

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. U. Schumacher

***In vitro* und *in vivo* Experimente mit dem humanen Natrium-Iodid-Symporter (hNIS) in extrathyreoidalen humanen Tumorzellen**

Dissertation

zur Erlangung eines Doktors des Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Randi Marisa Pose
aus Hamburg

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 05.03.2014**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. K. Pantel

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	iv
Arbeitshypothese / Fragestellung	viii
1. Einleitung	
1. 1 Humaner Natrium-Iodid-Symporter	1
1. 2 Schilddrüse	3
1. 3 Retinoide	8
1. 4 hNIS-Expression in extrathyreoidalem Gewebe	10
1. 5 Iod und Radionuklide in der Medizin	14
1. 6 Tumorerkrankungen	15
2. Material und Methoden	
2. 1 Chemikalien	18
2. 2 Puffer und Lösungen	19
2. 3 Medien	20
2. 4 Reagenzien	20
2. 5 Verbrauchsmaterial	21
2. 6 Geräte	21
2. 7 Antikörper	22
2. 8 Isotope	23
2. 9 Zellkultur	23
2. 9. 1 Zellpassage	26
2. 9. 2 Vektoren	26
2. 9. 3 Transfektion	28
2. 9. 4 Bestimmung der minimalen toxisch-letalen Antibiotikumkonzentration	29
2. 9. 5 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zelllinien	30
2. 9. 6 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer (Zellzählung mit der Neubauer-Kammer).....	31
2. 9. 7 Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination	31
2. 9. 8 Herstellung Paraffin-fixierter Zellpellets	32
2. 10 Bakterien	
2. 10. 1 Transformation	32

2. 10. 2	Amplifikation	33
2. 10. 3	DNA-Extraktion	33
2. 10. 4	Restriktionsverdau	34
2. 10. 5	Agarose-Gelelektrophorese	34
2. 11.	Western Blot	35
2. 11. 1	Immunpräzipitation	36
2. 11. 2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	36
2. 11. 3	Western Blotting.....	37
2. 11. 4	Proteinnachweis.....	37
2. 12	Durchflusszytometrie	38
2. 13	Objektträger-Färbung	39
2. 14	Anreicherung hNIS-positiver Zellen	
2. 14. 1	Durchflusszytometrisch-gesteuerte Zellsortierung	40
2. 14. 2	Zellausdünnung („limiting dilution“)	41
2. 15	<i>In vitro</i> Experimente mit radioaktiven Nukliden	
2. 15. 1	Radioiodidaufnahmeversuch	41
2. 15. 2	Radioiodidaufnahmeversuche: Verlaufskurven mit / ohne Zeocin	43
2. 15. 3	Radioiodidaufnahmeversuche: parallel zu <i>in vivo</i> gehaltene Zell- kulturen	43
2. 15. 4	Radioiodidaufnahmeversuche mit und ohne DIDS	43
2. 16	<i>In vivo</i> Experimente: Tiermodelle	44
2. 16. 1	Xenotransplantation	44
2. 16. 2	Anästhesie und Euthanasie	45
2. 16. 3	Radionuklidaufnahme <i>in vivo</i>	45
2. 16. 4	<i>In vivo</i> Bildgebung	45
2. 17	Immunhistochemie	46
2. 18	Statistische Auswertung	47
3.	Ergebnisse	48
3. 1	Bestimmung der minimalen toxisch-letalen Antibiotikumkonzentration.....	49
3. 2	Transfektion	50
3. 3	Bestätigung der NIS-Expression in transfizierten und tRA- stimulierten Zellen	52
3. 3. 1	Western Blot	52

3. 3. 2	Durchflusszytometrie	54
3. 3. 2. 1	Durchflusszytometrie-Analyse der hNIS GVO HEK 293 -Zellen	54
3. 3. 2. 2	Durchflusszytometrie-Analyse der hNIS GVO MCF-7 -Zellen	56
3. 3. 2. 3	Durchflusszytometrie-Analyse der hNIS GVO HT29 -Zellen .	57
3. 3. 3	Objektträger-Färbung	58
3. 3. 3. 1	Native MCF-7 -Zellen	60
3. 3. 3. 2	Native, tRA-stimulierte MCF-7 -Zellen	61
3. 3. 3. 3	MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen	62
3. 3. 3. 4	Native HT29 -Zellen	63
3. 3. 3. 5	HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen	64
3. 3. 3. 6	HT29 und MCF-7 GVO hNIS -Zellen nach durchflusszyto- metrischer Sortierung ohne Zeocin im Kulturmedium	65
3. 4	<i>In vitro</i> Experimente mit radioaktiven Nukliden	
3. 4. 1	<i>In vitro</i> Radioiodidaufnahmeversuche	66
3. 4. 2	Radioiodidaufnahmeversuch: Zellklone mit und ohne Zeocin im Kulturmedium	70
3. 4. 3	Versuche zur Iodideffluxhemmung mit DIDS	73
3. 4. 3. 1	Tripletts mit / ohne DIDS	79
3. 5	<i>In vivo</i> Radioaktivversuche	81
3. 6	<i>In vivo</i> Bildgebung	87
3. 7	Immunhistochemie	91
4. Diskussion		94
Zusammenfassung		109
Literaturverzeichnis		110
Danksagung		132
Curriculum vitae		133
Eidesstattliche Erklärung		135

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophyocanin
APL	akute promyelozytische Leukämie
Aqua dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSG	Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cdb	cell dissociation buffer
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
d	Durchmesser
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIDS	4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-disulfonsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EB	elution buffer
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epithelial growth factor
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: Fluorescence activated cell sorting)

FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
G	Gauge
γ -counter	Gammacounter
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GVO	gentechnisch veränderter Organismus
h	Stunde (lat.: hora)
hAIT	humaner apikaler Iodidtransporter
H ₂ O	Wasser
hNIS	humaner Natrium-Iodid-Symporter
HRP	horse raddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
hTERT	human telomerase reserve transcriptase
HWZ	Halbwertzeit
I	Stromstärke
i. d. R.	in der Regel
IgG	ImmunglobulinG
i. p.	intraperitoneal
IP	Immunpräzipitation
i. v.	intravenös
kBq	Kilo-Becquerel
kDa	Kilo-Dalton
keV	Kilo-Elektronenvolt
l	Liter
LSB	Laemmlipuffer
L-T ₃	(L-)Triiodthyronin
L-T ₄	(L-)Thyroxin
λ	Wellenlänge
m	Masse
M	Molar
mA	Milliampère
mAb	monoklonaler Antikörper
MBq	Mega Becquerel
min	Minute

mM	Millimolar
mNIS	Maus- Natrium-Iodid-Symporter
μCi	Mikro-Curie [1 Ci = 37GBq]
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
n	nativ
ng	Nanogramm
p	Wahrscheinlichkeit
P	Passage
PBS	phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PIC	Protease Inhibitor Komplex
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
OT	Objekträger
RA	Retinsäure
RAR	Retinsäurerezeptor
RPM	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	real time PCR
s.	siehe
s. c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunde
SCID	Severe combined immune deficiency (schwere kombinierte Immundefizienz)
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
t	Zeit
T	Temperatur

Tab.	Tabelle
TBq	TerraBecquerel
TBS	tris buffered saline (trisgepufferte Salzlösung)
^{99m}Tc	metastabiles Technetium
Tg	Thyreoglobulin
TPO	Schilddrüsenperoxidase
tRA	trans-Retinsäure
U	Spannung
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
V	Volumen
vgl.	vergleiche
vs.	versus
WB	Western Blot
Zeo	Zeocin
Z. n.	Zustand nach
%	Prozent

Arbeitshypothese / Fragestellung

Der humane Natrium-Iodid-Symporter hat die einzigartige Funktion, Iodid gegen seinen Konzentrationsgradienten aus dem Interstitium in die Follikel epithelzellen der Schilddrüse aufzunehmen. Dadurch ist seine korrekte Funktion die Voraussetzung für die schon längere Zeit etablierte, aktuelle Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen in der Klinik wie z. B. Szintigraphie oder Radioiodtherapie.

Ein Ansatz der aktuellen tumormedizinischen Grundlagenforschung ist es, dieses Transportprotein und damit auch die Möglichkeiten der Bildgebung und Therapie auf andere Tumorentitäten zu übertragen, u. a. auch daher, weil der Transporter ebenfalls in anderen Gewebetypen nachgewiesen werden konnte.

Als primäres Ziel dieser Arbeit sollten *in vitro* stabile, das hNIS -Protein funktionell exprimierende humane Tumorzellen mittels Induktion und Gentransfer generiert werden. Stabil funktionelle Zellen sollten dann u. a. molekularbiologisch untersucht und anschließend für *in vivo* Versuche etabliert werden.

Ein Teilziel sollte es sein, die stabile Gentransfektion versus Retinsäure- induzierter NIS-Expression qualitativ zu vergleichen. Außerdem sollte der Einfluss eines nicht-selektiven Anionenkanalblockers auf die Iodretentionszeit untersucht werden. Die gentechnisch veränderten humanen Tumorzellen sollten für *in vivo* Xenotransplantations bildgebungsversuche dienen. Ferner sollten die gewachsenen Xenotransplantationstumoren immunhistochemisch untersucht werden. Somit sollte die Arbeit einen weiteren Beitrag zur Forschung in der Bildgebung und zur Etablierung und Überwachung von Tumormodellen leisten.

1. Einleitung

1. 1 Humaner Natrium-Iodid-Symporter

Der humane Natrium-Iodid-Symporter (hNIS) gehört zur Natrium/Solute Symporter Familie (SSF, TC N° 2.A.21 (gemäß des Transporter Klassifikationssystems) bzw. der Solute Carrier Family 5 (SCL5A, gemäß Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) Klassifikation) an (Reizer et al. 1994). Das Gen liegt auf Chromosom 19p12-13.2 und kodiert für ein Protein aus 643 Aminosäuren (Kogai et al. 2006). Posttranslational wird es mehrfach glykolysiert, hat eine Molekülmasse von etwa 70 bis 97 kDa und ist ein integrales Plasmamembranglykoprotein mit 13 Transmembransegmenten (Castro et al. 1999b, Gärtner und Reincke 2006). Das NH₂-Ende liegt extra-, das COOH-Ende intrazellulär, was schematisch in Abbildung 1 dargestellt ist. Der elektrophysiologische Ionencotransport erfolgt im stöchiometrischen Verhältnis von zwei zu eins Na⁺ / I⁻-Ionen und vermittelt auf diese Weise einen aktiven I⁻-Transport gegen den elektrochemischen I⁻-Gradienten aus dem Blut / dem Interstitium in die Follikelepithelzellen der Schilddrüse (Eskandari et al. 1997, Carrasco 1993, Kogai et al. 2006). Treibende Kraft ist dabei der elektrochemische Gradient des Natriums über der Plasmamembran, der durch die 3Na⁺ / 2K⁺-ATPase aufrecht erhalten wird (Kogai et al. 2006).

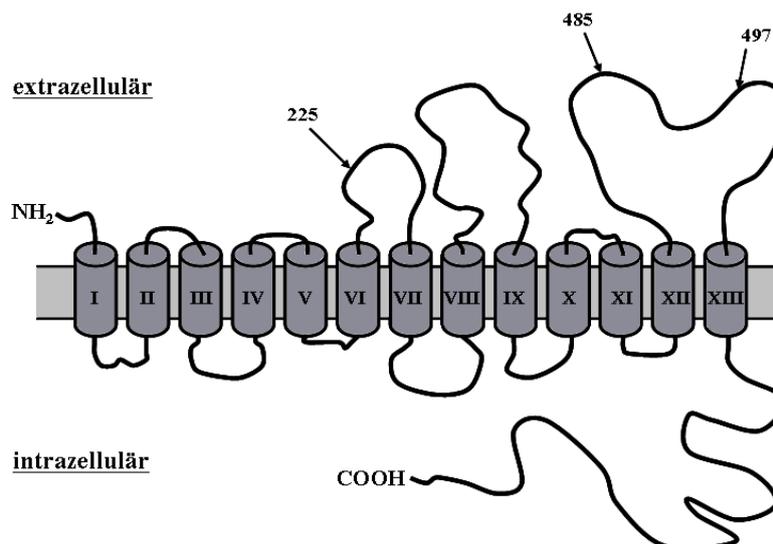


Abb. 1: Schematische Darstellung des Modells für die Sekundärstruktur des Natrium-Iodid-Symporter-Proteins (modifiziert nach Dohán und Carrasco 2003 sowie Dohán et al. 2003). Die 13 Transmembransegmente sind mittels Zylindern dargestellt und römisch durchnummeriert. Die Pfeile markieren die N-Glykosylierungsstellen. Der N-Terminus liegt extrazellulär, der C-Terminus im Zytosol.

Physiologisch kommt hNIS in verschiedenen Glykosylierungen und Phosphorylierungen vor (Levy et al. 1998, Tazebay et al. 2000, Vadysirisack et al. 2007). Die monomere Form des vollglykosylierten NIS-Proteins hat eine ungefähre Molekülmasse von 90 kDa (Bizhanova und Kopp 2009). Bei etwa 55 kDa liegt die Masse einer teilglykosylierten Form (Levy et al. 1998). Im Western Blot wurden weitere Fraktionen bei 15, 80, 100, 130, 160 und 180 kDa unter Verwendung des gleichen Antikörpers beschrieben (Dayem et al. 2008, Levy et al. 1997, Kogai et al. 2000, Spitzweg et al. 2001). Hierbei liegt die aufgrund der Aminosäuresequenz vorhergesagte Molekülmasse bei 68,7 kDa (Spitzweg et al. 1998, Castro et al. 1999b). Die Glykosylierung scheint nur wenig Einfluss auf die Stabilität, Funktionalität und den gezielten Einbau des NIS-Proteins in die Plasmamembran zu haben (Levy et al. 1998, Bizhanova und Kopp 2009). Die Hydroxylierungen im Transmembransegment IX (Ser-353, Thr-354, Ser-356 und Thr-357) hingegen sind wichtig für die korrekte Funktion des Transportproteins (de la Vieja et al. 2000).

Das NIS-Protein transportiert eine Vielzahl von monovalenten Anionen. Darunter sind u. a. ClO_4^- , ClO_3^- , SCN^- , SeCN^- , Br^- , BF_4^- , BrO_3^- sowie NO_3^- und ^{18}F -Tetrafluoroborat (Eskandari et al. 1997, Willhauck et al. 2007, Ahn 2012). Des Weiteren werden auch verschiedene Radioisotope, außer denen des Iods, transportiert: Pertechnetat TcO_4^- , Perrhenat ReO_4^- und Astatin At^- , was aufgrund der physikalischen Eigenschaften der einzelnen Radionuklide verschiedene nuklearmedizinische Einsatzvarianten ermöglicht (Cho et al. 2000, Tazebay et al. 2000, van Sande et al. 2003, Dadachova 2002, Lindencrona 2007).

