen in den Konzentrationen 0,2 IU/l, 0,05 IU/l, 0,01 IU/l und 0,002 IU/l inkubiert. Nach 24 h war die Zellzahl der mit TSH TR1401 inkubierten Zellen um 42 % bis 62 % im Vergleich zu den unbehandelten Zellen gestiegen ($p < 0,01$). Im weiteren Versuchsverlauf fiel die Zellzahl der Proben mit TSH TR1401 ab. Dennoch war nach 48 h die Zellzahl der mit TSH TR1401 inkubierten Proben signifikant höher als die der unbehandelten Zellen ($p < 0,05$ und $p < 0,01$). Nach 72 h waren die Zellzahlen der mit dem TSH-Analogen inkubierten Zellen bei allen vier Konzentrationen signifikant niedriger als zum ersten Messzeitpunkt ($p < 0,05$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen der mit TSH TR1401 und denen der unbehandelten Zellen gemessen werden.

Die Zellzahlen der mit unterschiedlichen Konzentrationen TSH TR1401 inkubierten Proben unterschieden sich nach 24 h und 48 h nicht. Dennoch lag die Zellzahl der mit höheren Konzentrationen (0,2 IU/l und 0,05 IU/l) inkubierten Zellen nach 72 h signifikant niedriger als die Zellzahl der mit niedrigeren Konzentrationen (0,01 IU/l) inkubierten Zellen.

TSH TR1401 stimulierte die Proliferation der FRTL-5-Zellen, jedoch konnte keine Konzentrationsabhängigkeit nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

3.2.4 Vergleich der Proliferation der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von bTSH, rhTSH und TSH TR1401

Wir verglichen die Zellproliferation der FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit bTSH, rhTSH und TSH TR1401 in analogen Konzentrationen. Die Proliferation der mit rhTSH inkubierten Zellen unterschied sich statistisch nicht signifikant von der Proliferation der mit bTSH inkubierten Zellen. Beim Vergleich von bTSH und TSH TR1401 und deren Einfluss auf die Zellproliferation konnte kein eindeutiger Trend gemessen werden (ohne Abbildung).

3.2.5 TTNPB-abhängige Proliferation der FRTL-5-Zellen

Die mit TTNPB in H6-Medium (5 IU/l bTSH) inkubierten FRTL-5-Zellen wuchsen kontinuierlich. Im zeitlichen Verlauf stiegen die Zellzahlen nur langsam an. Lediglich die Zellzahl der mehrfach mit TTNPB inkubierten Zellen war nach 72 h signifikant gegenüber dem 24-h-Wert angestiegen ($p < 0,05$) (ohne Abbildung).

Nach 24 h und 48 h konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellzahlen der mit TTNPB inkubierten Zellen und denen der unbehandelten Zellen gemessen werden. Nach 72 h lag die Zellzahl der unbehandelten Zellen um 52 % bzw. 57 % niedriger als die der mit TTNPB inkubierten Zellen. Dennoch war dieses Ergebnis nicht signifikant (siehe Abbildung 7).

Die Zellzahl der mehrfach mit TTNPB inkubierten Zellen unterschied sich zu keinem Messzeitpunkt signifikant von der Zellzahl der einfach mit TTNPB inkubierten Zellen.

TTNPB hat innerhalb des von uns gewählten Versuchszeitraumes sowohl nach einfacher als auch nach mehrfacher Applikation keinen signifikant nachweisbaren Einfluss auf die Proliferation der FRTL-5-Zellen.

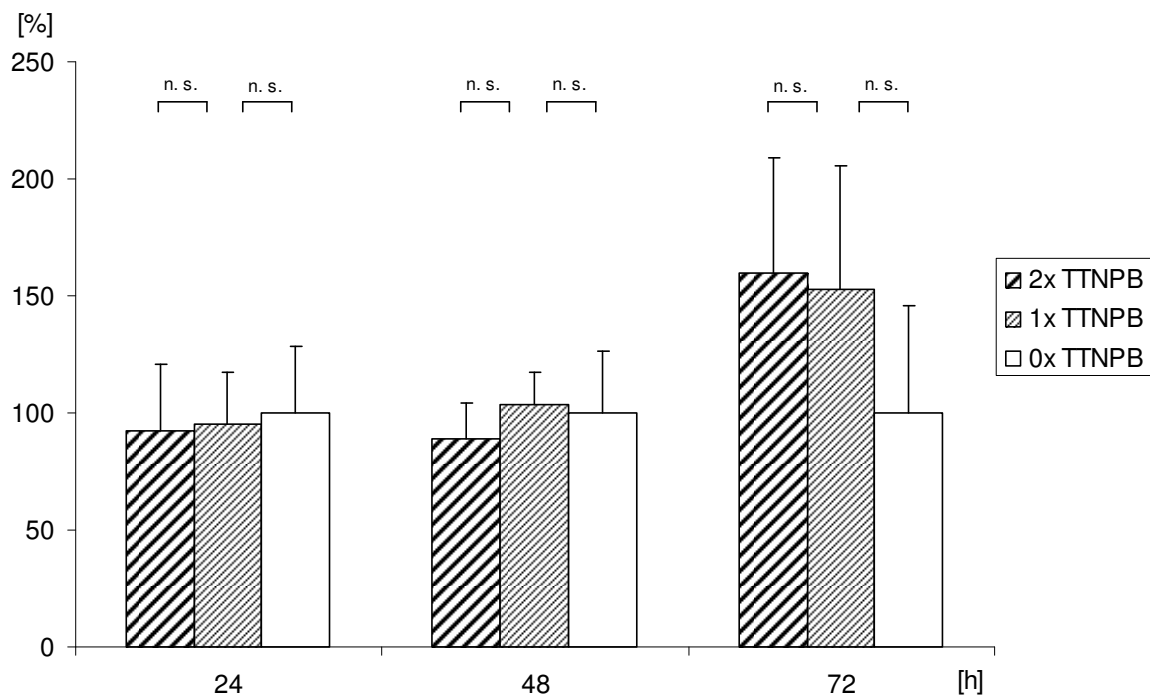


Abb. 7: Zellzahl der FRTL-5-Zellkulturen nach einfacher (1x TTNPB) bzw. mehrfacher (2x TTNPB) Inkubation mit TTNPB und ^{131}I . Die Zellzahl ist auf den Wert der unbehandelten Zellen (ohne TTNPB) (0x TTNPB) zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Die Ergebnisse der mit TTNPB inkubierten Zellen sind als Mittelwert \pm SD aus zwei getrennten Experimenten mit jeweils fünf Messwerten pro Messzeitpunkt dargestellt (n=10). Die Ergebnisse der ohne TTNPB inkubierten Zellen sind als Mittelwert \pm SD aus den o. g. zwei getrennten Experimenten mit jeweils drei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet (n=6). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten der Zellzahl bei unterschiedlicher Inkubationsdauer mit TTNPB zum gleichen Zeitpunkt.

3.2.6 Proliferation der ML-1-Zellen unter Einfluss von bTSH

Die Zellzahl der ML-1-Zellen änderte sich im Versuchszeitraum sowohl nach Inkubation mit bTSH als auch nach Inkubation in TSH-freiem Medium nicht signifikant (ohne Abbildung).

In Abbildung 8 ist die Zellproliferation der ML-1-Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration des bTSH dargestellt. Nach 24 h konnte keine signifikante Änderung der Zellzahl in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration nachgewiesen werden. Obwohl nach 48 h für die mit 0,05 IU/l bTSH inkubierten Proben eine signifikant höhere Zellzahl gemessen werden konnte, konnte dies nicht für die höheren TSH-Konzentrationen (1,0 IU/l und 0,2 IU/l) verifiziert werden. Nach 72 h konnten, wie schon nach 24 h, keine konzentrationsabhängigen Unterschiede der Zellzahl im signifikanten Bereich festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte für ML-1-Zellen sowohl ein von der TSH-Konzentration als auch von der Zeit unabhängiges Wachstum verifiziert werden.

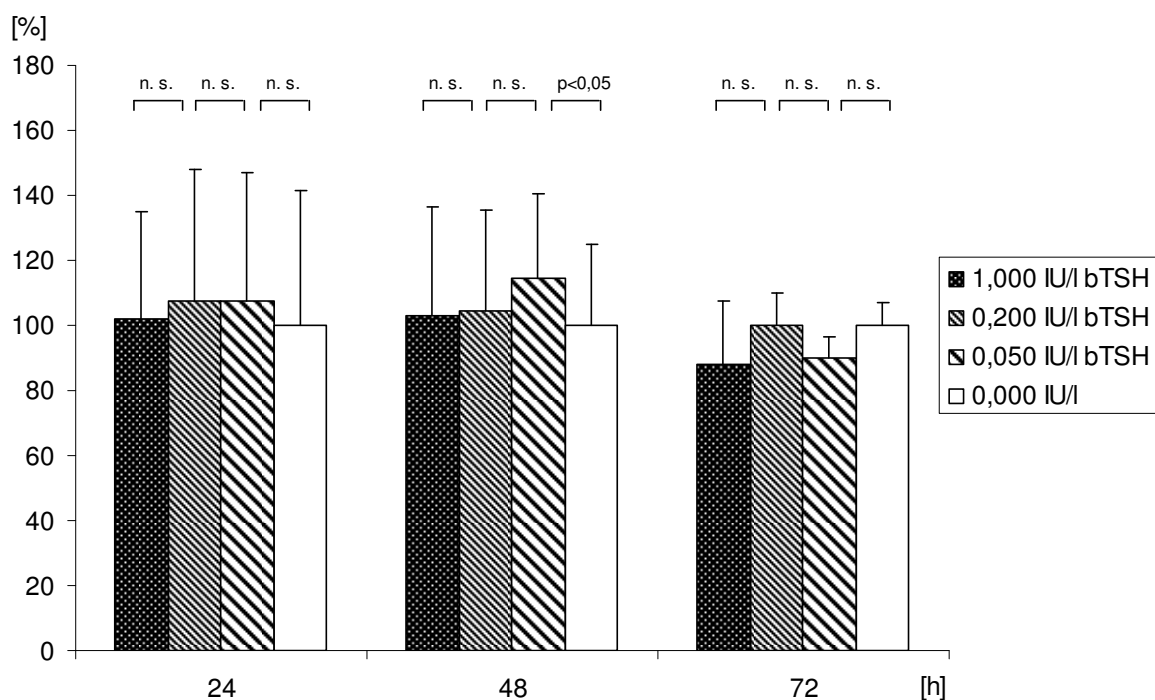


Abb. 8: Zellzahl der ML-1-Zellkulturen nach Inkubation mit bovinem TSH (bTSH) und ^{131}I . Die Zellzahl ist auf den Wert der unbehandelten Zellen (ohne TSH) zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus vier getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=8$). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten der Zellzahl bei unterschiedlichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

3.2.7 Proliferation der ML-1-Zellen unter Einfluss von rhTSH

Nach Inkubation mit rhTSH wuchsen die ML-1-Zellen über den Versuchszeitraum von 48 h. Eine Konzentrationsabhängigkeit konnte nicht gemessen werden (ohne Abbildung).

3.2.8 TTNPB-abhängige Proliferation der ML-1-Zellen

Nach Inkubation der ML-1-Zellen sowohl mit TTNPB als auch mit dem Lösungsmittel DMSO ohne TTNPB konnte zu allen drei Messzeitpunkten nur eine geringe Zellzahl nachgewiesen werden. Diese lag mit 9000 bzw. 21600 Zellen nach 72 h mehr als 160- bzw. 65-fach niedriger, als die mittlere Zellzahl der mit 1 IU/l bTSH inkubierten Zellen aus den Versuchen zum TSH-abhängigen ¹³¹I-Uptake (ohne Abbildung).

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Zellkulturflaschen konnte eine große Zahl vom Flaschenboden abgelöster Zellen gesehen werden. Die ML-1-Zellen lösten sich nach Inkubation mit in DMSO gelöstem TTNPB bzw. mit TTNPB freiem Lösungsmittel vom Zellkulturflaschenboden ab. Somit konnte mit unserer Methode keine Aussage mehr über die Zellproliferation getroffen werden. Auch weitere Versuche bestätigten, dass die Zugabe von 2 % DMSO in das Zellkulturmedium der ML-1-Zellen ein Ablösen der Zellen bewirkt (ohne Abbildung).

3.3 ¹³¹I-Uptake

Bei der Auswertung der Uptake-Werte wurden die Mittelwerte der Ergebnisse der Einzelversuche verwendet. Die Eigenschaften von FRTL-5-Zellen können sich nach längerer Kultivierung verändern (Kimura et al., 2001). Deshalb wurden die Ergebnisse der mit rhTSH und TSH TR1401 behandelten Zellen gemeinsam mit denen der zeitgleich abgelaufenen Experimente mit bTSH betrachtet. Beim direkten Vergleich der Ergebnisse mit TSH TR1401 und rhTSH wurden diese auf die parallel erfassten Ergebnisse mit bTSH normiert.

3.3.1 ¹³¹I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von bTSH

Die FRTL-5-Zellen wurden mit bTSH in verschiedenen Konzentrationen (0,2 IU/l, 0,05 IU/l, 0,01 IU/l) inkubiert. Es sollte untersucht werden, ob sich der ¹³¹I-Uptake in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration ändert.

Der zeitliche Verlauf des ¹³¹I-Uptake ist in Abbildung 9 dargestellt. Nach 48 h stieg der Uptake im Vergleich zur Messung nach 24 h bei jeder TSH-Konzentration an, jedoch nicht im signifikanten Bereich. Ein signifikanter Anstieg des ¹³¹I-Uptake der Zellkulturen im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt konnte erst nach 72 h für alle TSH-Konzentrationen gemessen werden ($p < 0,05$). Der Uptake der mit 0,2 IU/l bTSH inkubierten Zellen stieg um das 1,5-fache von 1,8 % auf 2,7 % an.

Die Uptake-Werte der unbehandelten Zellen änderten sich im Versuchszeitraum nicht signifikant.

Der ^{131}I -Uptake stieg bei den FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit den von uns gewählten bTSH-Konzentrationen über einen Zeitraum von 72 h signifikant an.