NIS vermittelt weiterhin auch den Iodidtransport in anderen Geweben und Organen. NIS mRNA und -Proteinexpression wurden in Speichel- und Tränendrüse, Magenschleimhaut, Niere, Plazenta und laktierender Mamma nachgewiesen (Jhiang et al. 1998; Spitzweg et al. 1998; Spitzweg et al. 1999b; Kilbane et al. 2000; Tazebay et al. 2000; Spitzweg et al. 2001a). Des Weiteren fand man hNIS auch in normalem humanen Pankreas, der Kolonschleimhaut bzw. intestinaler Schleimhaut, den Ovarien, der Prostata, der Lunge, in über 80 % beim humanen Mammakarzinom, dem Plexus choroideus sowie im Ziliarkörper des Auges (Dohán et al. 2003, Kogai et al. 2006, Riesco-Eizaguirre und Santisteban 2006). Auch in der Niere wird NIS, wie oben erwähnt, exprimiert, sodass Radiotracer über den Urin ausgeschieden werden können (Spitzweg 2001a, Klutz et al. 2011). Im Gegensatz zum thyreoidalen Transportprotein wird der extrathyreoidale NIS nicht durch einen TSH-Anstieg stimuliert (Carrasco 1993).

In der Follikel­epithel­zelle der Schilddrüse ist der hNIS basolateral lokalisiert und pumpt somit das Iod aus dem Blut / Interstitium in die Zelle hinein (Dohán und Carrasco 2003). Dies führt zu einer Iodanreicherung im Schilddrüsenepithel im Vergleich zum Blutplasma.

Es ist bereits Jahre lang bekannt gewesen, dass ein natriumabhängiger bzw. ein von der Na^+ / K^+ -ATPase-abhängiger Transporter basolateral in der Schilddrüse für den Iodidtransport sorgt (Carrasco 1993). Die molekulare Charakterisierung des Transporterproteins allerdings begann 1996, als zunächst die Isolierung der rNIS cDNA durch Dai et al. (1996), gefolgt von den Sequenzen für das humane (Smanik et al. 1996) und das Mausprotein (Perron et al. 2001 sowie Pinke et al. 2001), gelang. Es wurden hNIS-Antikörper generiert und für Studien zur Topologie und der sekundären Struktur des Proteins eingesetzt (u. a. Levy et al. 1997, Jhiang et al. 1998, Castro et al. 1999 a, b, Pohlenz et al. 2000). Mehrere Arbeitsgruppen konnten im direkten Vergleich von rNIS und hNIS zeigen, dass rNIS effektiver ist (Heltemes et al. 2003, Mitrofanova et al. 2006, Zhang et al. 2005). Dayem et al. (2008) konnten zeigen, dass mNIS effektiver ist als hNIS, was einen Unterschied in der Effektivität der verschiedenen NIS-Arten bewies. Für Forschungszwecke macht dieser Befund ggf. das Maus- und das Rattenprotein attraktiver als den humanen Transporter.

Die strumigenen Eigenschaften von Perchlorat (ClO_4^-) und Thiocyanat (SCN^-) wurden zuerst 1936 von Barker bei Hypertoniepatienten beschrieben, die durch die Behandlung mit diesen Substanzen hypothyreat wurden (Barker 1936). Diese Ionen sind kompetitive Inhibitoren des NIS-Proteins (Wolff 1964, 1998). Ein weiterer Hemmstoff ist Ouabain, was auf der Abhängigkeit des NIS von der Na^+ / K^+ -ATPase beruht (Spitzweg und Morris 2002, Kogai et al. 2006). Perchlorat wurde in der vorliegenden Arbeit zur Blockierung des Iodidtransports durch hNIS eingesetzt.

1. 2 Schilddrüse

Die Schilddrüse ist aus den sogenannten Follikeln aufgebaut, die von einem feinen Netzwerk aus Blutkapillaren und Bindegewebe umgeben sind (Gärtner und Reincke 2006). Diese Schilddrüsenfollikel bestehen aus einem einschichtigen, polarisierten Epithel (Thyreozyten), das das Kolloid umgibt (Gärtner und Reincke 2006).

Im Organismus stellt die Iodidaufnahme den essentiellen ersten Schritt in der Schilddrüsenhormonbiosynthese dar (Carrasco 1993). Durch den funktionellen hNIS wird Iodid in der Schilddrüse deutlich im Vergleich zum Blutplasma aufkonzentriert. Schon frühzeitig wurde eine mittlere Anreicherung zwischen 20- und 40-fach nachgewiesen (Wolff 1964, Carrasco 1993). Damit befinden sich in der Schilddrüse 70-90 % des gesamten im Körper vorhandenen Iods (Kogai et al. 2006).

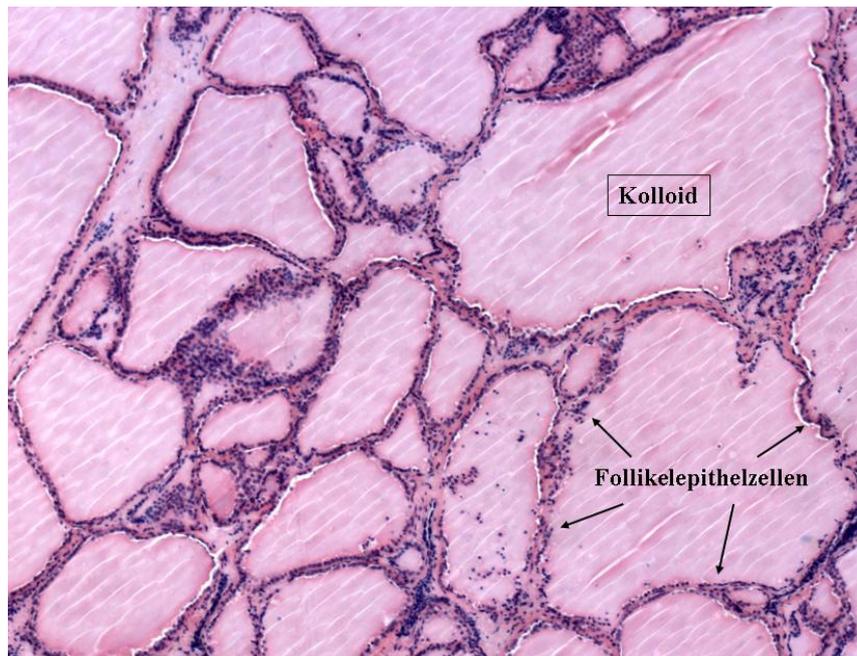


Abb. 2: HE-Färbung einer Schilddrüse bei zehnfacher Vergrößerung. Die das Kolloid umgebenden Follikel­epithel­zellen (Thyrozyten) sind mit Pfeilen beispielhaft markiert. Das Gewebe wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. med. J. Spermhake (Institut für Rechtsmedizin des UKEs) zur Verfügung gestellt.

In den Thyrozyten wird das Iodid rasch nach apikal transportiert und dort über den humanen apikalen Iodidtransporter (hAIT oder auch SLC5A8; Rodriguez et al. 2002, Lacroix et al. 2004) und Pendrin (SLC26A4; Royaux et al. 2000, Yoshida et al. 2002) ins Lumen abgegeben. Pendrin transportiert sowohl Iodid als auch Chlorid in kompetitiver Weise (Yoshida et al. 2002). Im Lumen wird das Iodid durch die Schilddrüsenperoxidase (TPO) organifiziert, was als Iodination bezeichnet wird (Spitzweg et al. 1999b). Iod kann in dieser Form in den Follikeln der Schilddrüse gespeichert werden (vgl. **Abb. 2** und **3**; Dohán und Carrasco 2003, Kogai et al. 2006). Zunächst entstehen Monoiod- und Diiodthyronin (Gärtner und Reincke 2006, Bizhanova und Kopp 2009). Das Iodid wird hierbei oxidiert und an Tyrosylreste des im Kolloid an der apikalen Membran extrazellulär lokalisierten Thyreoglobulins (Tg) gebunden (Carrasco 1993). Thyreoglobulin ist das Synthese- und Speicherprotein der Schilddrüsenhormone (Gärtner und Reincke 2006). Werden Schilddrüsenhormone benötigt, signa-

lisiert durch einen TSH-Anstieg, wird das Thyreoglobulin in die Follikel­epithel­zelle auf­ge­nommen und die Hormone her­aus­hydro­ly­siert (Spitzweg und Morris 2002, Kogai et al. 2006). D. h. also, dass ein TSH-Anstieg signalisiert, dass vermehrt Schilddrüsenhormone benötigt werden. Der TSH-Rezeptor sitzt basolateral in den Follikel­epithel­zellen (Carrasco 1993). TSH-abhängig kommt es folglich zur Pinozytose des iodhaltigen Thyreoglobulins aus dem Kolloid (Gärtner und Reincke 2006).

Das im Schilddrüsen­follikel gebildete Prohormon L-Tetraiodthyronin, auch Thyroxin (L-T₄, stark verkürzt: T₄), und das stoffwech­sel­aktive 3,3',5-Triiodthyronin (L-T₃, stark verkürzt: T₃) werden demnach bedarfsabhängig sezerniert (Carrasco 1993, Gärtner und Reincke 2006, Gärtner 2009). Das Verhältnis beträgt etwa 10:1 (Gärtner und Reincke 2006). Triiodthyronin und Thyroxin sind die einzigen iodhaltigen Hormone bei Vertebraten (de la Vieja et al 2000).

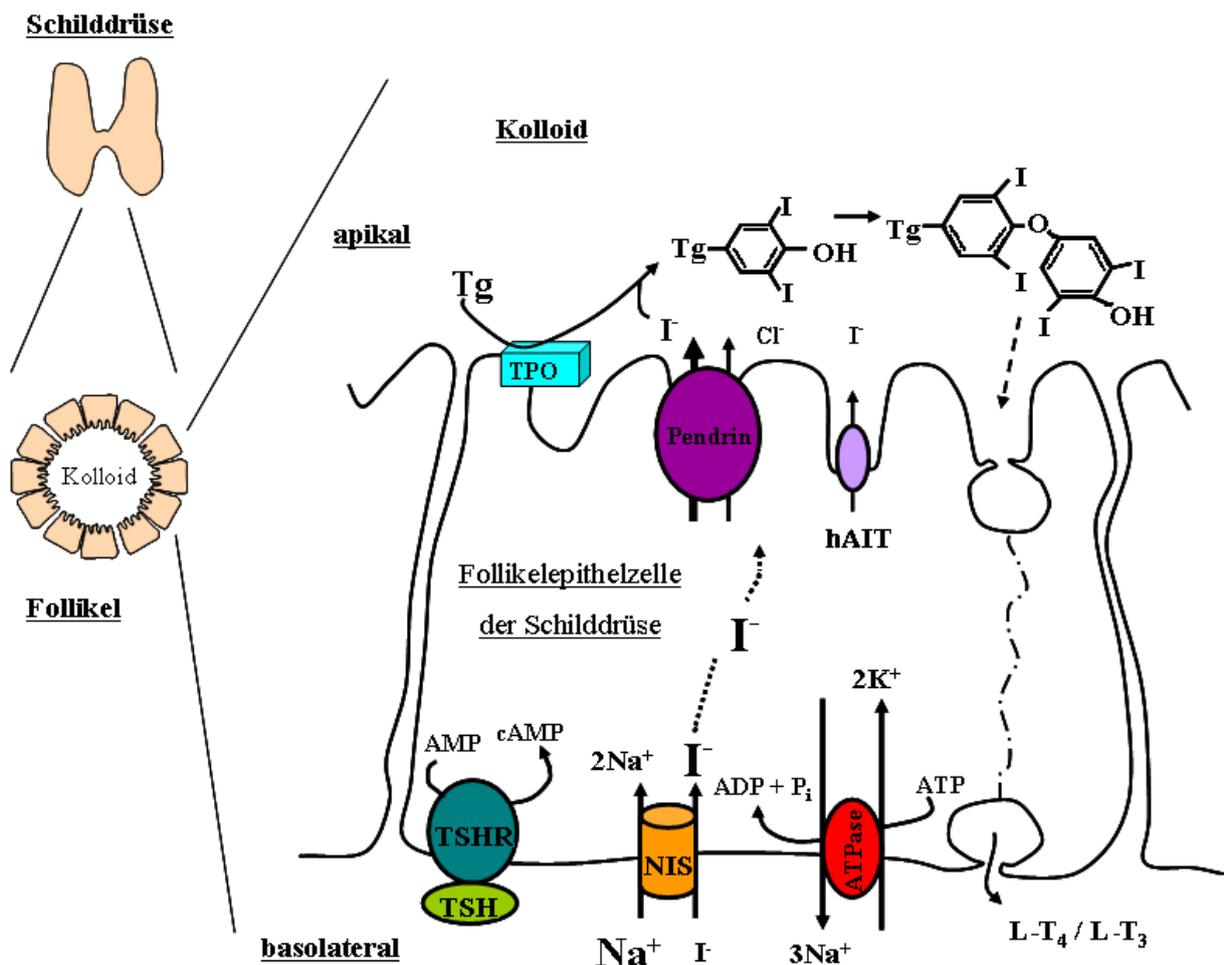


Abb. 3: Schematische Darstellung des Iodtransports in der Schilddrüse (modifiziert nach Dohán und Carrasco 2003 und Kogai et al. 2006).

Ein Follikel in der Schilddrüse besteht aus den Schilddrüsen­epithel­zellen, die das Kolloid in ihrer Mitte umgeben. Zunächst wird das Iodid durch hNIS in die Zelle gepumpt, wo es schnell nach apikal gelangt. Pendrin und der hAIT schleusen es ins Kolloid. Hier erfolgt die Organifizierung und Speicherung. Die gestrichelt-gepunktete Linie deutet die Pinozytose, phagolysosomale Hydrolyse und Sekretion der Schilddrüsenhormone an. TSH-Rezeptor (TSHR).

Die durch NIS vermittelte Akkumulation von Iod in der Schilddrüse bildet die Grundlage für Diagnostik, Bildgebung und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen und hat damit eine Schlüsselfunktion (Filetti et al. 1999, Kogai et al. 2006). Als Beispiele wären Schilddrüsenszintigraphie sowie Radioiodtherapie bei Hyperthyreoidismus und einigen Schilddrüsentumoren zu nennen (Kogai et al. 2006, Ahn 2012).

Die Therapie von Tumoren mit radioaktiven Nukliden beruht auf deren physikalischen Eigenschaften und ist effektiv mit minimalen Komplikationen, wie z. B. Strahlenschäden, in Bezug auf umliegendes Gewebe (Daniels und Haber 2000). Das bedeutet, dass man in Abhängigkeit von den eingesetzten Nukliden Gewebe z. B. nur darstellen kann. Man kann es aber auch mittels Strahlentherapie zerstören (Kogai et al. 2006).

In der Therapie von Schilddrüsentumoren wurde 1941 damit begonnen und nach Ende des Zweiten Weltkrieges und der Forschung an Atomenergie wurde dieses Verfahren weltweit verfügbar (Daniels und Haber 2000). Dies war u. a. die Geburt der Nuklearmedizin (Sawin und Becker 1997 sowie Becker und Sawin 1996, Daniels und Haber 2000). 1941 kamen folglich erstmals gezielt Radioiodisotope in der Therapie von Schilddrüsenerkrankungen zum Einsatz. Zunächst wurde vor allem die Hyperthyreose auf diese Weise behandelt (Sawin und Becker 1997 sowie Becker und Sawin 1996). Im Verlauf wurde dann auch schnell damit begonnen, Schilddrüsentumoren mit Radioiod zu therapieren (Sawin und Becker 1997 sowie Becker und Sawin 1996).

Das funktionell exprimierte hNIS-Protein ist die Grundvoraussetzung der effizienten Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen und ihrer Metastasen mittels Radioiodtherapie (Dohán und Carrasco 2003). Daher eröffnete die Klonierung und die darauffolgende Erforschung des Transportproteins die Möglichkeit dieses Prinzip auch durch die Nutzung von NIS als therapeutisches Gen auf thyreoidale Tumoren und extrathyreoidales Gewebe zu erweitern (Spitzweg und Morris 2002).

Es gibt bereits eine Reihe präklinischer Studien, in denen der hNIS in verschiedene Tumorzellen integriert wurde (s. im Nachfolgenden). Dies machte es möglich, gezielt auch diese Tumoren darzustellen bzw. mit radioaktiven Nukliden zu zerstören.

Lee et al. (2003) nahmen einen viralen Vektor für die Forschung an Schilddrüsentumoren. Spitzweg et al. (2007) verwendeten einen adenoviralen Vektor (CEA-Promoter) zur erfolgreichen Tumorwachstumsreduktion beim medullären Schilddrüsenkarzinom durch Applikation von 111 MBq (3 mCi) ^{131}I .

Dwyer et al. nutzten adenovirale Vektoren mit einem MUC1-Promoter um NIS in Mamma-, Ovarial- und Pankreaskarzinome zu integrieren und Xenografttumoren in Nacktmausmodellen zur Bildgebung und Therapie zu erforschen, wobei es zu einer bis zu 43-fach erhöhten Radio-nuklidaufnahme sowie zu einer Tumolvolumenreduktion von bis zu 83 % ($p < 0,01$; 50 % Reduktion mit $p < 0,0001$) nach Applikation von 3 mCi (111MBq) ^{131}I kam (Dwyer et al. 2005, 2006 a und b, 2011). Mesenchymale Stammzellen wurden ebenfalls 2011 von Knoop et al. (2011) benutzt. Kakinuma et al. (2003) verwendeten ein virales NIS-Vektorsystem zur Infektion von Prostatazellen mit einer tumorspezifischen NIS-Expression. Klutz et al. (2009) nutzten ein nicht-virales System (synthetischer, polymerer Vektor, biologisch abbaubar) zur Therapie eines Neuroblastoms (247 mGy / MBq ^{131}I absorbierte Dosis des Tumors) und in Kombination mit EGF zur Lebertumorthherapie (Klutz et al. 2011a). Kürzlich konnten Oneal et al. (2012) durch eine Weiterentwicklung ihrer viralen NIS-Vektoren nachweisen, dass die ^{131}I -Aufnahme durch infizierte Prostatakarzinomzellen (LNCaP) und damit die mögliche Therapie sowie Zytolyse auch bei noch niedriger Virusreplikation zügiger erfolgte, was einer qualitativen Verbesserung der viralen Vektoren hinsichtlich der NIS-Expression entspricht. Allerdings zeigen ihre Ergebnisse, dass der Benefit im Überleben nicht statistisch signifikant durch die Radiovirotherapie im Vergleich zur alleinigen Virotherapie erhöht werden konnte (Oneal et al. 2012). Sie weisen aber auch daraufhin, dass stetige Verbesserung möglich erscheint. Haberkorn (2001) hatte mit einem retroviralen Vektor und u. a. DIDS versucht, Leberkarzinomzellen mittels Radioiod zu therapieren und erhielt *in vitro* eine statistisch signifikante Iodidakkumulation, allerdings auch einen raschen Iodidausstrom *in vitro* und *in vivo*. Grünwald et al. (2012) konnten vor Kurzem einen statistisch signifikanten therapeutischen Effekt bei der Radiovirotherapie von Leberkarzinomzellen und Hutzen et al. (2012) einen Überlebensvorteil bei Medulloblastom-xenografttumoren durch Radioiodtherapie (Masernvirus und NIS) zeigen. Li et al. (2011) konnten mit zwei viralen Systemen (NIS und TPO, hTERT-Promoter) zeigen, dass der Zusatz von TPO nicht zu einem verstärkten Effekt von der Radionuklidtherapie führte und Riesco-Eizaguirre et al. (2011) untersuchten eine ganze Reihe an Zelltypen (u. a. auch HT29; hTERT vs. hTR -Promoter) und fanden eine signifikante Tumorwachstumshemmung nach einmaliger Gabe von 1 mCi ^{131}I . Rajewski et al. (2012) nutzten kürzlich einen onkolytischen Adenovirus (hTERT-Promoter) zur ^{131}I -Therapie (37 MBq) und -überwachung mittels SPECT / CT von infizierten Prostatakarzinomzellen und zeigten eine Anti-Tumoraktivität sowie eine Lebenszeitverlängerung der Versuchstiere. Das Überleben der Versuchstiere war dabei gleich,

egal ob ^{131}I -Therapie ($n = 12$) oder nur Onkolyse durch den Virus eingesetzt wurde, wobei die mögliche SPECT / CT -Überwachung abhängig von der vorhandenen Tumormasse war (Rajcecki et al. 2012). Diese Versuche demonstrieren das hohe Potential der viralen Vektoren in der extrathyreoidalen onkologischen NIS-Forschung.

Man geht inzwischen davon aus, dass der hNIS in einigen Schilddrüsentumoren zwar exprimiert wird, aber vor allem auch intrazellulär vorliegt und damit seine Funktion einbüßt (Dayem et al. 2008).

Die derzeit vorhandenen aktuellen Strategien der Gentherapie in der Behandlung fortgeschrittener follikulärer und medullärer Schilddrüsenkarzinome beinhalten korrektive, zytoreduktive und immunmodulatorische Gentherapie und zeigen sich präklinisch als sehr effektiv (Spitzweg und Morris 2004). Allerdings ist der klinisch erfolgreiche Einsatz der Vektorsysteme durch einen noch vorhandenen Mangel an Sicherheit und Effektivität (first pass Effekt in der Leber, Toxizität des Vektors, Neutralisation des Vektors durch das Immunsystem, schlechte Gewebegängigkeit / geringe Infektiosität des Vektors) limitiert (Spitzweg und Morris 2004).

1.3 Retinoide

Die Retinsäure ist ein biologisch aktiver Metabolit von Vitamin A (vgl. **Abb. 4**) und spielt eine wichtige Rolle in der Morphogenese, Differenzierung und Proliferation vieler Zelltypen (Riesco-Eizaguirre und Santisteban 2006, Ella und Short 2009, Carratù et al. 2012). Die Substanz hat Differenzierungs-induzierende Eigenschaften (Spitzweg und Morris 2002, Boelaert und Franklyn 2003). Wenn überhaupt, gibt es nur einen kleinen wissenschaftlich belegten Hinweis darauf, dass Vitamin A -Aufnahme eine karzinoprotektive Wirkung hat (Vainio und Rautalahti 1999). Retinoide sind bereits seit längerem mit bekannten, gut dokumentierten Nebenwirkungen wie Trockenheit von Haut und Schleimhäuten, Teratogenität und chemischer Hepatitis im klinischen Einsatz, u. a. in der dermatologischen Therapie der Psoriasis (Ella und Short 2009).

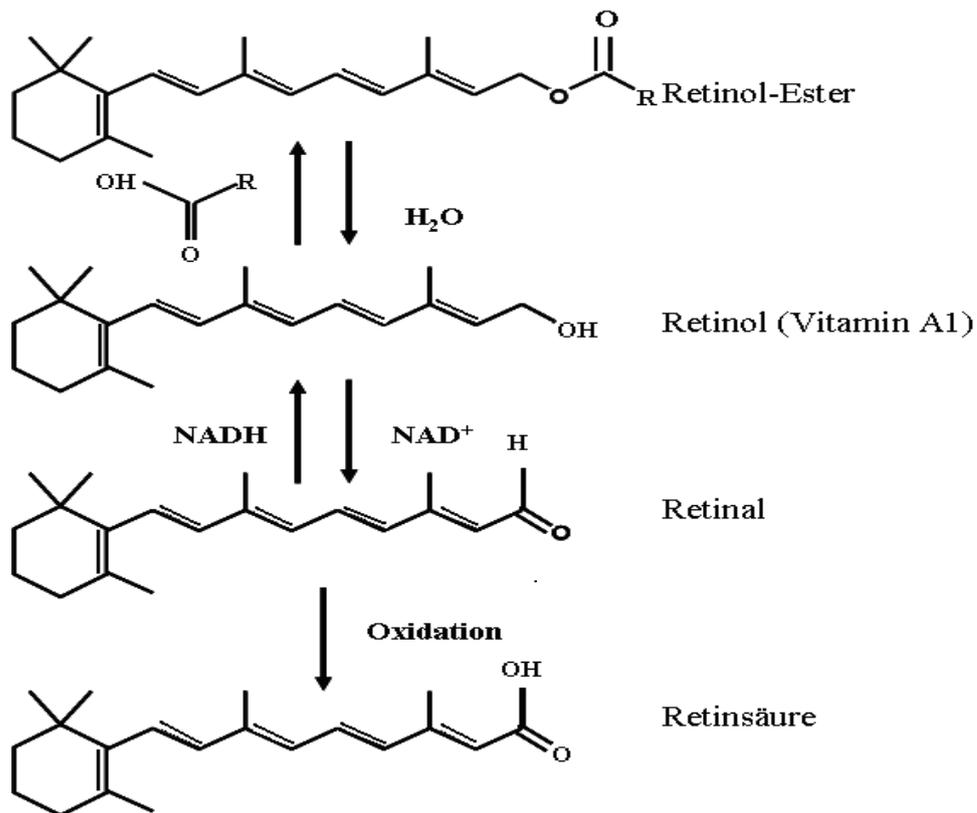


Abb. 4: Schematische Darstellung der chemischen Formel der Retinoide.

Die natürlich vorkommenden Derivate von Vitamin A sind all-trans Retinsäure, 9-cis- und 13-cis Retinsäure (Short et al. 2004, Ella und Short 2009) (vgl. **Abb. 5**).

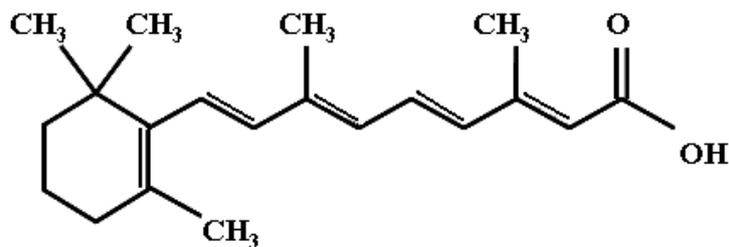


Abb. 5: Chemische Formel all-trans Retinsäure (tRA; Bezugsquelle sigmaaldrich).

Es gibt verschiedene Retinoid-Rezeptoren, RARs und RXRs, die zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren gehören, welche als ligandenbindende Transkriptionsfaktoren fungieren und somit direkt auf Gene wirken (Simon et al. 2002, Carratù et al. 2012).

Es konnte gezeigt werden, dass Retinsäure zur (Re-) Differenzierung von Zellen führen kann und damit unter Umständen eine NIS-Expression induziert (Ella und Short 2009).

Differenzierte Schilddrüsentumoren werden mittels Chirurgie, Radioiodtherapie und thyreostatischer Therapie seit langem erfolgreich behandelt (Ahn 2012). Für die bis zu 30 % der un-

differenzierten Schilddrüsentumoren stellt mittlerweile die Therapie mit Retinsäure eine Möglichkeit dar (Schmutzler und Köhrle 2000), diese Tumoren ebenfalls in dieses Behandlungsschema einzugliedern.

Es konnte gezeigt werden, dass humane follikuläre Schilddrüsenkarzinomzelllinien durch RA-Stimulation hNIS mRNA exprimieren (Schmutzler 2001). Auch bei Patienten / -innen konnte nach RA-Applikation eine vermehrte Radionuklidaufnahme festgestellt werden (Schmutzler et al. 2002). In einer klinischen Studie an 20 Patienten mit fortgeschrittenem Schilddrüsenkarzinom, die mit 13-cis-Retinsäure behandelt wurden, zeigte sich in 50 % der Fälle eine Reinduzierung der Iodidaufnahme (Simon et al. 1998).

Seit etwa Mitte der 1990er Jahre wird Retinsäure auch zur Therapie anderer Karzinome eingesetzt, z. B. bei Leukämien, genauer der AML und APL (Scheinberg 1995, Evans und Kaye 1999, Kogai et al. 2006, Carratù et al. 2012).

Kogai et al. (2000) konnten zeigen, dass tRA sowohl die NIS-Genexpression als auch die Iodakkumulation (Faktor 15-fach mehr Radioaktivität) bei MCF-7 -Zellen, einer Brustkrebszelllinie, *in vitro* induziert. Zudem konnte eine selektive Zytotoxizität durch ^{131}I bei mit tRA stimulierten MCF-7 -Zellen nachgewiesen werden. Die Brustkrebszellen von MCF-7 stammen von einem durch Brustkrebs induzierten Pleuraerguss von 1970. Es handelte sich um ein metastasiertes Mammaadenokarzinom nach Hormon- und Strahlentherapie (Soule et al. 1973, DSMZ online, Stand 04.12. 2012 16:42). Die Zelllinie weist eine hohe Hormonrezeptordichte auf und wird deswegen häufig in der Brustkrebsforschung eingesetzt. Bereits 1980 verwendeten Kadish et al. (1980) MeWo und MCF-7 -Zellen.

Die tRA-stimulierte NIS-Induktion konnte auch für weitere Brustkrebszelllinien sowie für PSA-Promoter-gesteuerte NIS-Genexpression in Prostatazellen (Kogai et al. 2004, Spitzweg et al. 2003) demonstriert werden.

1. 4 hNIS-Expression in extrathyroidalem Gewebe

Der humane Natrium-Iodid-Symporter wird im Organismus physiologisch nicht allein in der Schilddrüse exprimiert. Zum Beispiel konnten Tazebay et al. (2000) zeigen, dass hNIS endogen in der Brustdrüse und humanem Brustkrebs exprimiert wird. Sowohl bei der laktierenden Brustdrüse als auch bei einigen Brustkrebsarten kommt es sogar zur funktionellen Expression des Transportproteins (Tazebay et al. 2000, Cho et al. 2000, Perron

et al. 2001). In der laktierenden Brust ist die Iodanreicherung durch Aufnahme und Speicherung von Iodid wichtig für die Iodversorgung des Säuglings via Muttermilch und damit für die natürliche Prophylaxe von Iodmangelerscheinungen beim Säugling (Kretinismusprophylaxe) durch eine ausreichende Iodidversorgung (Carrasco 1993, Rillema und Hill 2003). Die Induktion der NIS-Expression erfolgt im Brustgewebe durch Oxytocin, verstärkt durch Prolaktin und Östrogen (Daniels und Haber 2000, Boelaert und Franklyn 2003). Im Vergleich zur Plasmakonzentration wird Iod in der Milch zwischen sechs- und 15-fach angereichert (Tazebay et al. 2000, Cho et al. 2000, Kogai et al. 2004).