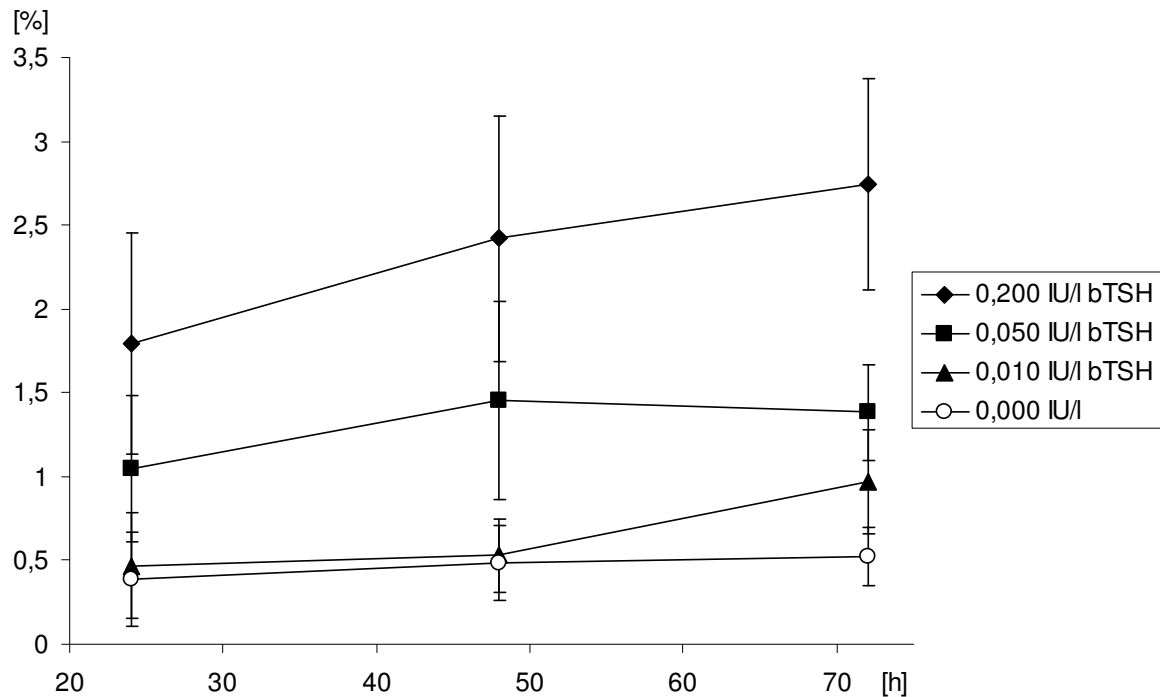


Abb. 9: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit bovinem TSH (bTSH) und ^{131}I . Alle Werte sind als Prozent der Aktivität von 10^6 Zellen geteilt durch die Aktivitätsmenge pro ml der jeweiligen Zellkulturflasche dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=10$). Die Signifikanzen können dem Text entnommen werden.

In Abbildung 10 ist der Uptake der FRTL-5-Zellen in Abhängigkeit von der bTSH-Konzentration abgebildet. Zu allen drei Messzeitpunkten lag der ^{131}I -Uptake der Proben, die mit 0,2 IU/l und 0,05 IU/l bTSH inkubiert wurden jeweils signifikant höher als der Uptake der mit geringeren Dosen bTSH inkubierten und unbehandelten Proben ($p<0,05$ und $p<0,01$).

Wenngleich sich der Uptake der mit der niedrigsten bTSH-Konzentration (0,01 IU/l) inkubierten Zellen nach 24 h und 48 h nicht von dem der unbehandelten Zellen unterschied, lag er nach 72 h um 86 % höher ($p<0,05$).

Über einen Zeitraum von 72 h war die ^{131}I -Aufnahme der FRTL-5-Zellen somit abhängig von der Konzentration des bTSH im Medium. Selbst niedrige TSH-Dosen (0,01 IU/l) führten nach längerer Inkubation zu signifikanten Uptake-Änderungen.

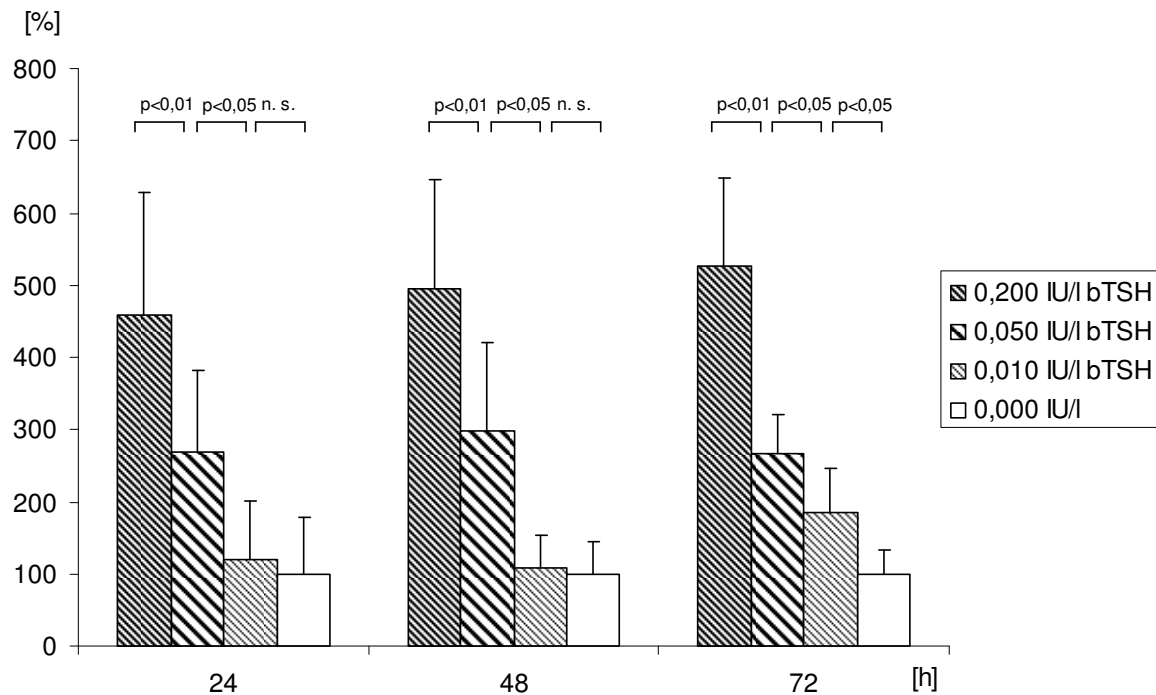


Abb. 10: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit bovinem TSH (bTSH) und ¹³¹I. Die Uptake-Werte sind auf den Wert der unbehandelten Zellen (ohne TSH) zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet (n=10). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei unterschiedlichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

3.3.2 ¹³¹I-Uptake von FRTL-5-Zellen unter Einfluss von rhTSH

Neben bTSH, das standardmäßig für die Kultivierung von FRTL-5-Zellen verwendet wurde, untersuchten wir die Wirkung von rhTSH auf den ¹³¹I-Uptake. Wir wählten analoge TSH-Konzentrationen (0,2 IU/l, 0,05 IU/l und 0,01 IU/l) wie für die Experimente mit bTSH.

Die mit rhTSH inkubierten FRTL-5-Zellen nahmen über den gesamten Versuchsverlauf ¹³¹I auf. Bei jeder der von uns gewählten rhTSH-Konzentrationen lagen die Uptake-Werte nach 72 h 1,3- bis 2,1-fach höher als beim ersten Messzeitpunkt nach 24 h ($p < 0,01$) (ohne Abbildung).

Der konzentrationsabhängige Uptake ist in Abbildung 11 dargestellt. Nach 24 h war der Uptake der Proben, die mit rhTSH in der höchsten Konzentration (0,2 IU/l) inkubiert wurden, 1,7- bis 3,8-fach höher als der Uptake der mit niedrigeren Dosen inkubierten und unbehandelten Zellen ($p < 0,01$). Auch der Uptake der mit 0,05 IU/l rhTSH inkubierten Zellen war signifikant höher als der Uptake der unbehandelten Zellen ($p < 0,05$). Da die Uptake-Werte über den Versuchsverlauf anstiegen (s. o.), war der Uptake der mit 0,05 IU/l inkubierten Zellen nach 48 h signifikant höher als der Uptake der Zellen, die mit 0,01 IU/l rhTSH inkubiert wurden ($p < 0,05$). Auch die

^{131}I -Aufnahme der mit 0,2 IU/l inkubierten Proben war signifikant höher als die der mit niedrigeren Dosen inkubierten und unbehandelten Proben ($p < 0,01$). Nach 72 h lag der Uptake der mit 0,2 IU/l und 0,05 IU/l rhTSH inkubierten Zellen jeweils 1,5- bis 3,2-fach höher als der Uptake der mit niedrigeren Dosen inkubierten und unbehandelten Zellen ($p < 0,01$).

Der ^{131}I -Uptake der FRTL-5-Zellen erwies sich nach Inkubation mit hohen bzw. mittleren Dosen rhTSH (0,2 IU/l und 0,05 IU/l) als konzentrationsabhängig. Niedrigere rhTSH-Konzentrationen im Medium (0,01 IU/l) verursachten zu keinem der von uns gewählten Messzeitpunkte eine signifikante Veränderung des Uptake im Vergleich zum Uptake der unbehandelten Zellen.

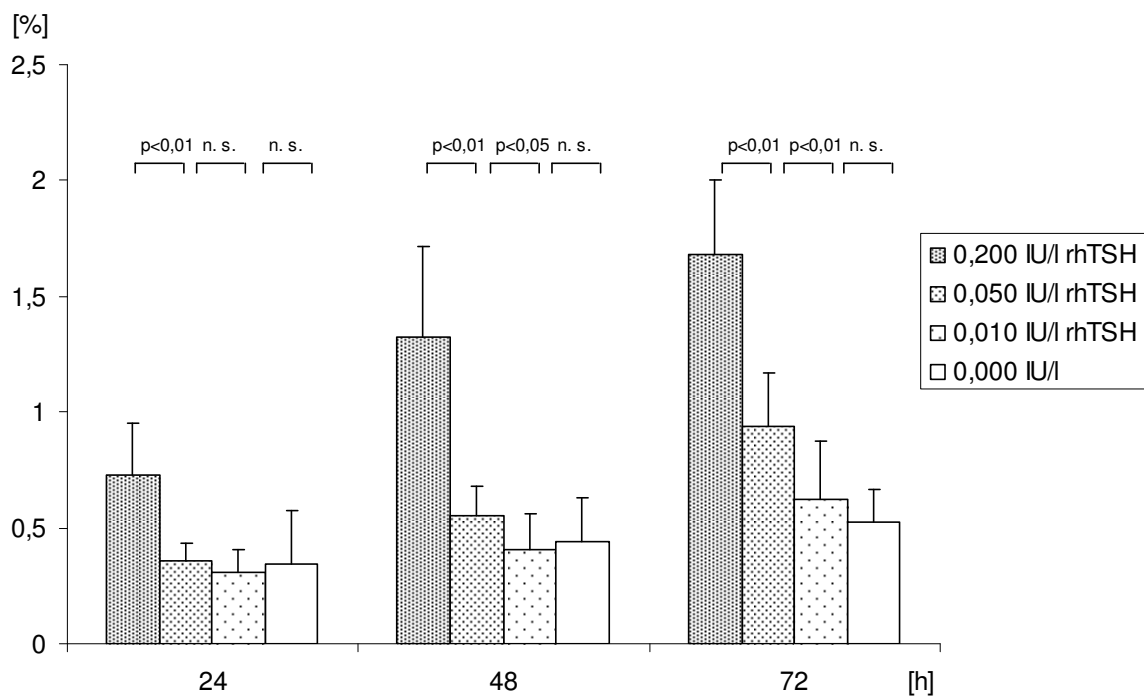


Abb. 11: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit rekombinantem humanem TSH (rhTSH) und ^{131}I . Alle Werte sind als Prozent der Aktivität von 10^6 Zellen geteilt durch die Aktivitätsmenge pro ml der jeweiligen Zellkulturflasche dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=10$). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei unterschiedlichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

In Abbildung 12 sind die Uptake-Werte der mit rhTSH und bTSH inkubierten Zellkulturen im Vergleich dargestellt. Zu jedem Messzeitpunkt lag der Uptake der mit bTSH in hohen und mittleren Konzentrationen (0,2 IU/l und 0,05 IU/l) inkubierten Zellen 1,5- bis 2,9-fach höher als der Uptake der mit rhTSH inkubierten Zellen. Dieses Ergebnis war signifikant ($p < 0,01$). Obwohl sich die Uptake-Werte bei der niedrigsten TSH-Konzentration (0,01 IU/l) nach 24 und 48 h nicht

signifikant unterschieden, konnte nach 72 h ein signifikant höherer Uptake bei den mit bTSH inkubierten Proben gemessen werden ($p < 0,05$).

BTSH hatte bei FRTL-5-Zellen im Zeitraum 72 h einen stärkeren Effekt auf den ^{131}I -Uptake als rhTSH. Bei niedrigen Konzentrationen (0,01 IU/l) konnte dieser erst zu einem späteren Zeitpunkt und weniger deutlich gemessen werden.

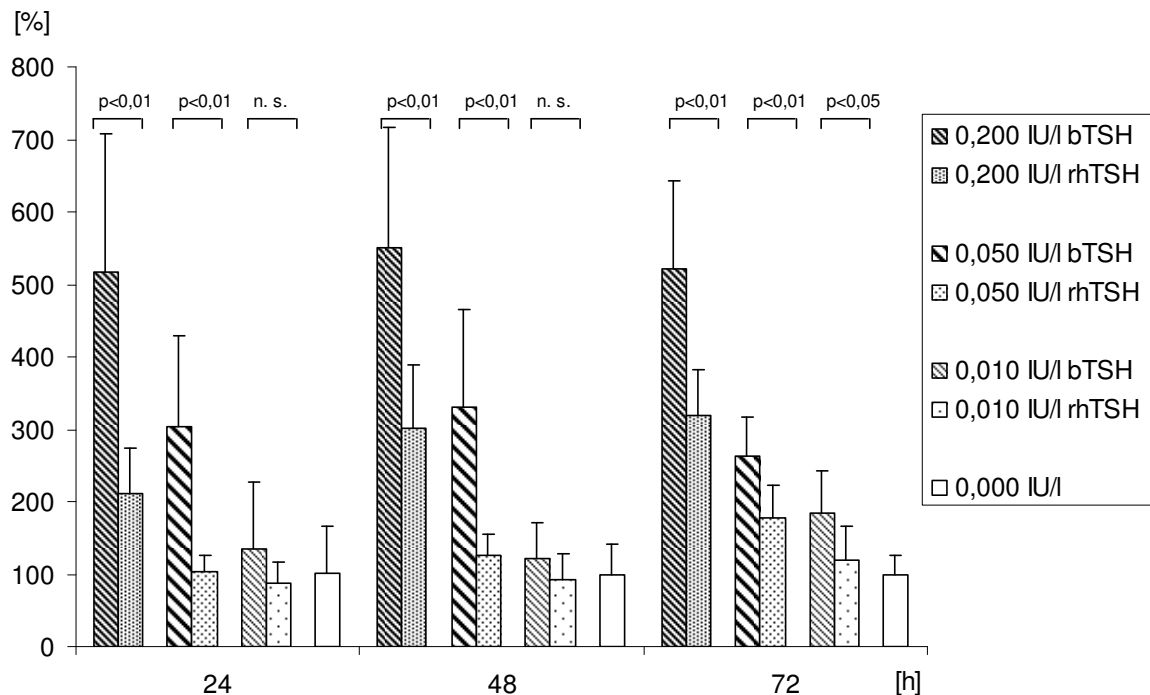


Abb. 12: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit bovinem TSH (bTSH) bzw. rekombinantem humanem (rhTSH) und ^{131}I im Vergleich. Die Uptake-Werte sind auf den Wert der unbehandelten Zellen (ohne TSH) zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=10$). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei gleichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

3.3.3 ^{131}I -Uptake von FRTL-5-Zellen unter Einfluss von TSH TR1401

Die FRTL-5-Zellen wurden mit TSH TR1401, einem synthetischen TSH-Analogen, in den Konzentrationen 0,2 IU/l, 0,05 IU/l, 0,01 IU/l und 0,002 IU/l inkubiert.