In der Schilddrüse ist das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) der wichtigste Regulator der Iodaufnahme (Carrasco 1993). Es stimuliert die Iodidaufnahme und die hNIS-Expression (Kogai et al. 1997, Saito et al. 1997, Ohno et al. 1999, Taki et al. 2002). In anderen NIS-exprimierenden Geweben hat TSH allerdings keinen Einfluss auf die Expression (Dohán et al. 2003).

2000 konnten Kogai et al. (2000) zeigen, dass der RAR-Ligand all-trans Retinsäure (tRA) in der Östrogen-Rezeptor-positiven humanen Brustkrebstumorzelllinie MCF-7 die Genexpression von hNIS stimuliert. Auch andere Retinoide induzieren hNIS in diesen Zellen (Tanosaki et al. 2003).

Tazebay et al. (2000) konnten immunhistochemisch zeigen, dass über 80 % der humanen Brustkrebsarten eine endogene NIS-Proteinexpression aufweisen. Mittels RT-PCR konnten bei sechs von sieben humanen Brustkrebsgeweben NIS mRNA nachgewiesen werden (Moon et al. 2001). Von diesen sechs konnte allerdings nur einer mittels ^{99m}Tc -Szintigraphie dargestellt werden. Die anderen nahmen den Tracer nicht auf. Der einzelne Tumor hatte eine sehr hohe NIS-Expression, die anderen fünf lediglich eine moderate.

Daher wurde die NIS-Expression auch in Brustkrebsarten als potentielles Therapeutikum avisiert (Tazebay et al. 2000, Daniels und Haber 2000, Welch und Mankoff 2000), obwohl die Iodkonzentration signifikant geringer ist als bei der Schilddrüse (Kilbane et al. 2000).

Seit der Klonierung des NIS ist es das Ziel aktueller Forschung das Transportprotein auch für die Diagnostik und Therapie extrathyreoidaler Erkrankungen einsetzbar zu machen.

Die Transfektion von rNIS cDNA *in vitro* gelang bei Ovarial-, Melanom-, Kolon- und Lebertumorzelllinien und machte diese für eine ^{131}I -Therapie zugänglich (Mandell et al. 1999). Ein hNIS-Gentransfer gelang in der Folge bei mehreren Tumorentitäten, u. a.: Prostatakarzinom (Spitzweg et al. 1999a, b), Gliom (Cho et al., 2000) und Myelom (Dingli et al., 2003).

Die NIS-Gentherapie wurde in mehreren Tiermodellen untersucht (Spitzweg et al. 2000, Nakamoto et al. 2000, Spitzweg et al. 2001b, Cho et al. 2002, Dohán et al. 2003, Dingli et al., 2003). Spitzweg et al. konnten z. B. mittels PSA-Promotersteuerung eine NIS-Expression in humanen Prostataadenokarzinomzellen induzieren (Spitzweg et al. 1999a). Diese führte trotz fehlender Iodorganifizierung zu einem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikanten therapeutischen Effekt des eingesetzten ^{131}I (Spitzweg et al. 1999a, 2000, 2001b). In dem Prostata-Maus-Modell, das zur NIS-Expression modifiziert war, konnte eine Tumolvolumenreduktion von mehr als 84 % nach einer ^{131}I -Bolusinjektion herbeigeführt werden (Spitzweg et al. 2001b). Cho et al. (2002) konnten Xenografttumoren retroviral infizierter Gliomzellen (F98-Zellen) mittels $^{99}\text{mTcO}_4$ und ^{123}I szintigraphisch darstellen, signifikante Mengen an ^{123}I 24 h nach Injektion nachweisen und eine längere Überlebenszeit nach ^{131}I -Therapie (insgesamt 12 mCi appliziert) der NIS-exprimierenden Tiere nachweisen sowie die Radioiodaufnahme der Schilddrüse der Versuchstiere durch Thyroxin-Diät reduzieren. Dingli et al. (2003) behandelten Myelomxenograftversuchstiere (verschiedene Anzahlen von radioiodidtransportierenden, NIS-transduzierten und nicht-transduzierten Tumorzellen) und die Tumoren mit 50-100% NIS-Expression zeigten zwei Wochen nach einer einzigen (1 mCi) ^{131}I -Gabe einen kompletten Tumorregress.

Mehrere Studien haben aufgezeigt, dass NIS-Genstransfer durch virale und nonvirale Vektoren in einer Vielzahl von Zellen bei diesen zu einer erhöhten Iodaufnahme führt und sie empfindlich für z. B. eine *in vitro* ^{131}I -Therapie machen (Kogai et al. 2006, Riesco -Eizaguirre et al. 2006, Carvalho und Ferreira 2007). Auch Tumortiermodelle mit ektopter NIS-Expression haben das Potential einer tumorspezifischen NIS-Gentherapie mit Radioiodtherapie als eine vielversprechende Möglichkeit vor allem für Tumoren mit eher schlechter Prognose aufzeigen können (Pankreas, Chen et al. 2007; Leber, Hervé et al. 2008). Allerdings war hier die Iodakkumulation gering, da es wegen der mangelnden Organifizierung schnell wieder ausströmte. Eine Möglichkeit die Retentionszeit des Iods zu verlängern, ist die pharmakologische Modulation mittels kleiner organischer Moleküle (Lecat-Guillet und Ambroise 2009). Nach der Arbeit von Wapnir et al. (2003) und Tazebay et al. (2000) wird bei Brustkrebs davon ausgegangen, dass auch hier hNIS exprimiert wird, aber durch fehlerhaften Transport nicht in die apikale Membran eingebaut wird und somit keine oder nur eine geringe Transportkapazität aufweist. Dies bedeutet, dass weniger Iodid transportiert wird und somit auch weniger Radioaktivität in die jeweilige Zelle gelangt. Den Umstand, dass zwar eine Ex-

pression vorliegt, diese aber nicht in einem funktionellen Protein mündet, versucht man u. a. pharmakologisch zu beeinflussen.

Eine Kombination aus Retinsäure und Dexamethason induziert eine signifikante Iodakkumulation in Brustkrebsxenotransplantaten (MCF-7) durch eine funktionelle NIS-Expression (Willhauck et al. 2008b, Kogai et al. 2005). Eine weitere Kombination mit Carbamazepin erhöht ferner die Toxizität von ^{131}I (Willhauck et al. 2011) in den Tumorzellen. Das Nukleosidanalogen 5-Azacytadin ist z. B. in der Lage bei dedifferenzierten Schilddrüsentumoren die NIS mRNA-Expression und damit die Iodaufnahme wiederherzustellen (Venkataraman et al. 1999). DIDS führt zu einer signifikanten Reduktion des Iodausstroms aus Schilddrüsentumorzellen (Elisei et al. 2006, Lindencrona et al. 2007).

Aber keine dieser Substanzen konnte in klinischen Studien zu einer Steigerung der Radioiodidaufnahme beim Menschen führen (Kogai et al. 2006).

Interessant ist ebenfalls die Nutzung des hNIS als Bildgebungsmarker in Tumorthapieversuchen mit gezielter viraler Infektion von Tumorzellen oder z. B. in der Überwachung / der Kontrolle transplantierten Gewebes wie des Herzens (bei Ratten; Ricci et al. 2008).

2011 hatten z. B. Haddad et al. (2011) demonstrieren können, dass der Einsatz und Einbau von NIS-DNA ihr virales System nicht dazu führt, dass dieses virale System in seinen Eigenschaften (Replikationsfähigkeit und Onkolyse) negativ beeinflusst wird und sodass es für weitere Forschung zur Bildgebung und Therapie extrathyreoidaler Tumoren geeignet erscheint. 2012 konnten sie mit einem viralen NIS-Vektor via ^{124}I -PET und $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Szintigraphie eine zeitabhängige intratumorale Radionuklid Aufnahme von Pankreaszellen (PANC-1) mit einem Maximum 24 h nach Injektion feststellen ($p < 0,05$) sowie die Tatsache, dass die Virusreplikation auch noch 8 h nach Injektion der Radioaktivität nachgewiesen werden konnte, wobei das verwendete System eine hohe Sicherheit zu gewährleisten schien (Haddad et al. 2012).

Virale NIS-Systeme haben in der vorbeschriebenen Literatur derart positive Ergebnisse erzielt, dass derzeit Phase I und II -Studien laufen (Haddad et al. 2012).

1. 5 Iod und Radionuklide in der Medizin

1811 wurde Iod von Courtois zufällig bei der Schießpulverherstellung entdeckt und seit 1820 zur Kropftherapie verwendet (Silberstein 2012). Bereits 1896 hatte Baumann (1896) beobachtet, dass Iod in der Schilddrüse angereichert ist bzw. gespeichert wird und gab somit der Iodbehandlung des Kropfes eine wissenschaftliche Grundlage. 1915 konnten Marine und Feiss (1915) nachweisen, dass es durch Kaliumiodidperfusion zu einer Iodanreicherung in der Schilddrüse kommt.

1935 hatte Fermi durch Neutronenbeschuss von stabilem Iod das erste radioaktive Iodnuklid hergestellt (Beierwaltes 1979). 1938 produzierten Hertz et al. ^{128}I und 1942 gab es den ersten Fallbericht über Metastasen eines Schilddrüsentumors, die mittels Radioiod und Geiger-Zähler sowie Autoradiograph detektiert wurden (Beierwaltes 1979). In den 1940er Jahren wurde ^{131}I klinisch-therapeutisch verwendet und in den 1970er Jahren war der Einsatz von ^{131}I schon relativ weit verbreitet und es erschienen mehrere klinische Fallberichte zur Nutzung (Werner et al 1949, Fernandez-Ulloa et al. 1976). Seither wird Iod zur Therapie von benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen eingesetzt und heutzutage werden z. B. sowohl das papilläre, als auch das follikulär-differenzierte Schilddrüsenkarzinom sowie die Hyperthyreose und autonome Adenome in der Klinik mit ^{131}I behandelt (Spitzweg und Morris 2004, Ahn 2012).

Das Radioisotop ^{123}I hat eine Halbwertszeit von 13 h, gibt γ -Strahlung (low dose) ab und ist somit optimal für die Schilddrüsenbildgebung (Daniels und Haber 2000, Gärtner 2009, Ahn 2012). Das Isotop ^{131}I ist vor allem ein β -Strahler (etwa 97 % β - und 3 % γ - Strahler) mit einer Halbwertszeit von acht Tagen und kann große Strahlungsmengen in Tumorgewebe mit geringem Schaden des umgebenden Gewebes abgeben (Daniels und Haber 2000, Gärtner 2009, Ahn 2012). Es wird vor allem bei benigner Hyperthyreose sowie für lokal-invasive als auch metastasierte Schilddrüsentumoren eingesetzt (Daniels und Haber 2000, Spitzweg und Morris 2002, Dohán und Carrasco 2003, Gärtner 2009).

^{124}I ist das einzige längerlebige Radioiodisotop (HWZ: 4,2 d), das Positronen emittiert (511, 603, 723 und 1690 keV) und damit für die moderne PET / CT -Diagnostik zugänglich ist (Ahn 2012, Silberstein 2012).

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ (HWZ: sechs Stunden, 140 keV) wird klinisch vor allem zur nuklearmedizinischen Darstellung der Knotenstruma eingesetzt, um heiße und kalten Knoten differenzieren zu

können (Ahn 2012). Das „m“ steht für metastabil. Bereits 1965 wurde ^{99m}Tc für die Tumorbildgebung verwendet (Bolliger et al. 1965).

Nachteile der Szintigraphie im Allgemeinen, also auch bei der Nutzung anderer Nuklide, sind die Zweidimensionalität und die relativ schlechte Auflösung (Silberstein 2012). Die moderne Nutzung und Kombination aus ^{123}I und ^{131}I mit SPECT / CT oder von ^{124}I und ^{131}I mit PET / CT haben zu der Erkenntnis geführt, dass planare Techniken (Schilddrüsenszintigraphie) nicht immer adäquat in der korrekten Lokalisation von iodidkonzentrierendem Gewebe sind und deswegen für moderne Staginguntersuchungen und die Entscheidungsfindungen, wie viel ^{131}I therapeutisch eingesetzt werden sollte, nachteilig sind (Silberstein 2012).

^{131}I , $^{188}\text{Rhenium}$ (^{188}Re), ^{186}Re und $^{211}\text{Astatin}$ (^{211}At) werden aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften für die Radionuklidtherapie (Strahlentherapie) eingesetzt (Willhauck et al. 2008a, Ahn 2012).

Inzwischen ist die Forschung so weit vorangeschritten, dass NIS-assoziierte Radiotracer als Reportersystem für die extrathyreoidale Bildgebungs-Genexpression in klinischen Settings der Tumortheraieforschung eingesetzt werden. Nukleare Bildgebungsarten wie PET und SPECT geben die Möglichkeit einer dreidimensionalen Darstellung der Verteilung des Radiopharmakons und haben eine hohe Sensitivität und Auflösung bei guter Gewebeeindringtiefe (Ahn 2012).

1. 6 Tumorerkrankungen

Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind folgende Informationen von der Homepage des Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert Koch Instituts (RKI) entnommen (Stand 22.08.2013). Nach den Herz-Kreislauf-erkrankungen sind Tumorerkrankungen in Deutschland mit etwa 25 % aller Todesfälle (2009: ca. 216.000) die zweithäufigste Todesursache. Im Jahr 2008 lag die Zahl der Krebsneuerkrankungen bei rund 470.000. Das mittlere Erkrankungsalter liegt dabei in Deutschland bei Frauen und Männern bei 69 Jahren. Das mittlere Sterbealter liegt bei Frauen bei 76, bei Männern bei 73 Jahren. Statistisch erkrankt jeder zweite Mann und 43 % aller Frauen im Laufe des Lebens an Krebs. Jeder vierte Mann und jede fünfte Frau stirbt in Deutschland an Krebs (Haberland et al. 2010). 2009 waren es 1,24 Millionen Menschen in der Europäischen Union (Kraywinkel et al. 2012). Insgesamt lebt im Moment ein Anteil von ca. 1,6 % der Gesamtbevölkerung in Deutschland mit einer Krebserkrankung,

die innerhalb der letzten fünf Jahre diagnostiziert wurde (Bertz et al. 2010). In den kommenden Jahren ist allein wegen der demographischen Entwicklung mit einem Anstieg der Zahlen zu rechnen (Wolf et al. 2011). Brustkrebs bzw. das Prostatakarzinom sind die häufigsten Tumorentitäten. Im Folgenden sind noch weitere Informationen zu den in dieser Arbeit verwendeten Tumorentitäten sowie zum Schilddrüsenkarzinom wiedergegeben.