Ein im zeitlichen Verlauf ansteigender Uptake konnte für die mit 0,2 IU/l und 0,01 IU/l TSH TR1401 inkubierten Proben gemessen werden. Die Uptake-Werte stiegen von 2,5 % bzw. 3,6 % nach 24 h auf 3,9 % bzw. 4,9 % nach 72 h an ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$). Der Uptake der mit 0,05 IU/l und mit 0,002 IU/l TSH TR1401 inkubierten Proben veränderte sich nicht signifikant (ohne Abbildung).

Die von der Konzentration des TSH TR1401 abhängige ^{131}I -Aufnahme ist in Abbildung 13 dargestellt. Nach 24 h lagen die Uptake-Werte der mit 0,05 IU/l inkubierten Zellen signifikant über dem Uptake der mit 0,2 IU/l und 0,002 IU/l inkubierten Zellen ($p < 0,01$ und $p < 0,05$). Die mit 0,01 IU/l TSH TR1401 inkubierten

Proben nahmen signifikant mehr ^{131}I auf als die mit 0,2 IU/l inkubierten Zellen ($p < 0,01$).

Der Uptake der mit 0,05 IU/l TSH TR1401 inkubierten Zellen lag nach 48 h signifikant über dem Uptake der mit 0,2 IU/l und 0,002 IU/l inkubierten Zellkulturen ($p < 0,05$). Bei Inkubation mit 0,01 IU/l fand sich ein signifikanter Unterschied lediglich im Vergleich zu den mit 0,002 IU/l inkubierten Proben ($p < 0,05$).

Nach 72 h lag die ^{131}I -Aufnahme der mit 0,05 IU/l und 0,01 IU/l TSH TR 1401 inkubierten Zellen um 1,4 % bzw. 0,9% über der der mit 0,2 IU/l inkubierten Proben ($p < 0,05$ und $p < 0,01$).

Der Uptake der mit TSH TR1401 inkubierten Zellen war zu jedem Zeitpunkt höher als der Uptake der unbehandelten Zellen ($p < 0,01$).

Die höchsten Uptake-Werte nach Inkubation mit TSH TR1401 konnten bei den mittleren Konzentrationen (0,05 IU/l und 0,01 IU/l) gemessen werden. Diese waren signifikant höher als die Uptake-Werte bei der höchsten Dosis (0,2 IU/l) TSH TR1401.

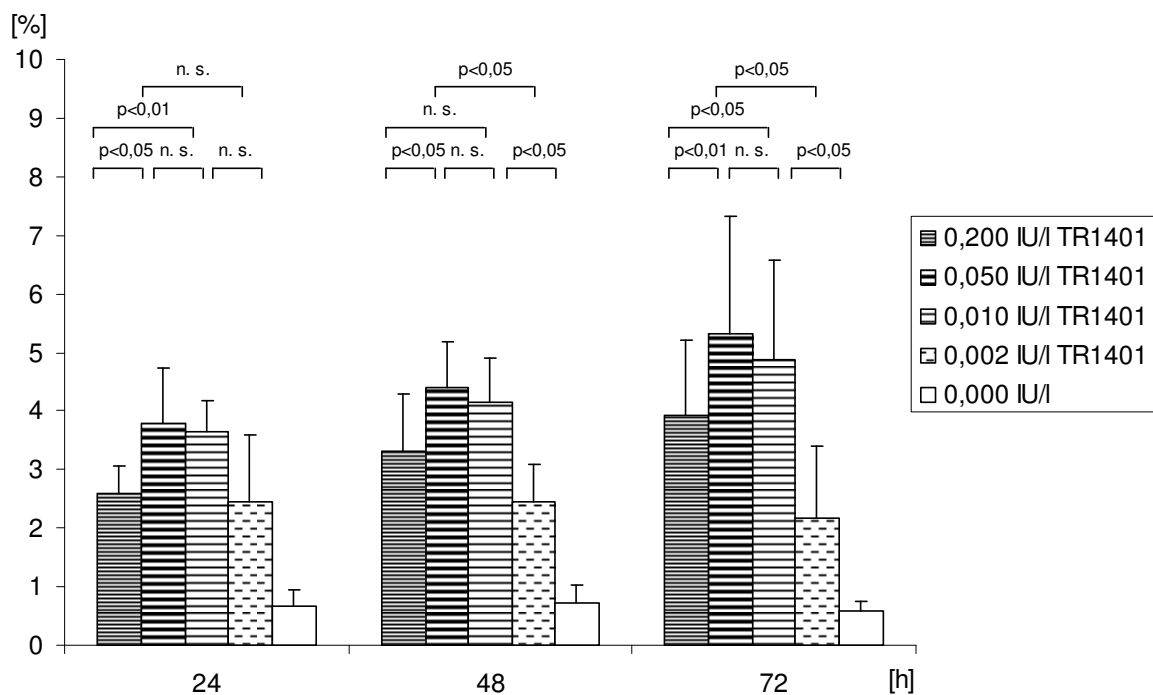


Abb. 13: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit TSH TR1401 (TR1401) und ^{131}I . Alle Werte sind als Prozent der Aktivität von 10^6 Zellen geteilt durch die Aktivitätsmenge pro ml der jeweiligen Zellkulturflasche dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=10$). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei unterschiedlichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

In Abbildung 14 ist der ^{131}I -Uptake der FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit TSH TR1401 und bTSH im Vergleich dargestellt. Nach 24 h und 48 h war der Uptake

der mit 0,2 IU/l bTSH inkubierten Zellen um das 1,4- bzw. 1,6-fache höher als der Uptake der mit 0,2 IU/l TSH TR1401 inkubierten Zellen. Dieses Ergebnis war signifikant ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$). Nach 72 h unterschieden sich die Uptake-Werte der mit 0,2 IU/l bTSH und TSH TR1401 inkubierten Zellen nicht signifikant voneinander.

Die Uptake-Werte der mit bTSH und TSH TR1401 in der Konzentration 0,05 IU/l inkubierten Zellen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt.

Der ^{131}I -Uptake der mit 0,01 IU/l TSH TR1401 inkubierten Zellen war zu jedem Messzeitpunkt signifikant höher als der Uptake der mit 0,01 IU/l bTSH inkubierten Zellen (2,7-fach nach 72 h) ($p < 0,01$).

Die Uptake-Werte der mit 0,05 IU/l TSH TR1401 und 0,2 IU/l bTSH inkubierten Zellen unterschieden sich zu keinem Messzeitpunkt voneinander. Nach 24 h und 72 h konnten keine signifikanten Uptake-Unterschiede zwischen den mit 0,01 IU/l TSH TR1401 und 0,2 IU/l bTSH inkubierten Proben gemessen werden.

Hohe Konzentrationen von TSH TR1401 (0,2 IU/l) bewirkten einen niedrigeren ^{131}I -Uptake als die analoge Dosis bTSH. Im Gegensatz dazu stimulierten mittlere bzw. niedrige Konzentrationen (0,05 IU/l und 0,01 IU/l) von TSH TR1401 die ^{131}I -Aufnahme stärker als bTSH in gleicher Konzentration.

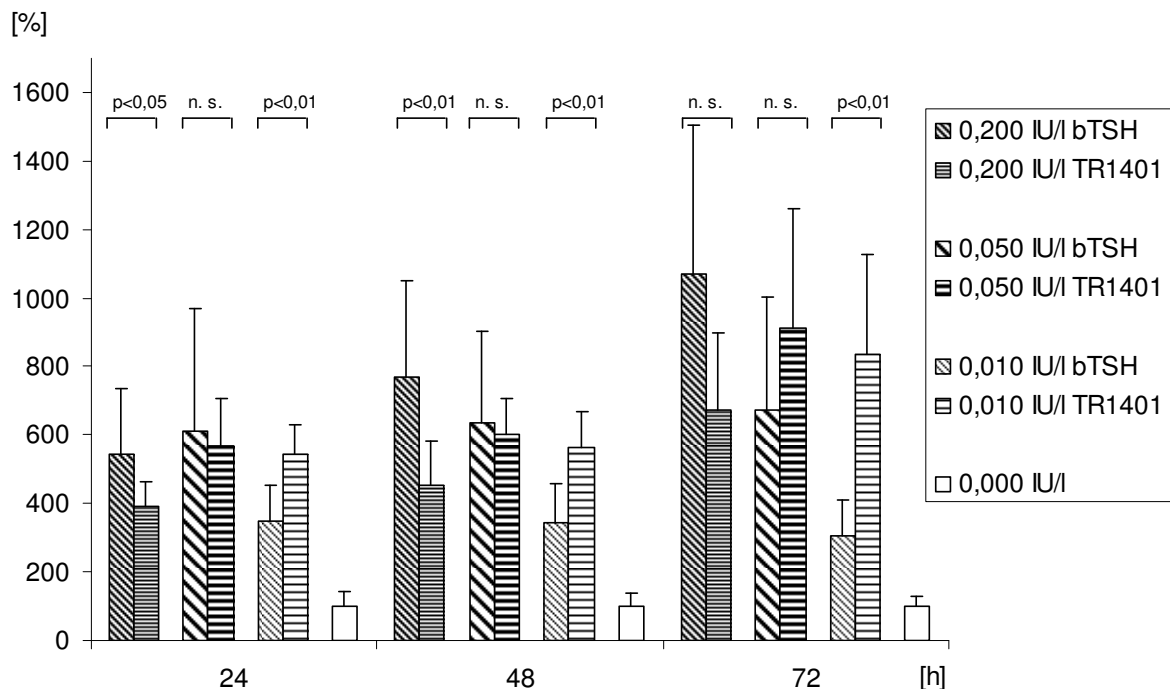


Abb. 14: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit TSH TR1401 (TR1401) bzw. bovinem TSH (bTSH) und ^{131}I im Vergleich. Die Uptake-Werte sind auf den Wert der unbehandelten Zellen (ohne TSH) zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=10$). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei gleichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

3.3.4 ¹³¹I-Uptake der FRTL-5-Zellen unter Einfluss von rhTSH und TSH TR1401 im Vergleich

Der Vergleich der Uptake-Werte der FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit rhTSH und TSH TR1401 ist in Abbildung 15 dargestellt. Der Uptake der FRTL-5-Zellen war nach Inkubation mit TSH TR1401 in den Konzentrationen 0,05 IU/l und 0,01 IU/l zu jedem Zeitpunkt signifikant höher als der Uptake der Zellen die mit rhTSH inkubiert wurden ($p < 0,05$ und $p < 0,01$). Nach 72 h war der ¹³¹I-Uptake der mit 0,01 IU/l TSH TR1401 inkubierten Proben 4,2-fach höher als der Uptake der mit der analogen Dosis rhTSH inkubierten Proben.

Obwohl der Uptake der mit TSH TR1401 in der Konzentration 0,2 IU/l inkubierten Zellen nach 24 h signifikant höher war als bei den Proben, die mit rhTSH inkubiert wurden, unterschieden sich die Uptake-Werte nach 48 h und nach 72 h nicht voneinander.

Gerade niedrigere Konzentrationen von TSH TR1401 förderten die ¹³¹I-Aufnahme der FRTL-5-Zellen im von uns gewählten Untersuchungszeitraum signifikant stärker als rhTSH.

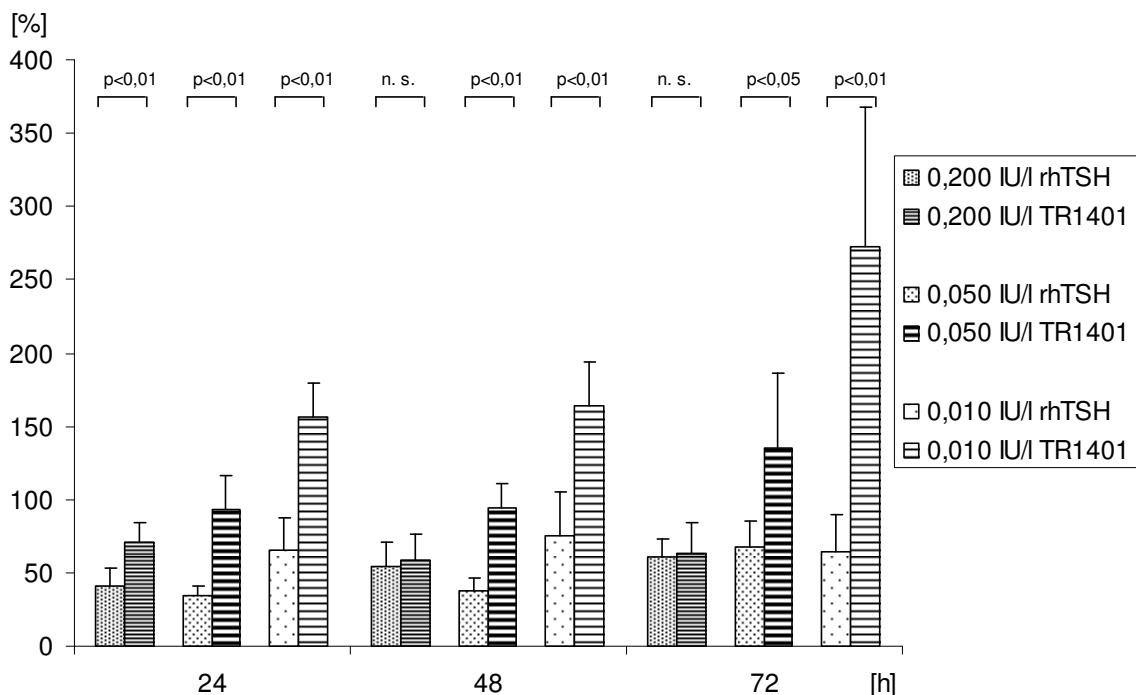


Abb. 15: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach Inkubation mit rekombinantem humanem TSH (rhTSH) bzw. TSH TR1401 (TR1401) und ¹³¹I im Vergleich. Die Uptake-Werte sind normiert auf die Werte der mit bovinem TSH (bTSH) in analoger Konzentration inkubierten Zellen zum jeweiligen Messzeitpunkt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SD aus fünf getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet ($n=10$). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei gleichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

3.3.5 TTNPB-abhängiger ¹³¹I-Uptake der FRTL-5-Zellen

Die FRTL-5-Zellen wurden in einer Versuchsreihe von n=10 Kulturflaschen mit TTNPB inkubiert. Der ¹³¹I-Uptake wurde analog zu den Versuchen zum TSH-abhängigen Uptake bestimmt. Die mehrfach mit TTNPB inkubierten Proben wurden 48 h länger mit TTNPB inkubiert als die einfach mit TTNPB inkubierten Proben.

In Abbildung 16 ist die ¹³¹I-Aufnahme der FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit TTNPB dargestellt. In der Graphik ist beschrieben, dass nach 24 h und 48 h der ¹³¹I-Uptake der einfach und mehrfach mit TTNPB inkubierten Zellen zwischen 46 % und 74 % niedriger lag als der Uptake der unbehandelten Zellen ($p < 0,05$). Die ¹³¹I-Aufnahme der mehrfach mit TTNPB inkubierten Zellen lag signifikant unter der der einfach mit TTNPB inkubierten Zellen ($p < 0,01$ und $p < 0,05$).

Nach 72 h jedoch waren nur die Uptake-Werte der einfach mit TTNPB inkubierten Zellen signifikant niedriger als die der unbehandelten Zellen ($p < 0,05$). Weiterhin konnte zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied zwischen den mit dem Retinoid inkubierten Proben nachgewiesen werden.

TTNPB bewirkte bei FRTL-5-Zellen – in dem von uns gewählten Versuchszeitraum und unter den gewählten Bedingungen – eine signifikante Abnahme des ¹³¹I-Uptake.

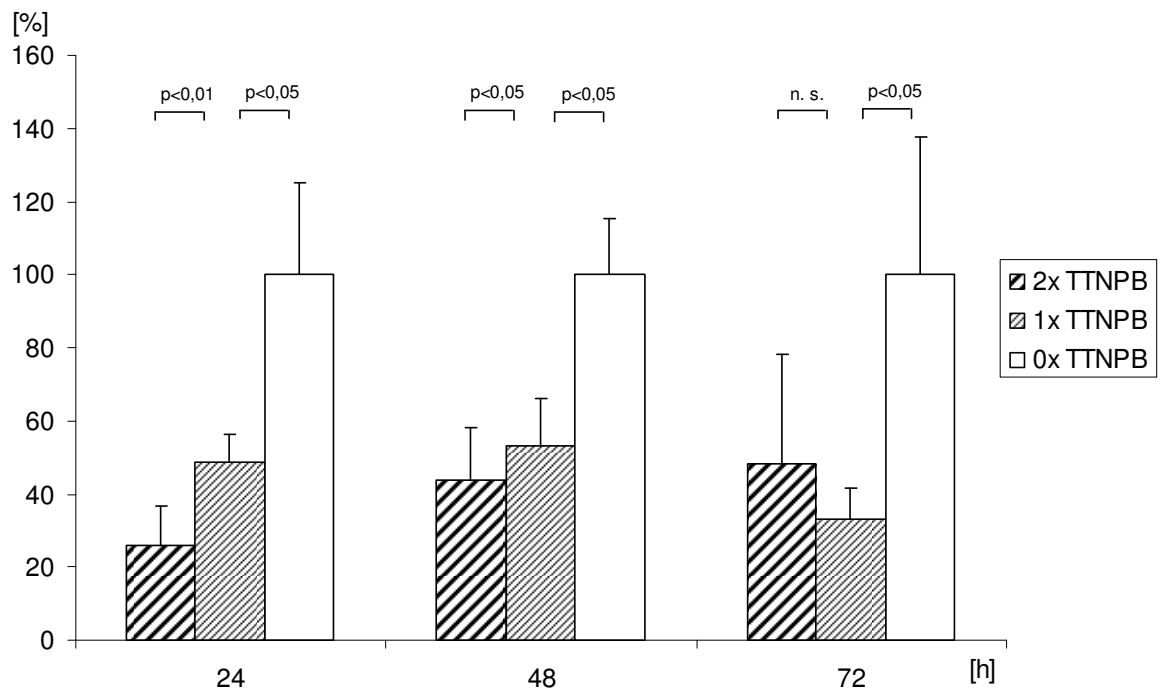


Abb. 16: Uptake der FRTL-5-Zellkulturen nach einfacher (1xTTNPB) und mehrfacher (2xTTNPB) Inkubation mit TTNPB und ¹³¹I. Die Uptake-Werte sind auf den Wert der unbehandelten Zellen (ohne TTNPB) (0xTTNPB) zum jeweiligen Messzeitpunkt normiert. Die Ergebnisse der mit TTNPB inkubierten Zellen sind als Mittelwert \pm SD aus zwei getrennten Experimenten mit jeweils fünf Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet (n=10). Die Ergebnisse der ohne TTNPB inkubierten Zellen sind als Mittelwert \pm SD aus den o. g. zwei getrennten Experimenten mit jeweils drei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet (n=6). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei unterschiedlicher Inkubationsdauer zum gleichen Zeitpunkt.

3.3.6 ¹³¹I-Uptake der ML-1-Zellen unter Einfluss von bTSH

In-vitro-Versuche zum Radioiod-Uptake von Schilddrüsenkarzinomzelllinien verursachten in der Vergangenheit häufig Probleme, da keine ¹³¹I-Speicherung nachgewiesen werden konnte.

Obwohl der ¹³¹I-Uptake der unbehandelten Zellen nach 48 h signifikant höher lag als nach 24 h, konnte dieses Ergebnis nach 72 h nicht verifiziert werden (p<0,05). Die ¹³¹I-Aufnahme der mit bTSH behandelten Proben änderte sich im Versuchsverlauf nicht signifikant.

Im Vergleich zu den FRTL-5-Zellen konnte nach 72 h bei 0,2 IU/l bTSH ein mehr als 60-fach niedrigerer Uptake festgestellt werden (p<0,01) (ohne Abbildung).

In Abbildung 17 ist der konzentrationsabhängige Uptake der ML-1-Zellen nach Inkubation mit bTSH in den Konzentrationen 1,0 IU/l, 0,2 IU/l und 0,05 IU/l dargestellt. Wir konnten zu keinem Zeitpunkt eine Beeinflussung des Uptake durch bTSH beobachten.

Im Untersuchungszeitraum konnte bei den ML-1-Zellen ein von der bTSH-Konzentration unabhängiger ¹³¹I-Uptake gemessen werden.

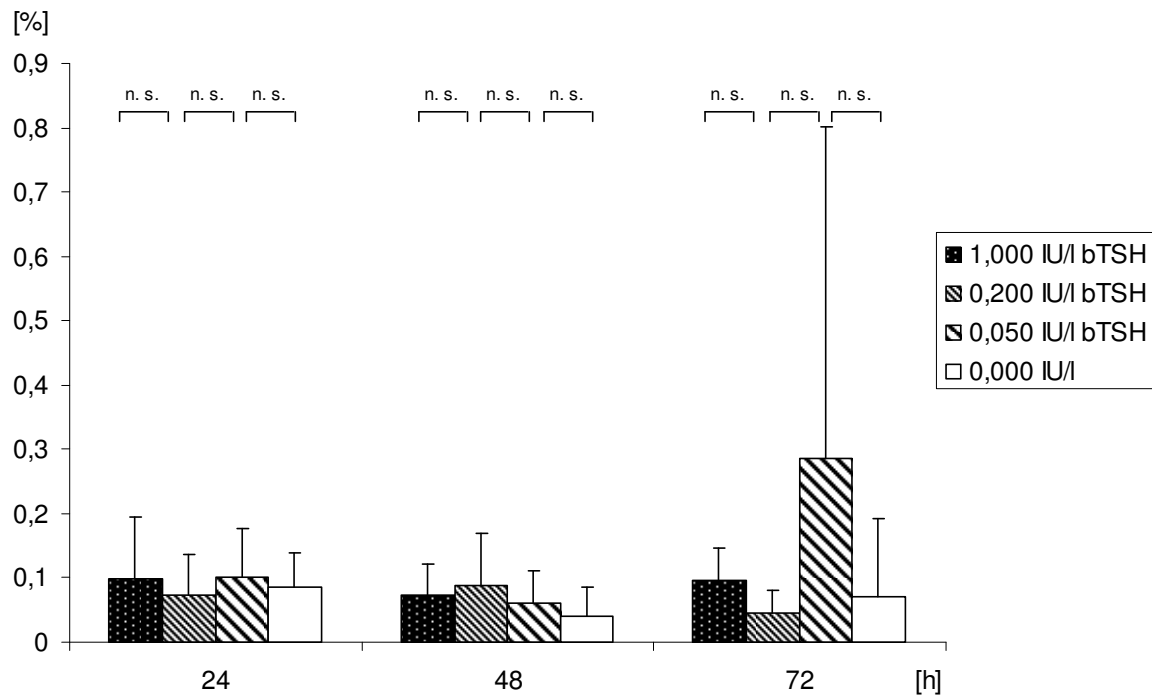


Abb. 17: Uptake der ML-1-Zellkulturen nach Inkubation mit bovinem TSH (bTSH) und ¹³¹I. Alle Werte sind als Prozent der Aktivität von 10⁶ Zellen geteilt durch die Aktivitätsmenge pro ml der jeweiligen Zellkulturflasche dargestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert ± SD aus vier getrennten Experimenten mit jeweils zwei Messwerten pro Messzeitpunkt abgebildet (n=8). Wiedergegeben sind die Signifikanzen zwischen den Werten des Uptake bei unterschiedlichen TSH-Konzentrationen zum gleichen Zeitpunkt.

3.3.7 ¹³¹I-Uptake der ML-1-Zellen unter Einfluss von rhTSH

Die Experimente zur Untersuchung des ¹³¹I-Uptake mit rhTSH ergaben ebenfalls keine TSH-Abhängigkeit (ohne Abbildung). Die Uptake-Werte waren bei über 75 % der Proben niedriger als der Leerwert. Die anderen Ergebnisse lagen niedriger als die der mit bTSH inkubierten ML-1-Zellen. Da es durch den niedrigen Uptake nur wenige verwertbare Resultate gab, erschien eine statistische Auswertung nicht sinnvoll.

3.3.8 TTNPB abhängiger ¹³¹I-Uptake der ML-1-Zellen

Wie bereits unter 3.2.8 beschrieben, lösten sich die ML-1-Zellen vom Boden der Kulturflaschen ab. Da sich eine Ursache hierfür aus unserer Methode nicht sicher begründen ließ, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob die Zellen vital waren oder abgetötet wurden. Da der Uptake der ML-1-Zellen ohnehin schon sehr niedrig war, erschien eine statistische Auswertung von Uptake-Änderungen nicht sinnvoll.

4. Diskussion

Diese Arbeit wurde durchgeführt, um einen Beitrag zur Verbesserung der Effektivität der RIT von Schilddrüsenerkrankungen zu leisten. In unseren Experimenten sollte der Einfluss unterschiedlicher TSH-Analoga bzw. eines Retinoids auf die Effektivität der RIT untersucht werden. Wesentlich für solche Untersuchungen in vitro sind das verwendete System und die jeweilige Methodik, die in den folgenden Abschnitten kritisch betrachtet werden.

4.1 Zellkulturen

Um Experimente zum Radioiod-Uptake bzw. zur RIT durchführen zu können, kommen primär Zellen, die den NIS exprimieren und von daher Iodisotope aufnehmen, als Zelllinie in Frage. Unsere Wahl fiel hierbei auf die Zelllinien FRTL-5 – die bereits an der Universität zu Lübeck etabliert war – und ML-1.

Wie bereits unter 1.5.1 beschrieben ist eine wesentliche, gut dokumentierte Zelllinie die der FRTL-5. Die FRTL-5-Zellen wurden in der Vergangenheit häufig zur Erforschung des Schilddrüsenstoffwechsels eingesetzt (Grollman et al., 1986; Weiss et al., 1984 b; Meller et al., 2008). In unseren Versuchen untersuchten wir den ^{131}I -Uptake sowie das Zellwachstum in Abhängigkeit von TSH in verschiedenen Konzentrationen. Wir kamen zu dem Ergebnis, dass der ^{131}I -Uptake und die Zellproliferation von der Höhe der applizierten TSH-Dosis, der Inkubationszeit und dem jeweiligen TSH-Analogen abhängen.

Besondere Relevanz hat eine Erhöhung des Radioiod-Uptake bei der Therapie von Schilddrüsenkarzinomen. Hier sind allerdings nur wenige maligne transformierte Zelllinien mit erhaltenem Iodstoffwechsel aus der Literatur bekannt. Wir wählten die Zelllinie ML-1, eine aus einem follikulären Schilddrüsenkarzinom isolierte Zelllinie, die als iodaufnehmend beschrieben wurde (Schönberger et al., 2000). Weiterhin zeigten Prante et al., dass ML-1-Zellen sowohl den TSH-Rezeptor exprimieren, als auch die Stimulation mit rhTSH zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Prante et al., 2009). Diese Voraussetzungen sind essentiell für die Untersuchung des TSH-abhängigen ^{131}I -Uptake und der Zellproliferation. Die ML-1-Zellen waren in der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin der Universität zu Lübeck bereits tiefgefroren bei -196 °C in flüssigem Stickstoff vorrätig. Weitere ML-1-Zellkulturen wurden freundlicherweise von Herrn PD Dr. med. Johann Schönberger (Klinik für

Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Regensburg) zur Verfügung gestellt bzw. wurden bei der DSMZ erworben.

4.2 Methodik

Bei der von uns gewählten Methode bestimmten wir den ^{131}I -Uptake der Schilddrüsen- und Schilddrüsenkarzinomzelllinie in Abhängigkeit von der Zellzahl zu drei vorher fest definierten und klinisch relevanten Messzeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h). Die Zellzahlbestimmung ist notwendig, da mit Hilfe dieser Information der gemessene Uptake auf eine Zellzahl normiert werden kann und so unter Ausblendung von Zellzahländerungen und -abweichungen die Uptake-Werte vergleichbar sind. Versuche zum ^{131}I -Uptake der ML-1-Zellen mit zu Versuchsbeginn festgelegter Zellzahl, gefolgt von Uptake-Messungen ohne begleitende Zellzahlbestimmung, wurden bereits beschrieben (Schönberger et al., 2000). Jedoch kann hierbei nicht unterschieden werden, ob ein im zeitlichen Verlauf gestiegener ^{131}I -Uptake allein von der Aufnahmefähigkeit der Zellen oder von einer gewachsenen Zellzahl abhängt. In anderen Studien wurde der Radioiod-Uptake bezogen auf den Proteingehalt der Zellkulturen bestimmt (Bläser et al., 2006). Dabei wurden Proteine in Zellysats photometrisch quantifiziert (Bradford, 1976). Da davon auszugehen ist, dass sich nicht alle Zellen im gleichen Abschnitt des Zellzyklus befanden, ist eine Variation des Proteingehalts der Zellen nicht auszuschließen. Dies könnte speziell der Fall sein, wenn man die Zellen pharmakologisch beeinflusst und mit therapeutisch wirksamen Substanzen (^{131}I) inkubiert. Deshalb gestaltet es sich schwierig die gemessene Proteinkonzentration einer Zellzahl gleichzusetzen und auf den Uptake zu beziehen (Urry, 2008). Ein wesentlicher Vorteil beider Methoden gegenüber der von uns gewählten Methode ist allerdings der deutlich verminderte Zeitaufwand.

Die Messzeitpunkte wurden bewusst über einen längeren Zeitraum gewählt, da die von ^{131}I ausgehende β^- -Strahlung (β^-) eine gewisse Zeit benötigt um ihren strahlenbiologischen Effekt auf die Zellen zu entfalten. Ein Nachteil wiederum bestand darin, dass durch die fixen Zeitpunkte nur ein steady-state des momentan in den Zellen akkumulierten ^{131}I bestimmt werden konnte. Eine Aussage über mögliche Uptake-Maxima zwischen den Messzeitpunkten und den ^{131}I -Efflux konnte nicht getroffen werden. Dies ist jedoch auch mit den potentiellen anderen Methoden, die bereits diskutiert wurden, nicht möglich.

Leider konnten mit unserer Methode keine Mechanismen auf molekularer Ebene untersucht werden. Für den Erfolg der RIT ist aber letztendlich der ^{131}I -Uptake entscheidend und weniger die molekularen Mechanismen.

Bei den ML-1- und FRTL-5-Zellen handelt es sich um kontinuierlich wachsende Zelllinien ohne Follikelbildung. Zwar wurde für FRTL-5-Zellen eine Iodorganifizierung nachgewiesen, jedoch konnte letztere und die anschließende Speicherung im Kolloid in vivo mit unserer Methode nicht bestimmt werden (Kogai et al., 2000).