Mammakarzinom

Mit einer Inzidenz von ca. 72.000 / a ist das Mammakarzinom in Deutschland mit Abstand die häufigste tumoröse Erkrankung bei Frauen, wobei das Erkrankungsalter relativ niedrig im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen ist. Etwa 50 % der Patientinnen sind bei Diagnosestellung jünger als 65 Jahre.

Kolonkarzinom

2008 betrug die Inzidenz rund 65.000 diagnostizierte Neuerkrankungen in Deutschland und ist damit die zweithäufigste Tumorerkrankung. Diese Tumorerkrankung hat eine mittlere Prognose. Fünf Jahre nach Diagnosestellung leben noch etwa 50 % der Patienten.

Pankreaskarzinom

Es ist in Deutschland eine der zehn häufigsten Tumorarten und im Jahr 2008 betrug die Inzidenz 15.000 diagnostizierte Neuerkrankungen. U. a. aufgrund der späten Diagnosestellung hat es eine ungünstige Prognose mit einer fünf-Jahres-Überlebensrate von unter 10 % und ist sowohl bei Frauen als auch bei Männern die vierthäufigste Krebstodesursache (7,5 % und 6,3 %).

Malignes Melanom

Die Inzidenz betrug, mit einem beinahe ausgewogenen Geschlechterverhältnis, im Jahr 2008 etwa 18.000 diagnostizierte Neuerkrankungen in Deutschland und gehört damit ebenfalls zu den zehn häufigsten Tumorerkrankungen hierzulande. Die UV-Strahlungsexposition, vor allem im Kinder- und Jugendalter, ist der bedeutendste exogene Risikofaktor. Viele Melanome entstehen auf der Grundlage von Nävi, aber über 50 % treten auf vorher unauffälliger Haut auf.

Schilddrüsenkarzinom

Die Schilddrüsenkarzinome gehören zu den häufigsten 20 Tumorerkrankungen in Deutschland. Bei Frauen machen sie 1,9 %, bei Männern unter 1,5 % aller Tumorerkrankungen aus. Seit der Jahrtausendwende beträgt die Inzidenz in Deutschland pro Jahr etwa 3.500 diagnostizierte Neuerkrankungen bei Frauen und 1.500 bei Männern, wobei die meisten von ihnen noch vor dem 60. Lebensjahr erkranken. Die fünf-Jahres-Überlebensrate beträgt aufgrund der guten Therapiemöglichkeiten im Moment bei Frauen 90 %, bei Männern 87 %. Allerdings finden sich deutliche Unterschiede bei den einzelnen histopathologischen Entitäten.

2. Material und Methoden

2. 1 Chemikalien

Agarose (SeaKem® LE Agarose)	Lonza
all-trans Retinsäure (tRA)	Sigma
Ampicillin	Gibco
0,5 % Trypsin–EDTA	Gibco
100 E / ml Penicillin	Gibco
100 µg / ml Streptomycin	Gibco
BSA	PAA
Casein purified powder	Sigma
Cell dissociation buffer (cdb)	Gibco
DIDS	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$)	Merck
Dulbecco's PBS (DPBS, ohne CaCl_2 und MgCl_2)	Gibco
Ethidiumbromid	Promega
Ethanol pro Analyti	Merck
Fetal Bovine Serum	Gibco
FuGENE® 6 Transfection Reagent	ROCHE
HBSS	Gibco
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid)	Sigma
Kaliumperchlorat (KClO_4)	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Paraformaldehyd (PFA)	Merck
Penicillin	Gibco
Restriktionsenzym EcoR1	Biolabs
Restriktionsenzym BamH1	Biolabs

Restriktionspuffer 3	Biolabs
RPMI-1640 Medium	Gibco
Vectashield DAPI mounting medium	Vector Laboratories
Salzsäure (HCl) 2N	Merck
Streptomycin	Gibco
TEMED	BioRad
Triton-X	Sigma
Trizma Base	Sigma
Trypan blue	Sigma
Zeocin	invitrogen

2. 2 Puffer und Lösungen

HBSS-Puffer [->Iodidaufnahme]	enthält zusätzlich: 10 ml 0,5 M HEPES (in Aqua dest.; das sind 4,77 g in 40 ml) + 0,5 % BSA (das sind 2,5 g) eingestellt auf pH7,3
Elektrophoresepuffer:	10 x TBE Buffer (Gibco)
Paraformaldehyd (PFA) 4 %	4 g Paraformaldehyd, 30 ml Aqua dest., 50 ml 0,2 M Phosphatpuffer, 1 N NaOH ad 100 ml Aqua dest.
0,2 M Phosphatpuffer	28,42 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 2,76 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ad 1 l Aqua dest., pH 7,2 – 7,4
Radioaktiv-Effluxversuch-Lysepuffer:	1 l H_2O + 0,1 M NaOH + 0,1 % SDS + 2 % Na_2CO_3
S.O.C. Medium	invitrogen
TBST:	TBS und 0,1 % Tween 20
Tris Buffered Saline (TBS)	30,29 g Trizma Base, 43,54 g NaCl und 100 ml HCl 2 N ad 5 l Aqua dest., pH 7,6
Trypsin	Gibco
WB-Lysepuffer:	0,15 M NaCl + 5 mM EDTA, pH 8.0 + 1 % (w/v) Triton X-100 + 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 10 %

	Glycerol - vor Benutzung ad: 1:1000 5 M
	Dithiothreitol (DTT)
WB-Transferpuffer:	5,82 g Tris (Trisma Base) + 2,93 g Glycin in Aqua dest. lösen + 200 ml Methanol + mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen
Laufpuffer:10xRB (running buffer)	BioRad

2. 3 Medien

Einfrier-Medium:	50 % RPMI-1640 (Gibco) + 42,5 % FCS + 7,5 % DMSO steril- filtriert mit 0,2 µm
Kulturmedium:	500 ml RPMI-1640 (Gibco) zusätzlich mit 10 % hitzeinaktivier- tem fetalen Kälberserum (FCS) sowie 1 % Pen / Strep (100 U / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin) versetzt
TUM (für PaCa 5061):	500 ml RPMI 1640 / Glutamax Lösung (Gibco) + 10 % hitze- inaktiviertem FCS + 5 ml FGF + 5 ml EGF + 2,5ml Transferrin + 5 ml Insulin + 5 ml Pen / Strep (100 U / ml Penicillin und 100 µg / ml Streptomycin) versetzt
LB-Medium	Sigma Aldrich

2. 4 Reagenzien

- ABC Kit Vectastain Ak 5000 1 Tropfen Lösung A + 1 Tropfen Lösung B / 2.5 ml
TBS: ABC Komplex (Linavis, Wertheim)
- AP-Entwicklungslösung 150 ml 300 mg Natrium-Nitrit + 7,5 ml Aqua dest. + 300 µl
Neufuchsin + 150 ml Trispuffer pH 8,24 + 20-30 mg Naphtol AS + 750 µl Dimethyl-
formaid + 200 µl Tween

2. 5 Verbrauchsmaterial

Absaugpumpe Zellkultur (Vacusafe comfort)	IBS Integra Bioscience
ECL Western Blotting Substrate; 32209	Pierce
WB-SDS-Gel	BIORAD
10 ml Einmalpipetten	Falcon
14 ml Röhrrchen (PP-TUBE 14ml STERILE)	greiner bio-one
50 ml Röhrrchen	Sarstedt
Glaspipetten 10 ml	Brand
Kanülen (30G, 20G)	BRAUN
Kryokonservierungsröhrrchen	Nunc Cryo Tube Vials
NC-Membran	Roth
Objektträger	Marienfeld
Pipettenspitzen, 10 µl	STAR LAB
Pipettenspitzen, 200 µl	STAR LAB
Pipettenspitzen, 1000 µl	STAR LAB
2log DNA ladder	Biolabs
6x loading dye	Biolabs
6-well-plate	Sarstedt
12-well-plate	nunc TM : nunclon TM Surface
24-well-plate	nunc TM : nunclon TM Surface
96-well-Mikrotiterplatte	Sarstedt
Röntgenfilm	FUJIFILM
Whatman Filterpapier	Whatman GmbH
Zellkulturflaschen 50 ml (25 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturflaschen 250 ml (75 cm ²)	Sarstedt
Zellkulturflaschen 650 ml (175 cm ²)	Sarstedt
Zentrifugenröhrrchen (Weißkappen)	greiner bio-one

2. 6 Geräte

Absaugpumpe	HLC
-------------	-----

Agarplatteninkubator	WTB Binder
Analysewaage ALS 120-4	Kern
Autoklav (Steam sterilizer 2540 EL)	Tuttnauer
FACS CALIBUR	BD Biosciences
Finnpipetten, 0,5 – 10 µl	Labsystems
Finnpipetten, 200 – 1000 µl	Labsystems
Finnpipetten, 40 – 200 µl	Labsystems
Gamma-Counter (Modell: 1470 Wizard)	Wallac
Heizblock	HLC
Kleintier SPECT / CT (nanoSPECT / CTplus)	Bioscan/Mediso
Laborfuge A	Heraeus Sepatech
NanoDrop Spectrometer	peQLab Biotechnologie
Mehrfachpipette Research	Eppendorf
Mikroskop Axioplan 2	Zeiss
Mikroskop Axiovert 35	Zeiss
Mikroskop Axiovert 40C	Zeiss
Mikroskop Olympus BX50	Olympus
MIRAX MIDI	ZEISS
pH-Meter (Mettler Toledo MP220)	Mettler
Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte
Ultrazentrifuge AUW 220 Uni bloc	SHIMADZU
Universal 32R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen
Waage (Mettler PE2000)	Mettler
Zentrifuge	Hettich
Zentrifuge (Heraeus Pico17)	Heraeus

2. 7 Antikörper

- extrazellulär-bindender hNIS-Ak: mAb clone# VJ1; bindet ein Epitop der letzten extrazellulären Schleife; IgG1 / κ; dankenswerterweise von Frau Ph. D. S. Costagliola aus Brüssel zur Verfügung gestellt (Pohlenz et al. 2000)

- Antikörper gegen den Humanen Natrium Iodid Symporter von neomarkers (Labvision): Human Sodium Iodide Symporter (hNIS) Ab-1 (Clone FP5A) monoklonaler Mausantikörper; Epitop: Aminosäure 625-643; IgG1 / κ (Castro et al. 1999a)
- T84.1: Mausantikörper des IgG1 Subtypes; erkennt Mitglieder der CEACAM-Familie (inklusive CEACAM 1, 5 und 6); dem Institut für Anatomie dankenswerterweise von Dr. P. Nollau aus dem Institut für Klinische Chemie des UKEs zur Verfügung gestellt (Neumaier et al. 1985)
- Polyklonale Ziege Anti-Maus Immunoglobuline / HRP; DAKO
- Isokontrolle Maus IgG1; DAKO
- Ziege anti-Maus APC; invitrogen
- Polyklonale Ziege Anti-Maus Immunoglobuline / Biotinylated; DAKO
- Antikörper Alexa FluorStreptavidin 488 ; invitrogen

2. 8 Isotope

- **Iod:** ^{125}I ; HWZ 59,408 Tage; Spezifische Aktivität 74TBq / mmol; Artikelnummer I-RB-31; Firma Hartmann Analytic Braunschweig
- **Technetium:** $^{99\text{m}}\text{Tc}$; HWZ 6h; Gammastrahler 141keV; Natrium[$^{99\text{m}}\text{Tc}$]pertechnetat wird aus einem Radionuklidgenerator DRYTECTM der Fa. GE Healthcare direkt im Isotopenlabor der Nuklearmedizin des UKEs hergestellt

2. 9 Zellkultur

Die Zellkulturarbeit erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank (Sterilbank SterilGARD, The Baker Company) mit konstantem laminarem Luftstrom unter sterilen Bedingungen sowie unter Verwendung steriler Materialien, Geräte, Lösungen und Medien. Für die Kultivierung wurden 75cm² -Flaschen genutzt. Die Zellen wurden in einem Zellkulturinkubator (Heracell Wärmeschrank, Heraeus) unter Standardbedingungen bei einer Temperatur von 37 °C unter Anreicherung der Luft mit 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten und kultiviert.

Es wurden die adhärent wachsenden humanen Tumorzelllinien HT29, PaCa 5061, BxPc3, MeWo und MCF-7 sowie HEK 293 verwendet. Die BxPc3 -Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dipl.-Biochem. D. Nelson (Isotopenlabor Facility (ILF), HEXT Core Facility Projekt, UKE) zur Verfügung gestellt. Die anderen nativen Zellen waren im Institut für Anatomie bereits kryokonserviert vorhanden. Die nachfolgende Tabelle 1 zeigt eine Übersicht, wann die bei dieser Arbeit verwendeten humanen Tumorzelllinien etabliert wurden.

Tab. 1: Verwendete Tumorzelllinien

Zelllinie	Tumorart	Erstbeschreibung*
HT29	Humanes Kolonadenokarzinom	Primärtumor einer 44-jährigen kaukasischen Frau; 1964 etabliert
MCF-7	Humanes Mammaadenokarzinom	Primärtumor einer 69-jährigen kaukasischen Frau mit metastasiertem Tumor nach Radio- und Hormontherapie 1970
PaCa 5061	Humanes Pankreasadenokarzinom	Tumorzelllinie 2010 im UKE etabliert (Kalinina et al. 2010)
BxPc3	Humanes Pankreasadenokarzinom	Etabliert 1986 (Tan et al.)
MeWo	Humanes Melanom	Etabliert 1978
HEK 293	Human Embryonic Kidney -Zellen	Anfang der 1970er Jahre etabliert als Transformationsprodukt einer menschlichen embryonalen Nierenzelle und DNA-Teilen des menschlichen Adenovirus5

* Quellen:

DSMZ: <http://www.dsmz.de/de/kataloge/katalog-menschliche-und-tierische-zelllinien.html#searchResult> (Stand 08/2013)

ATCC:

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1687&Template=cellBiology> (Stand 08/2013)

CLS: http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4490/e4526/index_ger.html (Stand 08/2013)

Wie aus Tabelle 1 hervorgeht, handelt es sich bei den in dieser experimentellen Arbeit genutzten humanen Tumorzelllinien um in der Forschung weitestgehend lange Zeit bekannte und verwendete Zellen. Eine Ausnahme bilden die erst vor kurzem im UKE etablierten Pankreastumorzellen PaCa 5061 (Kalinina et al. 2010). Sie wurden als Alternative zu den

BxPc3 -Zellen gewählt, da im Institut Anatomie des UKEs bereits länger mit ihnen gearbeitet wird (vgl. auch Heine et al. 2011). Mit den BxPc3 -Zellen besteht in unserem Institut jedoch nicht so viel Erfahrung.

Die nachfolgende Abbildung 6 zeigt beispielhaft die verschiedenen nativen Zellen unter dem Mikroskop.