Während des Waschvorganges mit PBS konnten vitale, jedoch vom Kulturflaschenboden abgelöste Zellen verloren gehen. Diese wurden dann bei der späteren Bestimmung der Zellzahl nicht mehr erfasst. Verblieben nach den beiden Waschvorgängen und nach dem Ablösen der Zellen mit Trypsin kleinere Mengen von ^{131}I -haltigem Medium zwischen den Zellen, so konnte es gerade bei niedrigen Uptake-Werten (ML-1-Zellen) zu erheblichen Schwankungen der Ergebnisse kommen. Diese Fehlerquelle besteht auch bei den oben beschriebenen Methoden, da hierbei ebenfalls das iodhaltige Kulturmedium durch Waschvorgänge von den Zellen separiert wird.

Für die Kultivierung der FRTL-5-Zelllinie und die Stimulation der ML-1-Zellen verwendeten wir bTSH. bTSH wird als Bestandteil von H6-Medium standardmäßig zur Inkubation von FRTL-5-Zellen eingesetzt. Jedoch ist bTSH nicht der physiologisch vorkommende Ligand am humanen TSH-Rezeptor. Dennoch ist die Stimulation der ML-1-Zellen hiermit sinnvoll. So konnte für bTSH eine höhere Affinität und eine höhere intrinsische Aktivität am humanen TSH-Rezeptor nachgewiesen werden (Mueller et al., 2009).

4.3 Zellproliferation bzw. Inkubation mit TSH

Die Wirkung von TSH auf das Wachstum der Zelllinien war unterschiedlich. Während die FRTL-5-Zellen eine deutlich von der TSH-Konzentration abhängige und kontinuierliche Proliferation zeigten, konnte für die ML-1-Zellen kein TSH-abhängiges Wachstum gemessen werden. Dieses Ergebnis könnte möglicherweise durch den unterschiedlichen Differenzierungsgrad der Zellen bedingt gewesen sein.

Bei der benignen Zelllinie FRTL-5 ist der mitogene Effekt von TSH bekannt. TSH potenziert die Stimulation der Zellproliferation und DNA-Replikation durch Insulin (in H6-Medium enthalten) und IGF-1 (Tramontano et al., 1986; Kimura et al.,

1999). In vivo bzw. klinisch äußert sich dies als Volumenzunahme z. B. im Sinne einer Struma, bei der hohe TSH-Werte zu einer Hypertrophie und Hyperplasie der Follikel epithelzellen führen (Heitz et al., 2004). Unter bTSH und rhTSH proliferierten die Zellen konzentrationsabhängig. bTSH stimulierte das Zellwachstum der FRTL-5-Zellen stärker als rhTSH. Ursächlich dafür könnte ebenfalls die unter 4.2 beschriebene höhere Affinität und intrinsische Aktivität des bTSH gewesen sein. Nach Inkubation mit TSH TR1401 wuchsen die FRTL-5-Zellen sehr schnell (siehe unter 3.2.3) Nach 24 h lag die Zellzahl bei über 8.000.000 Zellen und somit bis zu 62 % höher als die, der unbehandelten Zellen. Wir gehen davon aus, dass TSH TR1401 eine potente Stimulation der Zellproliferation bewirkt. Die Zellzahl der in TSH-freiem Medium inkubierten FRTL-5-Zellen („schlafende Zellen“) änderte sich im Versuchsverlauf nicht signifikant. Dies belegte die TSH-Abhängigkeit dieser Zelllinie.

Prante et al. konnten die Expression des TSH-Rezeptors sowie die konsekutive zelluläre cAMP-Erhöhung nach Behandlung mit rhTSH für ML-1-Zellen nachweisen (Prante et al., 2009). Dennoch konnte mit bTSH kein kontinuierliches und von der TSH-Konzentration abhängiges Zellwachstum gemessen werden. Da cAMP als second messenger auch die TSH-abhängige Zellproliferation der Thyreozyten vermittelt, scheinen Alterationen in der nachfolgenden Signalkaskade für die fehlende TSH-Sensibilität verantwortlich zu sein (Kimura et al., 2001). Weiterhin wiesen Prante et al. für die ML-1-Zellen Mutationen im K-ras-Onkogen nach (Prante et al., 2009). Das ras-Protein ist Teil der Signalkaskade des TSH-Rezeptors. Punktmutationen führen zu einer konstitutiven Aktivierung und somit zur Zellproliferation und Tumorentstehung unabhängig von einer Ligandenbindung (Riesco-Eizaguirre und Santisteban, 2007). Möglicherweise kann cAMP keine adäquate Aktivierung des mutierten ras-Proteins hervorrufen. Ferner wurde in Schilddrüsenkarzinomzellen eine verminderte TSH-Rezeptor-Expression nachgewiesen (Brabant et al., 1991; Ohta et al., 1991; Brönnegård et al., 1994). Ob die TSH-Rezeptor-Expression von ML-1-Zellen im Vergleich zu benignen Schilddrüsenzellen reduziert ist und damit potentiell für eine verminderte TSH-Sensibilität verantwortlich sein könnte, sollte in Folgestudien quantifiziert werden.

4.4 ¹³¹I-Uptake von Schilddrüsenkarzinomzellen

Der Goldstandard der Therapie von differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist die Thyroidektomie mit anschließender ablativer RIT (Schlumberger, 1998).

Problematisch für die Ablation des Karzinomgewebes gestaltet sich vor allem der im Vergleich zu gesundem Schilddrüsengewebe reduzierte ^{131}I -Uptake. Auch in unseren Experimenten konnten wir für die ML-1-Zellen einen deutlich niedrigeren ^{131}I -Uptake messen als bei den benignen FRTL-5-Zellen. Trotz TSH-Stimulation lag der Uptake im Bereich der unspezifischen ^{131}I -Aufnahme der FRTL-5-Zellen bzw. nur geringfügig (0,01 % bis 0,04 %) darüber. Außerdem lag der Uptake im Mittel nur wenig über dem unspezifischen Uptake der ML-1-Zellen (4- bis 10-fach), war aber auch in vielen Proben gar nicht nachweisbar (Meller et al., 2006). Insofern scheint es ein System zu sein, dass sich wenig für TSH-Stimulationsversuche eignet. Im Vergleich dazu lag der ^{131}I -Uptake der FRTL-5-Zellen bei der höchsten bTSH-Konzentration bis zu 135-fach über dem unspezifischen Uptake.

Gründe für den geringen ^{131}I -Uptake von Schilddrüsenkarzinomzellen sind bekannt und untersucht. Selbst Unterschiede im ^{131}I -Uptake zwischen Primärtumor und Metastasen sind bekannt (Park et al., 2000). Der verminderte ^{131}I -Uptake ist kennzeichnend für einen höhergradigen Verlust der Gewebedifferenzierung. Eine reduzierte NIS-Expression von Schilddrüsenkarzinomzellen konnte bereits nachgewiesen werden (Arturi et al., 1998; Lazar et al., 1999; Park et al., 2000; Smith et al., 2009). Zusätzlich exprimieren Schilddrüsenkarzinome weniger TSH-Rezeptoren bzw. Mutationen senken die TSH-Empfindlichkeit (Brabant et al., 1991; Ohta et al., 1991; Brönnegård et al., 1994; Russo et al., 1995). Außerdem können Mutationen in Proteinen der Signalkaskaden die TSH-vermittelte NIS-Expression hemmen. Solche Alterationen können durchaus auch bei ML-1-Zellen vorliegen. Letztere wurden aus einem Lokalrezidiv eines follikulären Karzinoms bei einer fünfzigjährigen Patientin isoliert. Die Patientin verstarb trotz dreimaliger RIT (Schönberger et al., 2000). Dies könnte für eine schlechte ^{131}I -Speicherung bei der klinischen Therapie sprechen. Es wird vermutet, dass mit steigendem Grad der Entdifferenzierung der ^{18}F -FDG-Uptake ansteigt. Prante et al. konnten für ML-1-Zellen einen ^{18}F -FDG-Uptake nachweisen (Prante et al., 2009). Deren Ergebnisse und der von uns gemessene niedrige ^{131}I -Uptake entsprechen weitestgehend klinischen Daten. So konnten Grünwald et al. für eine Gruppe von 222 Patienten mit differenziertem Schilddrüsenkarzinom eine Sensitivität von 75 % für die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) nachweisen. Im Vergleich dazu lag die Sensitivität der Ganzkörperszintigraphie mit ^{131}I bei 50 % (Grünwald et al., 1999). Die RIT

verbessert signifikant die Prognose, selbst bei Karzinomen in prognostisch ungünstigeren Stadien (DeGroot et al., 1990; Samaan et al., 1992; Sawka et al., 2004). Aus klinischer Sicht behindert der niedrige Uptake die erfolgreiche ^{131}I -Ablation des Karzinomgewebes aber auch der Restschilddrüse, wenn auch aus anderer Ursache. Letzteres spielt eine Rolle für die Sensitivität nachfolgender ^{131}I -Ganzkörperszintigraphien und die Spezifität der Serum-Thyreoglobulin-Werte als Marker für eine noch bestehende oder rezidivierende Erkrankung (Schlumberger, 1998). Verburg et al. fanden heraus, dass das krankheitsfreie Überleben 10 Jahre nach erfolgreicher Ablation bei 87 % lag (vgl. erfolglose Ablation 49 %) (Verburg et al., 2005). Schilddrüsenkarzinomzellen, die keinen Radioiod-Uptake haben, sind szintigraphisch nicht mehr detektierbar und persistieren trotz RIT.

4.5 Der ^{131}I -Uptake in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration und vom TSH-Analogen

Für den Erfolg der RIT bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen werden hohe Serum-TSH-Spiegel angestrebt. In der Therapievorbereitung hat sich dabei neben der endogenen die exogene TSH-Stimulation etabliert (Dietlein et al., 2007 a). Wir inkubierten deshalb die FRTL-5- und ML-1-Zellen mit TSH-Analoga in verschiedenen Konzentrationen und bestimmten den ^{131}I -Uptake.

Der ^{131}I -Uptake der FRTL-5-Zellen erwies sich nach Inkubation mit bTSH und rhTSH in dem von uns gewählten Konzentrationsbereich als konzentrationsabhängig. Kogai et al. konnten für niedrige TSH-Konzentrationen eine konzentrationsabhängige NIS-mRNA-Expression nachweisen (Kogai et al., 1997). Hieraus kann man ableiten, dass unsere Beobachtungen auf einer TSH-assoziierten Translation von NIS beruhen.

RhTSH hatte dabei im Vergleich zu bTSH einen schwächeren Effekt auf den ^{131}I -Uptake. Da es sich bei FRTL-5-Zellen um Rattenschilddrüsenzellen handelt, entsprechen bTSH und rhTSH nicht dem in der Natur vorkommenden Liganden an deren TSH-Rezeptor. bTSH unterscheidet sich um 28 Aminosäuren in der α -Untereinheit und um 12 Aminosäuren in der β -Untereinheit von rhTSH. Außerdem fehlen rhTSH gegenüber bTSH vier positiv geladene Aminosäurereste in der α -Untereinheit und ein positiv geladener Aminosäurerest in der β -Untereinheit. Die Ladungen in der α -Untereinheit scheinen für die Rezeptorbindung verantwortlich zu sein. bTSH könnte ähnlich wie am humanen TSH-

Rezeptor eine höhere Affinität und intrinsische Aktivität am TSH-Rezeptor der FRTL-5-Zellen haben (Szkudlinski et al., 2002; Mueller et al., 2009). Dies ist eine potentielle Erklärung für unsere Beobachtungen.

Der in Abhängigkeit von der TSH-Konzentration ansteigende ^{131}I -Uptake bei bTSH und rhTSH konnte bei TSH TR1401 bedingt nachgewiesen werden. Es konnte beobachtet werden, dass bei TSH-Konzentrationen im mittleren Bereich (0,05 IU/l und 0,01 IU/l) der Uptake der FRTL-5-Zellen am höchsten war und sich dabei nicht signifikant vom Uptake der mit der höchsten Dosis bTSH (0,2 IU/l) inkubierten Proben unterschied. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass TSH TR1401 ein potenteres Analogon als bTSH am TSH-Rezeptor der FRTL-5-Zellen ist. Dafür spricht auch die Tatsache, dass die α -Untereinheit ebenfalls vier positiv geladene Aminosäurereste trägt, wobei diese sich an einer Position von denen des bTSH unterscheiden (Mueller et al., 2009). Dennoch scheint TSH TR1401 schneller zu einer Sättigung der Rezeptoren zu führen und eine Down-Regulation des ^{131}I -Uptake zu bewirken. Laut In-vitro-Studien mit FRTL-5-Zellen bewirkt TSH eine Down-Regulation der TSH-Rezeptor-Gen-Expression bereits nach vier- bis fünfständiger Inkubation (Saji et al., 1992). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von TSH an seinen Rezeptor zur Internalisierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes führt (Avivi et al., 1981). Folgestudien ergaben, dass nach der Internalisierung TSH in Endosomen vom Rezeptor dissoziiert. Im Anschluss wird der TSH-Rezeptor recycled und erneut nach ca. 20 min auf der Zelloberfläche exprimiert. TSH wird in Lysosomen abgebaut (Baratti-Elbaz et al., 1999). Wir vermuten, dass TSH TR1401 eine höhere Affinität zum TSH-Rezeptor der FRTL-5-Zellen hat. Demzufolge könnte die Dissoziation vom Rezeptor in den Endosomen verlangsamt sein. Dadurch könnte der Recycling-Vorgang des Rezeptors inhibiert werden mit der Folge, dass die TSH-Rezeptorzahl an der Oberfläche abnimmt.

Anders als bei den FRTL-5-Zellen konnte bei den ML-1-Zellen, für die von uns gewählten Konzentrationen des bTSH und des rhTSH, keine signifikanten Unterschiede im ^{131}I -Uptake gemessen werden. Dies könnte bedingt sein durch eine reduzierte TSH-Rezeptor-Expression bzw. durch Mutationen des TSH-Rezeptors. Bläser et al. zeigten, dass die Proteinkinase A (PKA) in die Signaltransduktions-Kaskade, die den TSH-abhängigen ^{131}I -Uptake von Schilddrüsenzellen vermittelt, involviert ist (Bläser et al., 2006). Durchaus könnten

auch explizit eine defekte PKA oder andere Störungen der Signalkaskade die fehlende TSH-Antwort bestimmen.

Aufgrund des niedrigen und von der TSH-Konzentration unabhängigen ^{131}I -Uptake eignet sich die Zelllinie ML-1 offensichtlich nicht zur Untersuchung des Einflusses von TSH und seiner Analoga in unterschiedlicher Konzentration auf den ^{131}I -Uptake. Diese Ergebnisse widersprechen teilweise den in der Literatur beschriebenen (Schönberger et al., 2000). Ursache hierfür kann eine weitere Entdifferenzierung der von uns untersuchten Passagen sein. Eine weitere potentielle Erklärung ergibt sich aus den unterschiedlichen methodischen Ansätzen (siehe unter 4.2). Da sich die ML-1-Zellen weder mit bTSH bzw. rhTSH stimulieren ließen noch eine konzentrationsabhängige ^{131}I -Aufnahme gemessen werden konnte und die Ressourcen von TSH TR1401 begrenzt waren, wurde auf eine Behandlung der ML-1-Zellen mit letzterem verzichtet.