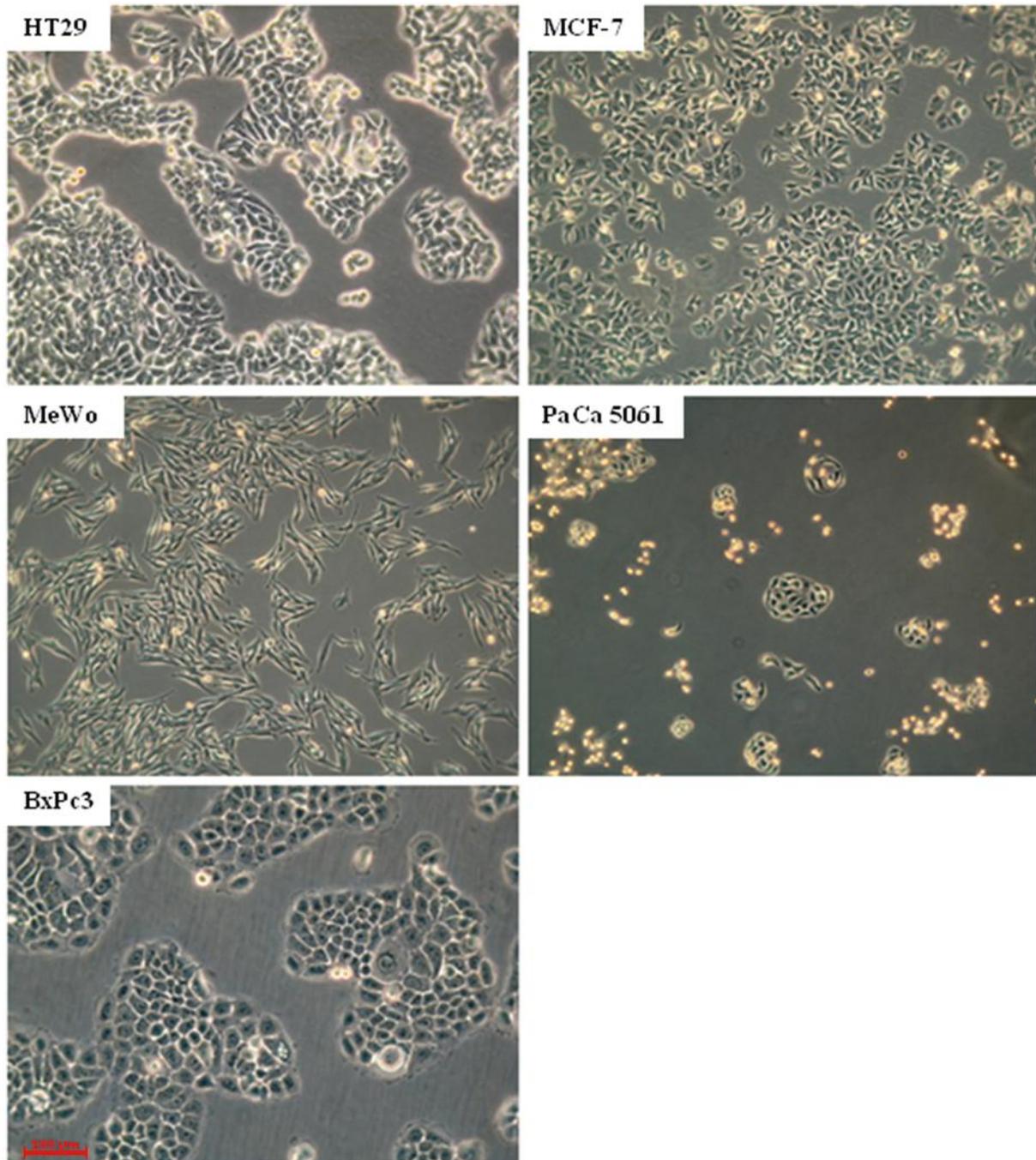


Abb. 6: Beispielaufnahmen der Morphologie der nativen Zellkulturen im Phasenkontrastmikroskop (Axiovert).

Die vitalen Zellen sind dunkel-durchscheinend. Tote Zellen sind als helle, von der Unterfläche abgelöste runde Strukturen zu erkennen.

Die Abbildung **6** verdeutlicht die unterschiedliche Morphologie der vitalen, adhären wachsenden nativen Tumorzellkulturen (vgl. auch **Abb. 10**). Die beiden Pankreastumorzelllinien BxPc3 und PaCa 5061 sind sich optisch relativ ähnlich. Die Melanomzellen MeWo sind eher länglich, während die Kolonkarzinomzellen HT29 eher rundlich sind. Die Brustkrebszellen MCF-7 zeigen sich eher polymorph. Die verschiedenen Tumorentitäten zeigen in der Zellkultur ein unterschiedlich schnelles Wachstum. Unter dem Lichtmikroskop wurde das Wachstum der Zellen kontrolliert.

2. 9. 1 Zellpassage

Die kultivierten Zelllinien wurden i. d. R. bei einer Konfluenz von ca. 80 % ein- bis zweimal pro Woche passagiert, indem das Kulturmedium abgesaugt wurde, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit cdb oder Trypsin im Inkubator inkubiert wurden, bis sie sich sichtbar ablösten. Die Reaktion wurde mit Kulturmedium gestoppt und je nach Zelllinie 1 / 5 bis 1 / 12 der Zellsuspension wieder ausgesät und weiterkultiviert. Des Weiteren wurde das Kulturmedium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die HT29 -Zellen zeigten dabei das schnellste Wachstum. Wenn sie stark ausgedünnt waren, wuchsen sowohl die Brustkrebs- als auch die Pankreaskarzinomzellen zunächst verhältnismäßig langsam.

2. 9. 2 Vektoren

Für die Versuche wurden zwei Plasmide der Firma invitrogen bezogen: pcDNA3.1/Zeo(+) und pcDNA3.1/Zeo(+)-hNIS. Die Vektoren enthalten die Resistenz für das Antibiotikum Zeocin, einem Kupfer-chelatierten Glykopeptid, das aus der Bleomycin/Phleomycin -Familie stammt und aus *Streptomyces verticillus* isoliert worden ist (Herstellerangaben). pcDNA3.1/Zeo(+)-hNIS enthält die hNIS-DNA-Sequenz. pcDNA3.1/Zeo(+) ist der gleiche Vektor, allerdings ohne die DNA für hNIS, und diente in den Versuchen als Negativkontrolle. Gelieferte Massen: pcDNA3.1/Zeo(+)-hNIS: 8,3µg und pcDNA3.1/Zeo(+): 15µg.

Die Plasmide wurden in elution buffer (EB) gelöst, sodass sich eine Konzentration von 0,5µg / µl ergab. NIS humanen Ursprungs in NCBI: NM_000453 bzw. U66088.

Die nachfolgende Tabelle 2 gibt die Herstellerangaben zum gelieferten hNIS-Vektorkonstrukt wieder. Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die Vektorkarten sowie die Klonierungsstellen.

Tab. 2: Herstellerangaben (invitrogen; eurofins mwg operon) zum hNIS-Vektor

Plasmidname	pcDNA3.1/Zeo (+)-hNIS	Internal Name	B928pcDLig-1
Genname	hNIS	Gengröße	1944bp
Vector backbone	pcDNA3.1/Zeo (+)	Antibiotische Selektion	Ampicillin und Zeocin
Cloning	Cloned via BamHI/EcoRI	Masse	8,3µg
Designation	E. Coli TOP10		
Genotyp	F- mcr A Δ(mrr -hsd RMS-mcr BC) Φ 80lac Z ΔM15 Δlac X74 rec A1 ara D139 Δ(ara-leu)7697 gal U galK rps L (Str ^R) end A1 nupG		

Plasmid Map

PCR Product: hNIS

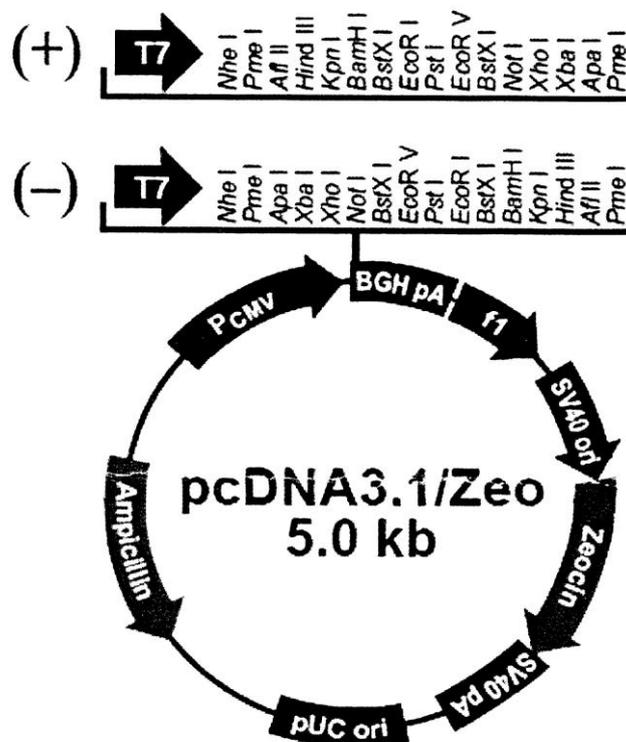


Abb. 7: Plasmidkarte pcDNA 3.1/Zeo vom Hersteller (invitrogen; eurofins mwg operon)

5',3' –Klonierungsstellen: BamH1/EcoR1
cloned via BamH1/EcoR1

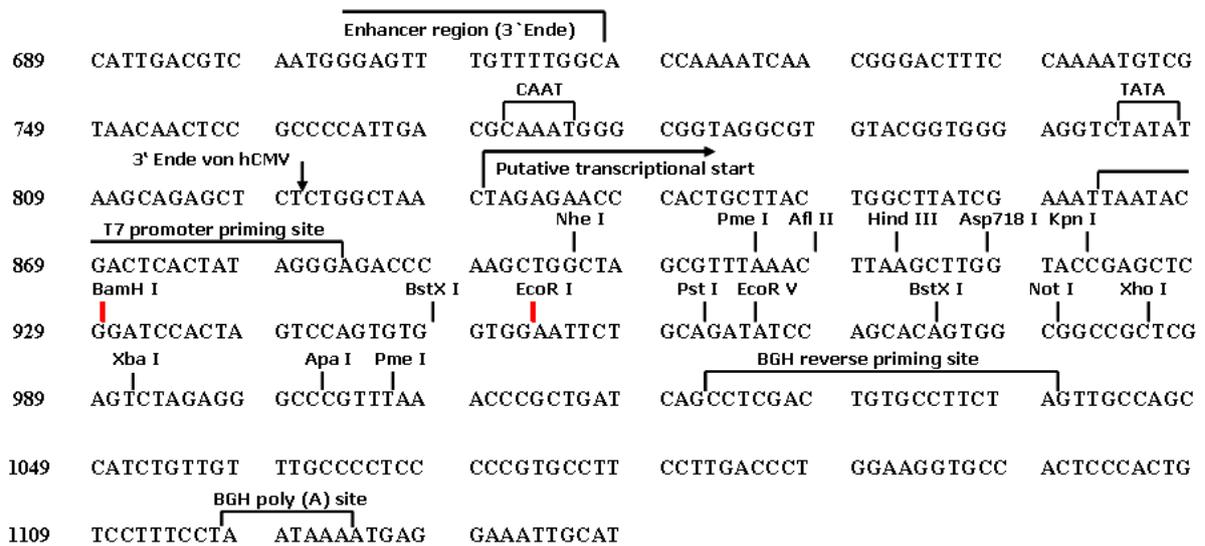


Abb. 8: Klonierungsstellen des gelieferten Vektorkonstrukts. Herstellerangaben (invitrogen; eurofins mwg operon)

2. 9. 3 Transfektion

Zur Transfektion wurden jeweils frisch revitalisierte Zellen verwendet. Einen Tag vor der Transfektion wurden die Zellen in 6-Well-Platten (Sarstedt) ausgesät, um am Transfektionstag eine Konfluenz von ca. 55 % zu erreichen.

Das Medium wurde abgesaugt und 2 ml reines RPMI (also ohne FCS und Pen / Strep) auf die Zellen pipettiert. Transfiziert wurde mit GFP, der hNIS-enthaltenden DNA (pcDNA3.1/Zeo(+)-hNIS) sowie dem Kontrollvektor (pcDNA3.1/Zeo(+)).

Tab. 3: Pipettierschema Transfektionsansatz in zeitlicher Reihenfolge:

3 x 100 µl = 300 µl reines RPMI (ohne P / S und FCS)	
+ 3 x 6 µl = 18 µl FuGENE	
-> Mix für 5 min bei RT inkubieren (dient der Micellenbildung)	
In jeweils ein Eppendorfröhrchen 2 µg DNA pipettieren	GFP, pcDNA+/hNIS und pcDNA+
Hierzu jeweils ~100 µl des RPMI / FuGENE - Gemischs unter Gegenschnippen hineinpipettieren	
-> für 30 min inkubieren lassen	

Nach der Inkubationszeit wurde der jeweilige Ansatz auf je ein Well mit Zellen getropft und die Zellen über Nacht unter Standardbedingungen inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 18 h erfolgte der Mediumwechsel auf das jeweilige normale Kulturmedium. Am nächsten Tag wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop die Transfektionsrate anhand der GFP-Transfektionsrate abgeschätzt, die Zellen wurden trypsinisiert und auf jeweils mindestens zwei 10 cm² Schalen ausgesät und unter Selektionsdruck kultiviert. Im Zuge dieser Selektion überlebten nur solche Zellen, die das Vektorkonstrukt erfolgreich eingebaut hatten, so dass sie resistent gegen Zeocin wurden. Je nach Zelllinie wuchsen unterschiedlich viele Klone heran, die bei einem Klondurchmesser von ca. 4 mm einzeln mit Hilfe selbst hergestellten Kloniererringen trypsinisiert und in 12-Well-Platten umgesetzt wurden. Als Kloniererringe wurden die breiten Seiten von 1 ml-Pipettenspitzen abgeschnitten, sodass sie etwa eine Höhe von 5 mm hatten und anschließend autoklaviert. Zur Abdichtung wurde autoklavierte Vaseline genutzt, die auf den glatten Rand des Rings verteilt wurde.

2. 9. 4 Bestimmung der minimalen toxisch-letalen Antibiotikumkonzentration

Zeocin zeigt eine starke Toxizität gegen Bakterien, Pilze, Pflanzen und Säugerzelllinien (Mulsant et al. 1988). Durch diese Eigenschaft ist das *ble* Resistenzgen, das für die Zeocin-

resistenz kodiert, geeignet um Vektoren zu konstruieren und diese dann zur Selektion zu nutzen (Calmels et al. 1991, Drocourt et al. 1990, Gatignol et al. 1987).