4.6 TSH-Analoga in der Radioiodtherapie

RhTSH ist seit Dezember 2007 von der U.S. Food and Drug Administration in Kombination mit Radioiod zur Ablation von postoperativ verbliebenem Schilddrüsengewebe beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom zugelassen (Haugen et al., 2008). Im Vorfeld haben mehrere klinische Studien ergeben, dass durch Stimulation mit rhTSH eine erfolgreiche und effektive Ablation möglich ist. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass sich die Ablationsraten nach Stimulation mit rhTSH und nach endogener Stimulation glichen (Robbins et al., 2001; Berg et al., 2002; Pacini et al., 2006; Pilli et al., 2007). Ferner wurde beobachtet, dass die mittlere Verweildauer von ^{131}I in der Restschilddrüse nach rhTSH-Stimulation länger war als nach Schilddrüsenhormonentzug, was die Effektivität einer RIT steigern könnte (Hänscheid et al., 2006). Trotz gleicher Ablationsrate bei höheren Kosten wird rhTSH in der RIT von Schilddrüsenkarzinomen genutzt, da eine bessere Lebensqualität im Vergleich zur endogenen Stimulation mit hypothyreoter Stoffwechsellage verifiziert werden konnte (Schroeder et al., 2006; Duntas und Biondi, 2007). In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass der Uptake von FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit bTSH in der Konzentration 0,2 IU/l sich nicht vom Uptake der mit TSH TR1401 in den Konzentrationen 0,05 IU/l und 0,01 IU/l inkubierten Zellen unterschied. In Folgeversuchen müsste geklärt werden, wie sich TSH TR1401 in vitro an humanen Schilddrüsen- und Schilddrüsenkarzinomzellen bzw. in vivo auf den

Uptake und den Ablationserfolg auswirkt. Möglicherweise kann mit TSH TR1401 eine Dosisreduktion gegenüber rhTSH erreicht werden. Auch wenn nur wenige nicht schwerwiegende Nebenwirkungen – Übelkeit, Kopfschmerzen, Schmerzen an der Injektionsstelle – von rhTSH bekannt sind, könnte deren Auftreten durch eine geringere Dosis von TSH TR1401 reduziert werden (Kohlfuerst et al., 2005). Zu beachten bleibt, dass rhTSH bei humanen fötalen Schilddrüsenzellen das Zellwachstum fördert (Huber et al., 1991). In unseren Versuchen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass rhTSH und TSH TR1401 das Wachstum von FRTL-5-Zellen stimulieren. Obwohl ML-1-Zellen kein TSH-abhängiges Wachstum zeigten, wäre es durchaus möglich, dass TSH-sensible maligne transformierte Zellen durch TSH-Stimulation proliferieren. In klinischen Studien konnte eine akute Vergrößerung der Tumormasse nach rhTSH-Injektion nachgewiesen werden. Ursache dafür schien eine Ödementwicklung aufgrund vaskulärer Prozesse gewesen zu sein (Braga et al., 2001). Hier kann man allerdings davon ausgehen, dass auch die endogene Stimulation analoge Effekte hat. Deshalb wird bei Patienten mit Schilddrüsenmalignom in der Vorgeschichte risikoadaptiert eine Stoffwechsellage mit niedrig normalen oder supprimierten TSH-Werten angestrebt.

Obwohl wir mit FRTL-5-Zellen benigne Zellen für unsere Experimente mit TSH TR1401 verwendeten, können die Ergebnisse als Grundlage für weitere Versuche zur Anwendung von TSH TR1401 in der RIT von benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen genutzt werden. Einerseits spielt die vollständige Ablation der Restschilddrüse eine prognostisch entscheidende Rolle in der Therapie der differenzierten Schilddrüsenkarzinome. Andererseits wurde rhTSH bereits in klinischen Studien zur RIT von benignen Erkrankungen eingesetzt. Die Vorbehandlung mit rhTSH führte zu einem Anstieg des ^{131}I -Uptake und zu einer Volumenreduktion in der Therapie der Struma (Huysmans et al., 2000; Silva et al., 2004). Jedoch traten dabei Nebenwirkungen wie Hyperthyreose, Halsschmerzen und Empfindungsstörungen durch vorübergehende Strumavergrößerung auf (Nielsen et al., 2006). In diesem Fall könnte ebenfalls eine niedrigere Dosis von TSH TR1401 bei gleichem therapeutischem Effekt die Verträglichkeit verbessern. Dennoch bleibt zu beachten, dass TSH TR1401 ähnlich dem bTSH eine höhere intrinsische Aktivität am TSH-Rezeptor zu haben scheint. Die Applikation von bTSH beim Menschen erwies sich als äußerst nebenwirkungsreich. So konnten akute Vergrößerungen der Schilddrüse bis auf das 6-fache der Ausgangsgröße

und Schmerzen beim Schlucken beobachtet werden (Braga et al., 2001). Weiteren Aufschluss über die Verträglichkeit von TSH TR1401 könnten klinische Studien ergeben.

4.7 Retinoide in der Radioiodtherapie

Retinoide werden in der RIT der Schilddrüsenkarzinome angewendet. Die Ergebnisse klinischer Studien fielen unterschiedlich aus. Sowohl ein positiver Effekt auf den Radioiod-Uptake als auch ein unveränderter Radioiod-Uptake wurden beschrieben (Simon et al., 1998; Simon et al., 2002; Short et al., 2004; Kim et al., 2009). Wir untersuchten den ^{131}I -Uptake von FRTL-5-Zellen und ML-1-Zellen nach Inkubation mit TTNPB.

Nach Inkubation der ML-1-Zellen mit TTNPB lösten sich diese vom Boden der Zellkulturflaschen ab, sodass weder die Zellzahl noch der Uptake bestimmt werden konnten. In weiteren Versuchen stellte sich heraus, dass hierfür das Lösemittel DMSO – wenn auch nur in der geringen Konzentration von 2 % – verantwortlich war. Ein zytotoxischer Effekt von DMSO durch Beeinflussung des Zellstoffwechsels und der Membranintegrität wurde nachgewiesen. Ferner kann DMSO Zellverbindungen verändern und somit Monolayerkulturen zerstören. Da Violante et al. konnten bei einer DMSO-Konzentration von 20 % einen zytotoxischen Effekt auf Caco2/TC7-Zellen verifizieren (Da Violante et al., 2002). DMSO scheint auch auf ML-1-Zellen einen zytotoxischen Effekt – allerdings bereits bei niedrigeren Konzentrationen – zu haben. Der Versuch DMSO als Lösungsmittel für TTNPB durch Ethanol zu ersetzen schlug fehl. TTNPB löste sich nicht vollständig in Ethanol. Der Einfluss der Retinoide auf das Zellwachstum und den ^{131}I -Uptake von ML-1-Zellen bleibt somit Folgestudien überlassen.

Das Zellwachstum der FRTL-5-Zellen blieb von der Inkubation mit TTNPB unbeeinflusst. Es konnte keine signifikant veränderte Proliferation nach Applikation des Retinoids gemessen werden. Jedoch senkte TTNPB den ^{131}I -Uptake im Vergleich zu unbehandelten FRTL-5-Zellen um 50 % bis 75 %. Wie unter 3.3.5 beschrieben unterschied sich der Uptake der mehrfach mit TTNPB inkubierten Zellen nach 72 h nicht vom Uptake der einfach mit TTNPB inkubierten Zellen. Dieses Ergebnis könnte dafür sprechen, dass TTNPB nach 72 h seine volle Wirkung auf die FRTL-5-Zellen entfaltet hatte. Schmutzler et al. konnten für FRTL-5-Zellen nach Inkubation mit ATRA eine Abnahme der NIS-mRNA-Expression und einen reduzierten ^{125}I -Uptake nachweisen (Schmutzler et al.,

1997). Auch Arai et al. konnten einen verminderten I⁻-Uptake unter RA in vitro nachweisen (Arai et al., 1991). Weitere In-vitro-Studien zeigten, dass RA die Expression von schilddrüsenspezifischen Genen für die TPO und das Thyreoglobulin inhibiert und somit die Schilddrüsenfunktion hemmt (Namba et al., 1993). Diese Erkenntnisse aus In-vitro-Versuchen passen gut zu den Ergebnissen von Garcin et al., die bei Ratten eine Abnahme des Serum-T₃ und -T₄ nach Aufnahme von Retinoiden in hoher Dosis bzw. erhöhte Schilddrüsenhormonwerte bei Vitamin-A-Mangeldiät messen konnten (Garcin et al., 1983; Garcin et al., 1984). Dieses Ergebnis steht in einem Gegensatz zum gesteigerten ¹²⁵I-Uptake von Schilddrüsenkarzinomzellen (van Herle et al., 1990). Da in der Promotorregion des NIS-Gens von Schilddrüsenkarzinomzellen ein Retinsäure-Response-Element (RARE) nachgewiesen wurde, könnte man annehmen, dass diese Erkenntnis auch für benigne Schilddrüsenzellen zutrifft (Schmutzler et al., 2002). Dennoch sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass die Ursache für die Inhibition des ¹³¹I-Uptake der FRTL-5-Zellen auf einer anderen regulatorischen Ebene liegt. Kogai et al. konnten nachweisen, dass ATRA die NIS-Expression in MCF-7-Mammakarzinom-Zellen über die IGF-1-Rezeptor/PI3K-Kaskade stimuliert (Kogai et al., 2008 a). Für FRTL-5-Zellen konnte jedoch gezeigt werden, dass die NIS-Expression und der I⁻-Uptake durch Inhibition der PI3K stimuliert werden (Kogai et al., 2008 b). Deshalb könnte TTNPB den ¹³¹I-Uptake der FRTL-5-Zellen durch Aktivierung der PI3K senken.

In klinischen Studien konnte ein positiver Effekt von RXR-selektiven Retinoiden auf den ¹³¹I-Uptake bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen werden (Liu et al., 2006). In weiteren In-vitro-Studien sollte die Wirkung von Retinoiden auf die ¹³¹I-Aufnahme sowohl bei benignen FRTL-5- als auch bei maligne transformierten ML-1-Zellen untersucht werden.

4.8 Neue Therapien

Die Prognose der differenzierten Schilddrüsenkarzinome ist gut. Dennoch leiden ca. 15 % der Patienten an einer persistierenden oder rezidivierenden Erkrankung mit einer weitaus schlechteren Prognose. Diese haben Fernmetastasen bzw. eine schlecht differenzierte Form mit einer geringen oder fehlenden Radioiodspeicherung. Therapeutische Optionen sind dann die externe Bestrahlung und die systemische Chemotherapie, beide jedoch mit begrenztem Erfolg.

Aktuell wird das Augenmerk auf den Einsatz von Gentherapie bei schlecht differenzierten und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen gelegt. In In-vitro- und In-vivo-Studien konnte für die korrektive-, die zytoreduktive- und die immunmodulatorische Gentherapie eine Reduktion der Tumormasse verifiziert werden. Weiteren Erfolg verspricht man sich vom Transport von NIS-cDNA in Tumorzellen, die die Fähigkeit zur ^{131}I -Aufnahme verloren haben (Spitzweg, 2009). Neuere Therapeutika sind die Tyrosinkinaseinhibitoren sowie die Angiogenesehemmer. Dazu zählen u. a. Sorafenib und Sunitinib. Beide hemmen den Vascular-endothelial-growth-factor-Rezeptor (VEGFR) und das RET-Onkogen. Obwohl Sorafenib keine Reinduktion des Radioiod-Uptake bewirkte, konnte in klinischen Studien ein teilweise Ansprechen der Therapie bzw. eine verzögerte Progression nachgewiesen werden. Die Ansprechrate und die Krankheits-Kontroll-Rate von Sunitinib lagen bei 13 % bzw. bei 81 %. Derzeit laufen Studien zur Untersuchung ob letzteres in Kombination mit ^{131}I einen besseren therapeutischen Erfolg erbringt. Sorafenib und Sunitinib werden als Off-Label-Therapeutika bei Patienten mit fortgeschrittenem Schilddrüsenkarzinom angewendet (Romagnoli et al., 2009).

Eine weitere Optimierung der RIT kann durch die Entwicklung von TSH-Analoga erreicht werden. Eines davon, das TSH-Superanalogon TR1401, lässt in Anbetracht unserer Ergebnisse vermuten, dass eine stärkere Stimulation des ^{131}I -Uptake im Vergleich zum aktuell angewendeten rhTSH möglich ist. Es bleibt nun zu überprüfen, inwieweit sich TSH TR1401 in der Praxis etabliert.

5. Zusammenfassung

Der TSH-abhängige Iodstoffwechsel und die damit verbundene Radioiodaufnahme von Thyreozyten und differenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist Basis der nuklearmedizinischen Therapie thyreoidaler Erkrankungen. Der teilweise oder vollständige Verlust der ^{131}I -Aufnahme beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom führt zu einer drastischen Verschlechterung der Prognose bei dieser Erkrankung. In der Therapievorbereitung von Schilddrüsenmalignomen wird zunehmend rekombinantes humanes TSH (rhTSH) zur Stimulation des ^{131}I -Uptake eingesetzt. Gegenstand der aktuellen Forschung ist die Entwicklung neuer potenterer TSH-Analoga. Basierend auf ihrer potentiellen redifferenzierenden und den ^{131}I -Uptake steigernden Wirkung werden Retinoide ergänzend angewendet.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines neuen TSH-Analogen TR1401 auf den Iodstoffwechsel in vitro im Vergleich zu bovinem TSH (bTSH) und rhTSH untersucht. Neben der Konzentrationsabhängigkeit des ^{131}I -Uptake ergab sich die Frage nach dem Einfluss unterschiedlicher TSH-Analoga auf die Zellproliferation. Als In-vitro-Modelle wurden die benigne Schilddrüsenzelllinie FRTL-5 und die Schilddrüsenkarzinomzelllinie ML-1 gewählt. Ergänzend untersuchten wir den Effekt des RAR-selektiven Retinoids TTNPB auf den ^{131}I -Uptake. Der Messzeitraum betrug 72 h.

Für die FRTL-5-Zellen konnte gezeigt werden, dass bTSH und TSH TR1401 bei der Stimulation des ^{131}I -Uptake dem rhTSH überlegen waren. Mittlere Konzentrationen des TSH TR1401 im gewählten Konzentrationsbereich stimulierten den Uptake am stärksten. Die hiermit erzielten Uptake-Werte unterschieden sich dabei nicht von denen der mit der höchsten bTSH-Konzentration inkubierten Kulturen. Im Gegensatz hierzu senkte das Retinoid TTNPB die ^{131}I -Aufnahme. Die Zelllinie ML-1 erwies sich als unbrauchbar für die geplanten Untersuchungen. Der ^{131}I -Uptake der ML-1-Zellen war sehr gering bzw. häufig nicht messbar, eine TSH-Abhängigkeit konnte nicht nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen TSH-Analoga konnte mit TSH TR1401 der Radioiod-Uptake in vitro wirkungsvoll gesteigert werden. Mit dem Retinoid TTNPB wurde dagegen eine Verminderung der Radioiodaufnahme erzielt. In künftigen Untersuchungen sollte die Wirkung von TSH TR1401 auch in vivo untersucht werden, wobei zunächst die optimale Dosierung ermittelt werden muss.

6. Literaturverzeichnis

Ambesi-Impiombato FS, Parks LA, Coon HG: Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. Proc Natl Acad Sci USA. 77, 3455-3459 (1980)

Ambesi-Impiombato FS, Perrild H: FRTL-5 today: Proceedings of the first international workshop of characterization and standardization of an in vitro thyroid cell system Udine, Italy, 26-28 october 1988. Excerpta medica (1989)

Arai M, Tsushima T, Isozaki O, Shizume K, Emoto N, Demura H, Miyakawa M, Onoda N: Effects of retinoids on iodine metabolism, thyroid peroxidase gene expression, and deoxyribonucleic acid synthesis in porcine thyroid cells in culture. Endocrinology. 129, 2827-2833 (1991)

Arnhold T: Untersuchungen von Vitamin A/Retinoiden im Hinblick auf eine Risikoabschätzung ihrer teratogenen Wirkung beim Menschen. Natw. Diss. Braunschweig, 2000

Arturi F, Russo D, Schlumberger M, du Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suárez HG, Filetti S: Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. J Clin Endocrinol Metab. 83, 2493-2496 (1998)

Avivi A, Tramontano D, Ambesi-Impiombato FS, Schlessinger J: Adenosine 3',5'-monophosphate modulates thyrotropin receptor clustering and thyrotropin activity in culture. Science. 214, 1237-1239 (1981)

Baratti-Elbaz C, Ghinea N, Lahuna O, Loosfelt H, Pichon C, Milgrom E: Internalization and recycling pathways of the thyrotropin receptor. Mol Endocrinol. 13, 1751-1765 (1999)

Bell E, Grünwald F: 1.2 Wirkungsmechanismus. In: Bell E, Grünwald F: Radiojodtherapie bei benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen. 2-5, Springer, Berlin, 1999

Berg G, Lindstedt G, Suurkula M, Jansson S: Radioiodine ablation and therapy in differentiated thyroid cancer under stimulation with recombinant human thyroid-stimulating hormone. *J Endocrinol Invest.* 25, 44-52 (2002)

Bizhanova A, Kopp P: Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology.* 150, 1084-1090 (2009)

Bläser D, Maschauer S, Kuwert T, Prante O: In vitro studies on the signal transduction of thyroidal uptake of ^{18}F -FDG and ^{131}I -Iodide. *J Nucl Med.* 47, 1382-1388 (2006)

Böcker W, Kleihues P, Höfler HK, Lax S, Poremba C, Moll R: Allgemeine Tumorpathologie. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU: Pathologie. 3.Aufl., 169-195, Urban & Fischer, München, 2004

Boelaert K, Smith VE, Stratford AL, Kogai T, Tannahill LA, Watkinson JC, Eggo MC, Franklyn JA, McCabe CJ: PTTG and PBF repress the human sodium iodide symporter. *Oncogene.* 26, 4344-4356 (2007)

Bongarzone I, Fugazzola L, Vigneri P, Mariani L, Mondellini P, Pacini F, Basolo F, Pinchera A, Pilotti S, Pierotti MA: Age-related activation of the tyrosine kinase receptor protooncogenes RET and NTRK1 in papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 81, 2006-2009 (1996)

Brabant G, Maenhaut C, Köhrle J, Scheumann G, Dralle H, Hoang-Vu C, Hesch RD, von zur Mühlen A, Vassart G, Dumont JE: Human thyrotropin receptor gene: expression in thyroid tumors and correlation to markers of thyroid differentiation and dedifferentiation. *Moll Cell Endocrinol.* 82, R7-R12 (1991)

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72, 248-254 (1976)

Braga M, Ringel MD, Cooper DS: Sudden enlargement of local recurrent thyroid tumor after recombinant human TSH administration. *J Clin Endocrinol Metab.* 86, 5148-5151 (2001)

Breitman TR, Collins SJ, Keene BR: Terminal differentiation of human promyelocytic leukemic cells in primary culture in response to retinoic acid. *Blood.* 57, 1000-1004 (1981)

Brönnegård M, Törring O, Böös J, Sylven C, Marcus C, Wallin G: Expression of thyrotropin receptor and thyroid hormone receptor messenger ribonucleic acid in normal, hyperplastic, and neoplastic human thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 79, 384-389 (1994)

Da Violante, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P: Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biol Pharm Bull.* 25, 1600-1603 (2002)

DeGroot LJ, Kaplan EL, McCormik M, Straus FH: Natural history, treatment, and course of papillary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 71, 414-424 (1990)

De Lloyd A, Bursell J, Gregory JW, Rees DA, Ludgate M: TSH receptor activation and body composition. *J Endocrinol.* 204, 13-20 (2010)

Dietlein M, Dressler J, Eschner W, Grünwald F, Lassmann M, Leisner B, Luster M, Moser E, Reiners C, Schicha H, Schober O: Procedure guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer (version 3). *Nuklearmedizin.* 46, 213-219 (2007 a)

Dietlein M, Dressler J, Grünwald F, Leisner B, Moser E, Reiners C, Schicha H, Schneider P, Schober O: Guideline for the radioiodine therapy for benign thyroid diseases (version 4). *Nuklearmedizin.* 46, 220-223 (2007 b)

Duntas LH, Biondi B: Short-term hypothyroidism after Levothyroxine-withdrawal in patients with differentiated thyroid cancer: clinical and quality of life consequences. *Eur J Endocrinol.* 156, 13-19 (2007)

Elisei R, Vivaldi A, Agate L, Ciampi R, Molinaro E, Piampiani P, Romei C, Faviana P, Basolo F, Miccoli P, Capodanno A, Collecchi P, Pacini F, Pinchera A: All-trans-retinoic acid treatment inhibits the growth of retinoic acid receptor beta messenger ribonucleic acid expressing thyroid cancer cell lines but does not reinduce the expression of thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 90, 2403-2411 (2005)

Esapa CT, Johnson SJ, Kendall-Taylor P, Lennard TW, Harris PE: Prevalence of Ras mutations in thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf).* 50, 529-535 (1999)

Esteva FJ, Glaspy J, Baidas S, Laufman L, Hutchins L, Dickler M, Tipathy D, Cohen R, DeMichele A, Yocum RC, Osborne CK, Hayes DF, Hortobagyi GN, Winer E, Demetri GD: Multicenter phase II study of oral bexarotene for patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 21, 999-1006 (2003)

Evans TR, Kaye SB: Retinoids: present role and future potential. *Br J cancer.* 80, 1-8 (1999)

Fagin JA, Mitsiades N: Molecular pathology of thyroid cancer: diagnostic and clinical implications. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 22, 955-969 (2008)

Fröhlich E, Witke A, Czarnocka B, Wahl R: Retinol has specific effects on binding of thyrotrophin to cultured porcine thyrocytes. *J Endocrinol.* 183, 617-626 (2004)

Garcin H, Higuieret P: Thyroid hormones in vitamin A-deficient rats: effect of retinoic acid supplementation. *Ann Nutr Metab.* 27, 495-500 (1983)

Garcin H, Higuieret P, Amoikon K: Effects of a large dose of retinol or retinoic acid on the thyroid hormones in the rat. *Ann Nutr Metab.* 28, 92-100 (1984)

Gire V, Marshall C, Wynford-Thomas D: PI-3-kinase is an essential anti-apoptotic effector in the proliferative response of primary human epithelial cells to mutant RAS. *Oncogene.* 19, 2269-2276 (2000)

Golden WM, Weber KB, Hernandez TL, Sherman SI, Woodmansee WW, Haugen BR: Single-dose rexinoid rapidly and specifically suppresses serum thyrotropin in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 124-130 (2007)

Grollman EF, Smolar A, Ommaya A, Tombaccini D, Santisteban P: Iodine suppression of iodide uptake in FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology.* 118, 2477-2482 (1986)

Grünwald F, Kälicke T, Feine U, Lietzenmayer R, Scheidhauer K, Dietlein M, Schober O, Lerch H, Brandt-Mainz K, Burchert W, Hiltermann G, Cremerius U, Biersack HJ: Fluorine-18 fluorodeoxyglucose positron emission tomography in thyroid cancer: results of a multicentre study. *Eur J Nucl Med.* 26, 1547-1552 (1999)

Hänscheid H, Lassmann M, Luster M, Thomas SR, Pacini F, Ceccarelli C, Ladenson PW, Wahl RL, Schlumberger M, Ricard M, Driedger A, Kloos RT, Sherman SI, Haugen BR, Carriere V, Corone C, Reiners C: Iodine biokinetics and dosimetry in radioiodine therapy of thyroid cancer: procedures and results of a prospective international controlled study of ablation after rhTSH or hormone withdrawal. *J Nucl Med.* 47, 648-654 (2006)

Haugen BR, Cooper DS, Emerson CH, Luster M, Maciel RM, Biscolla RP, Mazzaferri EL, Medeiros-Neto G, Reiners C, Robbins RJ, Robinson BG, Schlumberger M, Yamashita S, Pacini F: Expanding indications for recombinant human TSH in thyroid cancer. *Thyroid.* 18, 687-694 (2008)

Heitz PU, Komminoth P, Klöppel G: Schilddrüse. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU: *Pathologie.* 3. Aufl., 385-404, Urban & Fischer, München, 2004

Herold G: Malignome der Schilddrüse. In: Herold G: *Innere Medizin 2007,* 677-679, Herausgeber: Dr. med. Gerd Herold, Köln, 2007

Hombach-Klonisch S, Bialek J, Trojanowicz B, Weber E, Holzhausen HJ, Silvertown JD, Summerlee AJ, Dralle H, Hoang-Vu C, Klonisch T: Relaxin enhances the oncogenic potential of human thyroid carcinoma cells. *Am J Pathol.* 169, 617-632 (2006)

Horwitz SM: Novel therapies for cutaneous T-cell lymphomas. *Clin Lymphoma Myeloma.* 8, 187-192 (2008)

Huber GK, Fong P, Concepcion ES, Davies TF: Recombinant human thyroid-stimulating hormone: initial bioactivity assessment using human fetal thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 72, 1328-1331 (1991)

Huysmans DA, Nieuwlaat WA, Erdtsieck RJ, Schellekens AP, Bus JW, Bravenboer B, Hermus AR: Administration of a single low dose of recombinant human thyrotropin significantly enhances thyroid radioiodide uptake in nontoxic nodular goiter. *J Clin Endocrinol Metab.* 85, 3592-3596 (2000)

Kaminsky SM, Levy O, Salvador C, Dai G, Carrasco N: Na⁽⁺⁾-I-symport activity is present in membrane vesicles from thyrotropin-deprived non-I⁽⁻⁾-transporting cultured thyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 91, 3789-3793 (1994)

Kim WG, Kim EY, Kim TY, Ryu JS, Hong SJ, Kim WB, Shong YK: Redifferentiation therapy with 13-cis retinoic acids in radioiodine-resistant thyroid cancer. *Endocr J.* 56, 105-112 (2009)

Kimura T, Dumont JE, Fusco A, Golstein J: Insulin and TSH promote growth in size of PC Cl3 rat thyroid cells, possibly via a pathway different from DNA synthesis: comparison with FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol.* 140, 94-103 (1999)

Kimura T, Van Keymeulen A, Golstein J, Fusco A, Dumont JE, Roger PP: Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr Rev.* 22, 631-656 (2001)

Knepel W: Schilddrüsenterapeutika. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl., 715-725, Urban & Fischer, München, 2005

Knopp J, Stolc V, Tong W: Evidence for the induction of iodide transport in bovine thyroid cells treated with thyroid-stimulating hormone or dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 245, 4403-4408 (1970)

Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T: Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology.* 138, 2227-2232 (1997)

Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, Huang M, Brent GA: Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 8519-8524 (2000)

Kogai T, Ohashi E, Jacobs MS, Sajid-Crocket S, Fisher ML, Kanamoto Y, Brent GA: Retinoic acid stimulation of the sodium/iodide symporter in MCF-7 breast cancer cells is mediated by the insulin growth factor-I/phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 93, 1884-1892 (2008 a)

Kogai T, Sajid-Crockett S, Newmarch LS, Liu YY, Brent GA: Phosphoinositide-3-kinase inhibition induces sodium/iodide symporter expression in rat thyroid cells and human papillary thyroid cancer cells. *J Endocrinol.* 199, 243-252 (2008 b)

Kohlfuerst S, Igerc I, Lind P: Recombinant human thyrotropin is helpful in the follow-up and ¹³¹I therapy of patients with thyroid cancer: a report of the results and benefits using recombinant human thyrotropin in clinical routine. *Thyroid.* 15, 371-376 (2005)

Krause K, Karger S, Sheu SY, Aigner T, Kursawe R, Grimm O, Schmid KW, Dralle H, Fuhrer D: Evidence for a role of the amyloid precursor protein in thyroid carcinogenesis. *J Endocrinol.* 198, 291-299 (2008)

Lan L, Cui D, Luo Y, Shi BY, Deng LL, Zhang GY, Wang H: Inhibitory effects of retinoic acid on invasiveness of human thyroid carcinoma cell lines in vitro. *J Endocrinol Invest.* 32, 731-738 (2009)

Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahé C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M: Expression of Na⁺/I⁻ symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 3228-3234 (1999)

Lee CS, Li K: A review of acitretin for the treatment of psoriasis. *Expert Opin Drug Saf.* 8, 769-779 (2009)

Liu YY, Stokkel MP, Pereira AM, Corssmit EP, Morreau HA, Romijn JA, Smit JW: Bexarotene increases uptake of radioiodide in metastases of differentiated thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 154, 525-531 (2006)

Liu YY, Stokkel MP, Morreau HA, Pereira AM, Romijn JA, Smit JW: Radioiodine therapy after pretreatment with bexarotene for metastases of differentiated thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 68, 605-609 (2008)

Löffler G: Vitamine. In: Löffler G, Petrides PE: *Biochemie & Pathobiochemie.* 7. Aufl., 722-749, Springer, Berlin, 2003

Lu Y, Bratton S, Heydel JM, Radomska-Pandya A: Effect of retinoids on UDP-glucuronyltransferase 2B7 mRNA expression in Caco-2 cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* 23, 364-372 (2008)

Meller B, Deisting W, Wenzel BE, Pethe A, Nadrowitz R, Meller J, Richter E, Baehre M: Increased radioiodine uptake of thyroid cell cultures after external irradiation. *Strahlenther Onkol.* 182, 30-36 (2006)

Meller B, Gaspar E, Deisting W, Czarnocka B, Baehre M, Wenzel BE: Decreased radioiodine uptake of FRTL-5 cells after ¹³¹I incubation in vitro: molecular biological investigations indicate a cell cycle-dependent pathway. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 35, 1204-1212 (2008)

Mueller S, Kleinau G, Szkudlinski MW, Jaeschke H, Krause G, Paschke R: The superagonistic activity of bovine thyroid-stimulating hormone (TSH) and the human TR1401 TSH analog is determined by specific amino acids in the hinge region of human TSH receptor. *J Biol Chem.* 284, 16317-16324 (2009)

Nagy L, Thomázy VA, Shipley GL, Fésüs L, Lamph W, Heyman RA, Chandraratna RA, Davies PJ: Activation of retinoid X receptors induces apoptosis in HL-60 cell lines. *Mol Cell Biol.* 15, 3540-3551 (1995)

Namba H, Rubin SA, Fagin JA: Point mutations of ras oncogenes are an early event in thyroid tumorigenesis. *Mol Endocrinol.* 4, 1474-1479 (1990)