Da in unserem Labor keine Vorerfahrungen zur Resistenz der humanen Zelllinien gegenüber Zeocin bestanden, wurden zunächst „Absterbe“-Versuche mit den verschiedenen Zelllinien durchgeführt, um mittels Verdünnungsreihen zu bestimmen, welche Zeocinkonzentration letal für die verschiedenen nativen humanen Tumorzellen ist. Hierzu wurden jeweils 6-Well-Platten mit identischer Zellzahl ausgesät (je nach Zelllinie $2,5-5 \times 10^5$ / Well) und die Zellen ab dem zweiten Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen von Zeocin in 2 ml Kulturmedium sowie einem Well ohne Zeocin im Medium über einen Zeitraum von maximal zwei Wochen kultiviert. Anschließend wurden ggf. verbliebene Zellen mit Trypan blue gefärbt (vgl. **Abb. 10**). Die Zellen, die ohne Zeocin im Medium kultiviert wurden, dienten der Wachstumskontrolle im Beobachtungszeitraum. Für die Selektion und spätere Kultivierung der gentechnisch veränderten Tumorzelllinien wurde jeweils die im Beobachtungszeitraum niedrigste letale Antibiotikumkonzentration verwendet.

Tab. 4: Verwendete Zeocinkonzentrationen im Zellkulturmedium

Zelllinie	HT29	MCF-7	MeWo	PaCa 5061	BxPc3
Zeocinkonzentration in µg / ml	200	250	70	22	12

2. 9. 5 Kryokonservierung und Revitalisierung der Zelllinien

HNIS-positive Klone der unterschiedlichen Zelllinien sowie deren unterschiedliche Sortierungsstufen nach durchflusszytometrisch-gesteuerter Sortierung („FACS-sorts“) wurden auf Mykoplasmen getestet und kryokonserviert. Die Zellen wurden wie zur Passage behandelt, ein Aliquot entsprechend weiter kultiviert und der Rest mit 1500 RPM zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen i. d. R. in 5 ml Einfrier-Medium aufgenommen und zu 1 ml Aliquots auf die Einfrierröhrchen verteilt. Die Röhrchen wurden im Isopropanol-Behälter ca. 1 h bei einer Temperatur von -20 °C, für 24 h bei einer Temperatur von -80 °C abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -180 °C kryokonserviert.

Die Zellen wurden rekultiviert, indem das Aliquot schwenkend im Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C aufgetaut wurde. Sobald die Suspension komplett aufgetaut war, wurde

der Inhalt des Kryokonservierungsröhrchen in ein bereits vorbereitetes Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Kulturmedium pipettiert und anschließend für 3 min bei 1250 RPM zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde nach Absaugen des Überstandes in Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

2. 9. 6 Bestimmung der Zellzahl mittels Hämocytometer (Zellzählung mit der Neubauer-Kammer)

Für alle Versuche wurde die Zellzahl jeweils mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden wie zur Passage behandelt, 10 μ l der Zellsuspension in die Kammer gegeben und anschließend die Zellkonzentration durch Auszählung aller vier Quadrate bestimmt. Deformierte bzw. tote Zellen sind daran zu erkennen, dass sie z. B. deutlich vergrößert oder aber eher durchscheinend sind. Diese wurden nicht mitgezählt.

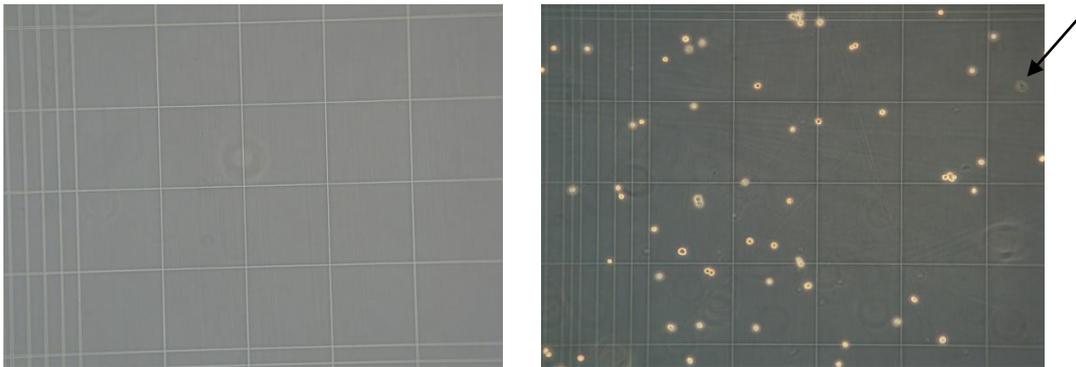


Abb. 9: Beispielaufnahmen der Neubauer-Kammer für die Zellbestimmung (Axiovert): links: Ein Großquadrat ohne Zellen, rechts: Ein Großquadrat mit Zellen. Der schwarze Pfeil zeigt auf eine tote Zelle. Diese wurden naturgemäß bei der Zählung nicht berücksichtigt.

2. 9. 7 Ausschluss einer Mykoplasmenkontamination

Bevor Klone in Mäuse injiziert wurden und vor der Kryokonservierung von Klonen, wurden diese auf eine eventuelle Mykoplasmeninfektion hin untersucht und nur mykoplasmennegative Klone weiterverwendet. Mittels des QIAamp DNA Blood Mini Kits (250) wurde DNA gemäß Herstellerangaben aus den jeweiligen Zellpellets isoliert und das Venor[®]GeM Kit von

Minerva biolabs für die quantitative und qualitative PCR benutzt. Es folgte eine Agarose-Gel-auswertung mit einem 1,5 %-igen Gel. Das Gel lief mit einer Spannung von 20 V für 30 min. Die Vergleichs-DNA (2log DNA ladder von biolabs), eine interne Kontrolle von 191 bp sowie eine Positivkontrolle von 256 - 278 bp dienten der Kontrolle.

2. 9. 8 Herstellung Paraffin-fixierter Zellpellets

Für die Einbettung in Paraffin wurden die Zellen bei Erreichen einer etwa 80 %-igen Konfluenz mit einem Zellschaber vom Boden einer großen Zellkulturflasche (175 cm²) abgelöst, für 5 min bei 1500 RPM zentrifugiert und mehrfach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert und in 4 % Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach erneuter Zentrifugation und zweimaligem Waschen mit PBS werden die Zellen mindestens zwei Stunden in PBS stehen gelassen.

2. 10. Bakterien

2. 10. 1 Transformation

Nach dem Auftauen der chemokompetenten *E. coli* (invitrogen) auf Eis wurde jeweils 1 µl des gelösten Konstrukts / der gelösten Vektor-DNA oder Plasmid-DNA zu den kompetenten *E. coli* pipettiert, behutsam durchmischt und die Bakterien wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 2 min bei einer Temperatur von 42 °C und anschließend wurde für 5 min wieder auf Eis gekühlt („quick chill“). Das Volumen wurde mit jeweils 400 µl S.O.C. Medium aufgefüllt und für 30 min bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Die anschließende Ausbringung der transformierten *E. coli* erfolgte mit Hilfe des Drigalskispaltels auf je zwei Agarplatten, um eine ausreichende Vereinzellung zu erreichen. Die Agarplatten kamen über Nacht in einen Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C.

2. 10. 2 Amplifikation

Nach ca. 18 h Inkubationszeit wurden einige Kolonien beider Transformationsansätze mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen, dann mit jeweils einem Volumen von 4 ml LB-Medium versehen mit 4 µl Ampicillin (Ampicillinkonzentration: 100 mg / ml) in einem 14 ml Reagenzglas durch Abwerfen der Pipettenspitze in das Reagenzglas beimpft und für 36 h im Drehinkubator bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Zur Aufbewahrung wurden die Agarplatten mit Parafilm abgedichtet und bei 4 °C gelagert.

2. 10. 3 DNA-Extraktion

DNA-Extraktion des amplifizierten Plasmids mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit (50) Cat.No.27104 gemäß des Herstellerprotokolls:

Die DNA-Minipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden nach einer Bakterieninkubationszeit von 36 h durchgeführt. Die 4 ml Bakterienkultur wurden in je einem 1ml Eppendorf-Röhrchen für 5 min bei 13000 RPM pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet anschließend in einem Volumen von 250 µl P1 Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von einem Volumen von 250 µl P2 Puffer und sechsmaliger Inversion erfolgte die Lyse. Es wurde ein Volumen von 350 µl N3 Puffer hinzupipettiert und wieder sechs Mal invertiert. Anschließend wurde für 10 min mit 13000 RPM zentrifugiert. Der plasmidhaltige klare Überstand wurde auf die Miniprep-Zentrifugensäulen übertragen und diese für 1 min mit 13000 RPM zentrifugiert. Mit 750 µl PE Puffer, der etwa 80 % Ethanol enthält, wurden die Säulen gewaschen, um Protein- und Salzkontaminationen zu entfernen. Es wurde zweimal für 1 min bei 13000 RPM zentrifugiert und der Überstand verworfen, um restlichen Waschpuffer zu entfernen. Anschließend wurde das Plasmid mit einem auf eine Temperatur von etwa 40 °C erwärmten Volumen von 60 µl EB Puffer für 1 min stehengelassen, für 1 min bei 13000 RPM zentrifugiert und somit eluiert.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des NanoDrops mit einem Volumen von 1,5 µl des Eluats. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde durch diagnostischen Restriktionsverdau und anschließende Gelelektrophorese auf ihre Korrektheit hin überprüft.

2. 10. 4 Restriktionsverdau

Für den Restriktionsverdau und damit auch für die anschließende Gelelektrophorese wurden maximal 200 ng DNA verwendet. Zuvor wurde die DNA-Konzentration mittels Nanodrops bestimmt. Der Restriktionsverdauansatz wurde mit einem Gesamtvolumen von 15 μ l durchgeführt, sodass je nach DNA-Konzentration im Eluat ein variables Wasservolumen hinzupipettiert wurde. Die einzelnen Pipettierschritte inklusive der Inkubationszeiten sind in zeitlicher Reihenfolge in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

Tab. 5: Pipettierschema Restriktionsverdau

X μ l H ₂ O*	
+ 1 μ l Puffer 3	
+ X μ l DNA*	
+ 1 μ l EcoR1	
-> mit Impuls kurz zentrifugieren	-> für 45 min bei einer Temperatur von 37 °C auf dem Heizblock
+ 2,5 μ l H ₂ O	
+ 1,5 μ l 10xBSA	
+ 1 μ l BamH1	
-> mit Impuls kurz zentrifugieren	-> für 45 min bei einer Temperatur von 37 °C auf dem Heizblock

* X μ l DNA + X μ l H₂O = 8 μ l; d.h. ggf. wurde die Wassermenge an die DNA-Konzentration angepasst.

2. 10. 5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der restringierten DNA-Fragmente wurde ein 0,75 %-iges Agarosegel verwendet. Hierzu wurden 41,25 mg Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und mit einem Volumen von 55 ml 1xTBE-Puffer aufgefüllt. Das Gemisch wurde in der Mikrowelle für 2 min erhitzt, bis eine klare Lösung entstand, und unter fließendem Wasser etwa 30 sec abgekühlt. Anschließend wurden 2 μ l Ethidiumbromid unter dem Abzug hinzupipettiert, gemischt und die Lösung luftblasenfrei in den Gelträger gegossen. I. d. R.

wurde ein Kamm mit zwölf Zähnen eingesetzt und anschließend ca. 1 h bei Raumtemperatur bis zur Aushärtung inkubiert. Die Gelelektrophorese wurde mit einem Volumen von 1,5 µl einer Vergleichs-DNA (2-log DNA-ladder) (+ 13,5 µl H₂O + 5 µl loading dye) und den originalen Plasmiden als Kontrollen mit einer Spannung von 100 V 45 min in 1xTBE-Pufferlösung durchgeführt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht fotografiert (BioRad) und die DNA-Fragmente anhand der Originalplasmid-DNA-Fragmente und des mitgelaufenen Markers nach Anzahl der Basenpaare identifiziert.

2. 11. Western Blot

Für den Western Blot wurden ca. 1×10^7 Zellen in 10 cm²-Petrischalen bzw. in 6-Well-Platten ausgesät. Sowohl transient transfizierte HEK 293 als auch stabil transfizierte Zellen wurden untersucht.

Für die Zellyse und die Gewinnung einer Gesamtproteinsuspension wurde der Puffer jeweils frisch mit PIC mit einer Verdünnung von 1 : 100 versetzt und auf Eis gekühlt. Die 10 cm²-Petrischalen wurden mit einem Volumen von 900 µl Zellysepuffer, die 6-Well-Platten mit einem Volumen von 300 µl lysiert. Zuvor wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und der Überstand entfernt. Sobald der Lysepuffer pipettiert wurde, wurden die Zellen ebenfalls auf Eis gekühlt und für 30 min inkubiert. Die 10cm²-Petrischalen wurden hierbei alle 5 min um 90° gedreht, um sicher zu gehen, dass alle Zellen mit Puffer benetzt waren, da die Schalen nie ganz gerade auf dem Eis standen. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen schnell (wegen der Temperatur) unter dem Lichtmikroskop begutachtet, da die erhöhte Temperatur zu einer schnelleren Zellzersetzung führt. Unter leichter Kippung der Schalen wurden die Zellen anschließend auf Eis mit dem Puffer ein paar Mal schnell abgespült, wobei sich einige Zellen ablösten. Der Überstand wurde abpipettiert und in ein 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt. Bei 10000 RPM und einer Temperatur von 4 °C wurden die Proben für 5 min zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand in 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt und gleich weiterverwendet bzw. zu einem Volumen von 45 µl aliquotiert und weggefroren.

2. 11. 1 Immunpräzipitation

Die totalen Proteinlysate wurden mit dem extrazellulär bindenden Antikörper VJ1 (Verdünnung 1:50) versetzt und über Nacht bei 4 °C auf dem Drehinkubator inkubiert. Nach der Inkubation über Nacht folgte die Bindung der Proben an das Protein G. Es wurde ein Volumen von 400 µl Prot. G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) verwendet. Vor der Entnahme wurde die in 20 % Ethanol gelagerte Prot. G Sepharose resuspendiert. Die entnommene Menge wurde in ein 1,5 ml-Eppendorf-Röhrchen überführt, das Volumen mit PBS auf 1,5 ml aufgefüllt und für 5 min bei 14000 RPM und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert, um das Ethanol zu entfernen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Waschen mit PBS wiederholt. Der Überstand wurde entnommen, das Volumen, das die Beads einnahmen, abgeschätzt und mit demselben Volumen an PBS aufgefüllt. Die Beads wurden resuspendiert und jeweils ein Volumen von 50 µl zu einer IP-Probe gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1-2 h bei 4 °C auf dem Drehinkubator. Das Protein G sollte die Antikörper zusätzlich binden, was eine Anreicherung der hNIS-Proteine in der Untersuchungsprobe zur Folge haben sollte.

2. 11. 2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine werden elektromagnetisch aufgetrennt. Es wurden 10 %-ige Trenngele mit vorgeschalteten 5 %-igen Sammelgelen (BioRad) verwendet.