Namba H, Yamashita S, Morita S, Villadolid MC, Kimura H, Yokoyama N, Izumi M, Ishikawa N, Ito K, Nagataki S: Retinoic acid inhibits human thyroid peroxidase and thyroglobulin gene expression in cultured human thyrocytes. *J Endocrinol Invest.* 16, 87-93 (1993)

Nielsen VE, Bonnema SJ, Hegedüs L: Transient goiter enlargement after administration of 0,3 mg of recombinant human thyrotropin in patients with benign nontoxic nodular goiter: a randomized, double-blind, crossover trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 1317-1322 (2006)

Ohta K, Endo T, Onaya T: The mRNA levels of thyrotropin receptor, thyroglobulin and thyroid peroxidase in neoplastic human thyroid tissues. *Biochem Biophys Res Commun.* 174, 1148-1153 (1991)

Ossendorp FA, Bruning PF, Schuurin EM, van den Brink JA, van der Heide D, De Vijlder JJ, De Bruin TW: Thyrotropin dependent and independent thyroid cell lines selected from FRTL-5 derived tumors grown in nude mice. *Endocrinology.* 127, 419-430 (1990)

Pacini F, Ladenson PW, Schlumberger M, Driedger A, Luster M, Kloos RT, Sherman S, Haugen B, Corone C, Molinaro E, Elisei R, Ceccarelli C, Pinchera A, Wahl RL, Leboulleux S, Ricard M, Yoo J, Busaidy NL, Delpassand E, Hanscheid H, Felbinger R, Lassmann M, Reiners C: Radioiodine ablation of thyroid remnants after preparation with recombinant human thyrotropin in differentiated thyroid carcinoma: results of an international, randomized, controlled study. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 926-932 (2006)

Pattanayek R, Newcomer ME: Protein and ligand adaptation in a retinoic acid binding protein. *Protein Sci.* 8, 2027-2032 (1999)

Park HJ, Kim JY, Park KY, Gong G, Hong SJ, Ahn IM: Expressions of human sodium iodide symporter mRNA in primary and metastatic papillary thyroid carcinomas. *Thyroid.* 10, 211-217 (2000)

Pfannenstiel P, Hotze LA, Saller B: 2.2 Physiologie der Schilddrüse. In: Pfannenstiel P, Hotze LA, Saller B: *Schilddrüsenerkrankheiten – Diagnose und Therapie.* 4. Aufl., 23-36, Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH, Berlin, 1999 a

Pfannenstiel P, Hotze LA, Saller B: 4.13 Maligne Tumoren der Schilddrüse. In: Pfannenstiel P, Hotze LA, Saller B: *Schilddrüsenerkrankheiten – Diagnose und Therapie.* 4. Aufl., 262-289, Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH, Berlin, 1999 b

Pfannenstiel P, Hotze LA, Saller B: 4.4 Funktionelle Autonomie der Schilddrüse & 4.5 Immunhyperthyreose. In: Pfannenstiel P, Hotze LA, Saller B: *Schilddrüsenerkrankheiten – Diagnose und Therapie,* 4. Aufl., 166-204, Berliner Medizinische Verlagsanstalt GmbH, Berlin, 1999 c

Pilli T, Brianzoni E, Capocchetti F, Castagna MG, Fattori S, Poggiu A, Rossi G, Ferretti F, Guarino E, Burrioni L, Vattimo A, Cipri C, Pacini F: A comparison of 1850 (50 mCi) and 3700 MBq (100 mCi) ¹³¹-iodine administered doses for recombinant thyrotropin-stimulated postoperative thyroid remnant ablation in differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 92, 3542-3546 (2007)

Prante O, Maschauer S, Fremont V, Reinfelder J, Stoehr R, Szkudlinski M, Weintraub B, Hartmann A, Kuwert T: Regulation of uptake of ¹⁸F-FDG by a follicular human thyroid cancer cell line with mutation-activated K-ras. *J Nucl Med.* 50, 1364-1370 (2009)

Reiners C, Demidchik YE, Drozd VM, Biko J: Thyroid cancer in infants and adolescents after Chernobyl. *Minerva Endocrinol.* 33, 381-395 (2008)

Renz-Polster H, Bätge B: Schilddrüse. In: Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J: *Basislehrbuch Innere Medizin.* 3. Aufl., 736-753, Urban & Fischer, München 2004

Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P: New insights in thyroid follicular cell biology and its impact in thyroid cancer therapy. *Endocr Relat Cancer.* 14, 957-977 (2007)

Rigas JR, Dragnev KH: Emerging role of rexinoids in non-small cell lung cancer: focus on bexarotene. *Oncologist.* 10, 22-33 (2005)

Rizvi N, Hawkins MJ, Eisenberg PD, Yocum RC, Reich SD, Ligand L1069-20 Working Group: Placebo-controlled trial of bexarotene, a retinoid x receptor agonist, as maintenance therapy for patients treated with chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2, 210-215 (2001)

Robbins RJ, Tuttle RM, Sonenberg M, Shaha A, Sharaf R, Robbins H, Fleisher M, Larson SM: Radioiodine ablation of thyroid remnants after preparation with recombinant human thyrotropin. *Thyroid.* 11, 865-869 (2001)

Romagnoli S, Moretti S, Voce P, Puxeddu E: Targeted molecular therapies in thyroid carcinoma. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 53, 1061-1073 (2009)

Russo D, Arturi F, Schlumberger M, Caillou B, Monier R, Filetti S, Suárez HG: Activating mutations of the TSH receptor in differentiated thyroid carcinomas. *Oncogene.* 11, 1907-1911 (1995)

Santoro M, Carlomagno F, Hay ID, Herrmann MA, Grieco M, Melillo R, Pierotti MA, Bongarzone I, Della Porta G, Berger N, Peix JL, Paulin C, Fabien N, Vecchio G, Jenkins RB, Fusco A: Ret oncogene activation in human thyroid neoplasms is restricted to the papillary cancer subtype. *J Clin Invest.* 89, 1517-1522 (1992)

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T: Increased expression of the Na⁺/I⁻ Symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 82, 3331-3336 (1997)

Saji M, Akamizu T, Sanchez M, Obici S, Avvedimento E, Gottesman ME, Kohn LD: Regulation of thyrotropin receptor gene expression in rat FRTL-5 thyroid cells. *Endocrinology.* 130, 520-533 (1992)

Samaan NA, Schultz PN, Hickey RC, Goepfert H, Haynie TP, Johnston DA, Ordonez NG: The results of various modalities of treatment of well differentiated thyroid carcinomas: a retrospective review of 1599 patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 75, 714-720 (1992)

Sawka AM, Thephamongkhon K, Brouwers M, Thabane L, Browman G, Gerstein HC: Clinical review 170: A systematic review and metaanalysis of the effectiveness of radioactive iodine remnant ablation for well-differentiated thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 89, 3668-3676 (2004)

Schicha H: Endokrine Organe. In: Schicha H, Schober O: *Nuklearmedizin, Basiswissen und klinische Anwendung.* 4. Aufl., 93-127, Schattauer, Stuttgart, 2000

Schiebler TH: Glandula Thyroidea, Schilddrüse. In Schiebeler TH: *Anatomie.* 9. Aufl., 441-443, Springer, Berlin, 2004

Schlumberger MJ: Papillary and follicular thyroid carcinoma. *N Engl J Med.* 338, 297-306 (1998)

Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J, Köhrle J: Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 240, 832-838 (1997)

Schmutzler C, Köhrle J: Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid.* 10, 393-406 (2000)

Schmutzler C, Schmitt TL, Glaser F, Loos U, Köhrle J: The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol.* 189, 145-155 (2002)

Schönberger J, Bauer J, Spruß T, Weber G, Chahoud I, Eilles C, Grimm D: Establishment and characterization of the follicular thyroid carcinoma cell line ML-1. *J Mol Med.* 78, 102-110 (2000)

Schreck R, Schnieders F, Schmutzler C, Köhrle J: Retinoids stimulate type I iodothyronine 5'-deiodinase activity in human follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab.* 79, 791-798 (1994)

Schroeder PR, Haugen BR, Pacini F, Reiners C, Schlumberger M, Sherman SI, Cooper DS, Schuff KG, Braverman LE, Skarulis MC, Davies TF, Mazzaferri EL, Daniels GH, Ross DS, Luster M, Samuels MH, Weintraub BD, Ridgway EC, Ladenson PW: A comparison of short-term changes in health-related quality of life in thyroid carcinoma patients undergoing diagnostic evaluation with recombinant human thyrotropin compared with thyroid hormone withdrawal. *J Clin Endocrinol Metab.* 91, 878-884 (2006)

Sharma V, Hays WR, Wood WM, Pugazhenti U, St Germain DL, Bianco AC, Krezel W, Chambon P, Haugen BR: Effects of retinoids on thyrotrope function and the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology.* 147, 1438-1451 (2006)

Short SC, Suovuori A, Cook G, Vivian G, Harmer C: A phase II study using retinoids as redifferentiation agents to increase iodine uptake in metastatic thyroid cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 16, 569-574 (2004)

Silva MN, Rubió IG, Romão R, Gebrin EM, Buchpiguel C, Tomimori E, Camargo R, Cardia MS, Medeiros-Neto G: Administration of a single dose of recombinant human thyrotropin enhances the efficacy of radioiodine treatment of large compressive multinodular goitres. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 60, 300-308 (2004)

Simon D, Köhrle J, Reiners C, Börner AR, Schmutzler C, Mainz K, Goretzki PE, Röher HD: Redifferentiation therapy with retinoids: therapeutic option for advanced follicular and papillary thyroid carcinoma. *World J Surg*. 22, 569-574 (1998)

Simon D, Körber C, Krausch M, Segering J, Groth P, Görges R, Grünwald F, Müller-Gärtner HW, Schmutzler C, Köhrle J, Röher HD, Reiners C: Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 29, 775-782 (2002)

Smith VE, Read ML, Turnell AS, Watkins RJ, Watkinson JC, Lewy GD, Fong JC, James SR, Eggo MC, Boelaert K, Franklyn JA, McCabe CJ: A novel mechanism of sodium iodide symporter repression in differentiated thyroid cancer. *J Cell Sci*. 122, 3393-3402 (2009)

Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris JC: Clinical review 132: The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 86, 3327-3335 (2001)

Spitzweg C: Gene therapy in thyroid cancer. *Horm Metab Res*. 41, 500-509 (2009)

Stephenson TJ: Endocrine System. In: Underwood JCE: *General and Systematic Pathology*. Third edition, 435-467, Churchill Livingstone, Oxford, 2000

Szkudlinski MW, Fremont V, Ronin C, Weintraub BD: Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol Rev*. 82, 473-502 (2002)

Tallman MS, Altman JK: Curative strategies in acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 391-399 (2008)

Thielitz A, Gollnick H: Topical retinoids in acne vulgaris: update on efficacy and safety. *Am J Clin Dermatol.* 9, 369-381 (2008)

Tramontano D, Cushing GW, Moses AC, Ingbar SH: Insulin-like growth factor-I stimulates the growth of rat thyroid cells in culture and synergizes the stimulation of DNA synthesis induced by TSH and Graves'-IgG. *Endocrinology.* 119, 940-942 (1986)

Urry LA: The cell cycle. In: Campbell NA, Reece JB, Urry LA, Cain ML, Wasserman, Minorsky PV, Jackson RB: *Biology. Eight-Edition*, 228-245, Pearson Benjamin Cummings, London, 2008

Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB: Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻ symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab.* 84, 2449-2457 (1999)

Van Herle AJ, Agatep ML, Padua DN 3rd, Totanes TL, Canlapan DV, Van Herle HM, Juillard GJ: Effects of 13 cis-retinoic acid on growth and differentiation of human follicular carcinoma cells (UCLA R0 82 W-1) in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 71, 755-763 (1990)

Verburg FA, de Keizer B, Lips CJ, Zelissen PM, de Klerk JM: Prognostic significance of successful ablation with radioiodine of differentiated thyroid cancer patients. *Eur J Endocrinol.* 152, 33-37 (2005)

Weiss SJ, Philp NJ, Grollman EF: Iodide transport in a continuous line of cultured cells from rat thyroid. *Endocrinology.* 114, 1090-1098 (1984 a)

Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impimbato FS, Grollman EF: Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology.* 114, 1099-1107 (1984 b)

Williams JA, Malayan SA: Effects of TSH on iodide transport by mouse thyroid lobes in vitro. *Endocrinology.* 97, 162-168 (1975)

Wolf G: The regulation of the thyroid-stimulating hormone of the anterior pituitary gland by thyroid hormone and by 9-cis-retinoic acid. *Nutr Rev.* 60, 374-377 (2002)

Xing M, Usadel H, Cohen Y, Tokamaru Y, Guo Z, Westra WB, Tong BC, Tallini G, Udelsman R, Califano JA, Ladenson PW, Sidransky D: Methylation of the thyroid-stimulating hormone receptor gene in epithelial thyroid tumors: a marker of malignancy and a cause of gene silencing. *Cancer Res.* 63, 2316-2321 (2003)

7. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Birgit Meller für die Vergabe des Themas und die außerordentlich gute Betreuung. Sie hatte stets ein offenes Ohr für meine Fragen sowohl während den Experimenten als auch beim Verfassen der Dissertation.

Ich möchte mich bedanken bei Frau Silvia Grammerstorf-Rosche für die Einarbeitung in die Kultivierung der FRTL-5-Zellen und die Hilfe wenn Fragen hierzu aufkamen.

Ich danke auch Herrn Dipl.-Ing. Christian Breunig für die vielen Ratschläge und Tipps während der experimentellen Arbeit im Labor.

Vielen Dank an meine Mitdoktoranden Christina, Christiane und Christian für die nette Zeit im Labor, die Kollegialität und die Freundschaft.

Den Mitarbeitern der Abteilung für Nuklearmedizin danke ich für die Rücksichtnahme während der experimentellen Arbeit im Labor und ihr Bemühen den Doktoranden den Zugang zu allen Arbeitsplätzen zu ermöglichen.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Familie und Freunde, die stets Interesse an meiner Arbeit bekundeten und mich somit in schwierigen Phasen stets zum Weitermachen motivierten.

Meinen Eltern Elisabeth und Helmut Zimmermann möchte ich für ihre nie endende Unterstützung, ihre aufmunternden Worte, ihr Vertrauen und ihre Liebe danken, die sie mir während meines Studiums und der Dissertation entgegengebracht haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Marcus Helmut Zimmermann
Geburtsdatum 17. August 1981
Geburtsort Ostfildern-Ruit
Nationalität Deutsch
Familienstand Ledig
Eltern Elisabeth und Helmut Zimmermann



Schulbildung:

1988-1992 Grundschule Saarlouis Steinrausch
1992-2001 Max-Planck-Gymnasium Saarlouis, Abitur am 08. Juni 2001

Zivildienst:

07/2001-05/2002 Patientenbegleitservice der St. Elisabeth Klinik Saarlouis

Studium:

10/2002-09/2004 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes
Ärztliche Vorprüfung am 07. September 2004
10/2004-03/2005 Medizinstudium an der Università degli Studi di Bari, Italien
(Erasmus)
04/2005-09/2005 Medizinstudium an der Universität des Saarlandes
10/2005-03/2010 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
Staatsexamen am 29. Oktober 2009

Promotion:

01/2007-08/2008 Experimenteller Teil der Dissertation
06/2010 Fertigstellung der Dissertation