Der Laufpuffer wurde kurz vor Versuchsbeginn aus 50 ml 10 x RB und 450 ml Aqua dest. frisch angesetzt. Die Elektrophoresekammer (BioRad) wurde zusammengesetzt, der Innenraum mit Laufpuffer gefüllt und zunächst auf Dichtheit überprüft. Auch der Außenraum wurde mit Laufpuffer befüllt, der Kamm aus dem Gel entfernt und anschließend die einzelnen Taschen zweimal mit Laufpuffer 30 µl sauber ausgespült, um noch ggf. vorhandene Polyacrylamidrückstände zu entfernen.

Der verwendete 5xLSB wurde kurz vor der Benutzung mit 1-2 % Mercaptoethanol versetzt. Zu den IP-Proben wurden 20 µl 5xLSB, zu den nicht-IP-Proben (45 µl) wurden 11,25 µl 5xLSB gegeben. Die Proben wurden für 5 min auf 100 °C erhitzt und anschließend für ca. 15 sec zentrifugiert. Das maximale Fassungsvermögen der Geltaschen wurde ausgenutzt. Als

Proteinstandard lief der rainbow marker mit 12,5 μ l mit. Die Elektrophorese lief im Sammelgel mit einer Spannung von 120 V, im Trenngel mit einer Spannung von 105 V für ca. 1,5 h.

2. 11. 3 Western Blotting

Der Transferpuffer wurde frisch angesetzt, damit sich das Methanol nicht verflüchtigt. Die beiden Pufferschwämme sowie vier zugeschnittene Whatman-Papierstücke und die Nitrozellulose-Membran wurden in Transferpuffer getränkt. Nach der Elektrophorese wurde der Puffer abgegossen und die Kammer vorsichtig mit dem beigelieferten Instrument aufgehebelt. Das Sammelgel und ggf. nicht verwendete Bahnen wurden abgetrennt. Zur späteren Orientierung wurde eine Ecke vom Gel abgetrennt. Die Blottingkassette wurde wie folgt unter ständiger Feuchthaltung in Transferpuffer von unten nach oben zusammengesetzt: Der schwarze Teil der Plastikfassung nach unten, ein Schwamm, zwei Whatman-Papiere, das Gel, die Nitrozellulose-Membran (ebenfalls mit einer angeschnittenen Ecke), zwei Whatman-Papiere sowie ein Schwamm und der weiße Teil der Plastikfassung. Nachdem das erste Whatman-Papier auf die NC-M gelegt wurde, wurde mit einer sterilen Pipette mehrfach vorsichtig darübergerollt, um eventuell vorhandene Luftblasen zu entfernen. Die Kassette wurde in den mit Puffer befüllten Blottank gesetzt. Dem Puffer wurden noch ein Volumen von 50 μ l 10 % SDS zugefügt, da das Protein relativ groß ist. Zur Kühlung wurde eine gefrorene Eiskassette eingesetzt, ein Rührfisch zugelegt und die Kammer auf einem Magnetrührer platziert. Geblottet wurde mit einer Stromstärke von 200 mA und einer Spannung von 115 V für 1,5 h und somit die Proteine auf die Nitrozellulose-Membran transferiert.

2. 11. 4 Proteinnachweis

Auf der Membran erfolgte mit Hilfe des hNIS-spezifischen Antikörpers von neomarkern der Nachweis des unter den Gesamtzellproteinen gesuchten Proteins hNIS. Die Membran wurde dabei stets feucht gehalten. Zunächst wurde die Membran vorsichtig aus der Kammer genommen, ohne dabei die Fläche, auf der die Proteine gebunden waren, zu berühren. Sie wurde wandständig in ein 50 ml Falcon-Röhrchen befördert, wobei die proteinbindende Seite nach

innen zeigte. Für wenigstens 45 min wurde die Membran mit einem Volumen von 10 ml filtriertem 1 % Casein in PBS auf dem Drehinkubator geblockt und die Caseinlösung anschließend verworfen. In einem Volumen von 5 ml wurde die Membran mit einer Verdünnung von 1 : 2000 mit dem primären Antikörper von neomarkers bei einer Temperatur von 4 °C auf dem Drehinkubator über Nacht inkubiert. Die Caseinlösung wurde verworfen und es wurde fünfmal für 5 min mit einem Volumen von 10 ml TBST auf dem Drehinkubator gewaschen. In einem Volumen von 5 ml erfolgte mit einer Verdünnung von 1 : 2000 die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (polyklonal Ziege anti-Maus HRP) bei Raumtemperatur für 1,5 h auf dem Drehinkubator. Antikörperreste wurden im Anschluss durch dreimaliges Waschen mit einem Volumen von 10 ml TBST entfernt. Die Membran wurde mit einem Volumen von 1 ml des ECL-Reagenzes im Dunklen inkubiert und das Röntgenbild entwickelt. Mit Hilfe des auf dem Gel mitgelaufenen Markers konnte die Transfer-Effizienz abgeschätzt werden. Außerdem konnte das Molekulargewicht der Banden abgeschätzt werden.

2. 12 Durchflusszytometrie

Zusätzlich zu der Proteinnachweismöglichkeit des Western Blots wurden die transfizierten Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Anders als beim Western Blot bleiben hierbei die Zellen intakt und der Antikörper muss an der Zellaußenseite binden können.

Die Zellen wurden wie zur Passage behandelt und die abgelösten Zellen für 3 min bei 1500 RPM in einem Zentrifugenröhrchen pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet wie nachfolgend beschrieben behandelt.

Es wurden zwei Protokolle für die Durchflusszytometrie-Analysen verwendet: Zunächst wurde ein Protokoll mit Formalin-Fixation und Saponin (modifiziert nach Sander et al. 1999) eingesetzt, des Weiteren wurde eins ohne Fixation angewandt.

Bei Anwendung des Fixationsprotokolls wurde das Zellpellet in einem Volumen von 1 ml Puffer, bestehend aus einem 1 : 1 Gemisch aus FACS-Puffer und einem 4 %-igen Formaldehyd, resuspendiert. Für 15 - 20 min wurde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einem Volumen von 10 ml FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden erneut für 3 min bei 1500 RPM zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in einem 1 : 1 Gemisch aus FACS-Puffer und Saponin resuspendiert. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 15 min

bei Raumtemperatur. Ohne zu waschen wurde zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Es folgten die einzelnen Färbeschritte, wobei der Puffer jeweils aus dem 1 : 1 Gemisch aus FACS-Puffer und Saponin bestand. Zunächst wurden die Zellen in Eppendorf-Röhrchen überführt. Das Absaugen der Überstände erfolgte mit einer 20 G-Kanüle.

Die Färbung mit dem primären Antikörper erfolgte, je nach Zellzahl, in einem Färbevolumen von 100 bis 200 μl mit einer Verdünnung des jeweiligen Antikörpers (VJ1 bzw. Iso IgG1, T84.1) von 1 : 50 und einer Inkubation von 30 min auf Eis. Anschließend wurde nicht-gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit einem Volumen von jeweils 1 ml FACS-Puffer und Zentrifugation für 3 min bei einer Temperatur von 4 °C mit 2000 RPM entfernt, indem der Überstand abgesaugt wurde. Es folgte der zweite Färbeschritt mit dem sekundären Antikörper Ziege anti-Maus APC ($\lambda_{\text{Ex}} = 650 \text{ nm}$). Der Färbeschritt erfolgte analog zum ersten mit einer Antikörperverdünnung von 1 : 100 im 1 : 1 FACS-Puffer-Saponin-Gemisch für 30 min auf Eis. Im Folgenden wurde wie oben beschrieben gewaschen.

Die Färbung ohne Fixation erfolgte ohne den Fixationsschritt nach demselben Protokoll, wobei kein Saponin verwendet wurde. Nach der letzten Zentrifugation wurden die Zellpellets in einem Volumen von je 500 μl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Als Marker für tote Zellen wurde Propidiumiodid eingesetzt. Die Messungen wurden am Gerät FACS CALIBUR durchgeführt und mittels WinMDI 2.9 ausgewertet.

2. 13 Objektträger-Färbung

Für die Fluoreszenzfärbung wurden Zellen aus T175-Kulturflaschen, also eine größere Zellzahl, wie zur Passage behandelt, der Großteil der Zellen gefärbt und der Rest weiterkultiviert. Der zur Färbung vorgesehene Teil wurde nach dem Ablösen in Zentrifugenröhrchen gegeben, für 3 min bei 1500 RPM zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden in einem Volumen von je 500 μl Puffer (PBS + 4 % BSA + 0,5 mM EDTA) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation und der Überstand wurde verworfen. Die Zellpellets wurden im Färbevolumen von 100 bis 200 μl , abhängig von der Zellzahl, resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Der primäre Antikörper (VJ1 bzw. IsoIgG1) wurde mit einer 1 : 50 Verdünnung hinzupipettiert, das ganze vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Waschschritt, bei dem ein Volumen von 1 ml Puffer hinzugegeben wurde und die Proben bei einer

Temperatur von 4 °C für 3 min mit 2000 RPM zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde entfernt und es folgte die sekundäre Antikörperfärbung (biotinylierter polyklonaler Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200) in einem Volumen von 100 bis 200 µl für 30 min auf Eis. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der tertiäre Antikörper (Alexa FluorStreptavidin mit einer Verdünnung von 1 : 100) im selben Färbervolumen für 30 min auf Eis hinzugefügt. Nach dem Waschschrift wurden die Zellpellets in jeweils einem Tropfen Dapi mounting Medium aufgenommen und luftblasenfrei auf einen Objektträger aufgetragen. Damit die Proben nicht austrocknen, wurden sie mit einem Deckglas belegt und dieses mit Nagellack verschlossen.

Die Messung erfolgte am Axiovert 200 (ZEISS) und der Software Axiovision (ZEISS).

2. 14 Anreicherung hNIS-positiver Zellen

2. 14. 1 Durchflusszytometrisch-gesteuerte Zellsortierung

Für die Sortierung wurden ca. 5×10^6 Zellen / ml genommen. Die Zellen wurden wie für eine Passage behandelt und die Zellsuspension wurde durch ein steriles Zellsieb (100 µm sterile cell strainer) in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gesiebt, damit nicht zu viele Zellen aneinanderklebten. Diese Zellsuspension wurde wie für die Durchflusszytometrie zentrifugiert und gefärbt (Puffer PBS + EDTA (steril 500 mM, auf Eis)). Nach dem Färben wurde das Zellpellet ebenfalls in einem Volumen von 500 µl Puffer aufgenommen und in ein auf Eis gekühltes FACS-Röhrchen überführt. Die Zellsortierung erfolgte in der FACS Sorting Core Unit (HEXT Core Facility Projekt) des UKEs. Genutzt wurde das FACS-Arialll mit einem roten Laser der Wellenlänge 633 nm, entsprechend der APC-Markierung der Zellen (FACS Sorting Core Unit. [Online im Internet.] (Stand 22.08.2013 17:30 Uhr)).

Diese sortierten hNIS-positiven Zellen wurden weiterkultiviert und entsprechend ihrer Sortierungsstufe bezeichnet. Die Zellklone hießen demnach z. B. „HT29 GVO hNIS post 1. sort“, um zu beschreiben, dass diese Zellen einmal durchflusszytometrisch-gesteuert anhand ihrer membranösen hNIS-Expression sortiert und hNIS-negative Zellen aussortiert und verworfen worden waren.

2. 14. 2 Zellausdünnung („limitung dilution“)

Dies wurde als weitere Methode eingesetzt, um eine Anreicherung an hNIS-positiven, den hNIS membranös exprimierenden Zellen, zu erhalten. Es wurden „MCF-7 post 2. sort“ und „HT29 post 4. sort“ -Zellen verwendet, also MCF-7 -Zellen nach zweifacher und HT29 -Zellen nach vierfacher durchflusszytometrisch-gesteuerter Zellsortierung. Die jeweiligen Zellen wurden soweit verdünnt in 96-Well-Platten ausgesät, dass davon auszugehen war, dass pro Well nur eine oder zumindest nur sehr wenige hNIS-überexprimierende Zellen vorhanden waren. Hatten die Wells eine gewisse Konfluenz erreicht, wurden zwei 96-Well-Platten mit derselben Zellverteilung erstellt. Hierzu wurde die Zellzahl in einem Well halbiert und eine „Kopie“ der Platte erstellt. Beide wurden weiter kultiviert und eine der beiden Platten im Radioaktivassay nach den am meisten iodaufnehmenden Zellen gescreent. Diese Klone wurden aus der im Inkubator verbliebenden 96-Well-Platte weiter kultiviert. Hieraus entstandene Zellklone wurden für später folgende Experimente verwendet. Die Triplett-Messungen im abschließenden DIDS-Versuch (in der Wiederholung dieses Versuches) wurden mit den hieraus entstandenen Klonen „HT29 hNIS GVO post 4. sort Klon#28“ und „MCF-7 hNIS GVO post 2. sort Klon#1“ durchgeführt. Die Klonnummer entspricht dabei dem 96-Well-Platten-Well, aus welchem der jeweilige Klon kultiviert worden war. Die beiden genannten Klone zeigten die stärkste Aufnahme an Radioaktivität.

2. 15 *In vitro* Experimente mit radioaktiven Nukliden

2. 15. 1 Radioiodidaufnahmeversuch

Die *in vitro* Iodidaufnahmemessungen wurden in Anlehnung an die Methode von Weiss et al. (1984) sowie Gärtner (2009) durchgeführt. Alle Messwerte wurden doppelt erhoben.

Es wurden etwa $4,5 \times 10^5$ MCF-7- und etwa 3×10^5 HT29 -Zellen in 12-Well-Platten ausgesät, sodass nach einer Zeit von 24 h Inkubation im Zellkulturbrutschrank ein konfluenten Monolayer vorlag.

Für die tRA-Stimulation wurden native MCF-7 Zellen 72 h vor dem Versuch ausgesät und 48 h vor Versuchsbeginn durch Zusatz von 1 μM tRA (1 : 1000 Verdünnung der 1 mM tRA-Lösung in DMSO) im Kulturmedium stimuliert (Kogai et al. 2000, Spitzweg et al. 2003).

Nach der Inkubation wurden die Zellen im Lichtmikroskop auf Konfluenz überprüft.

Zu Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit einem Volumen von 1 ml HBSS-Medium gewaschen. Das Waschmedium wurde abgesaugt und ein Volumen von je 0,5 ml des Na^{125}I -haltigen Mediums (pro Well: 500 μl HBSS + 10 μmol NaI + 1 μCi Na^{125}I) auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden für 1 h bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

Im Anschluss wurden die Zellen in einem zeitkritischen Schritt zweimal mit einem Volumen von 0,5 ml eisgekühltem HBSS-Puffer gewaschen, um nicht aufgenommenes Iod zu entfernen (Gärtner (2009)). Der Waschvorgang muss schnell erfolgen, da das Iod relativ schnell wieder aus den Zellen diffundiert und dies durch warme Medien sowie längere Waschzeiten verstärkt wird und somit zu einer Verfälschung der Messwerte führt (Gärtner (2009)). Der Waschvorgang wurde von zwei Personen ausgeführt, wobei einer den Überstand absaugte und der andere sofort den neuen Puffer pipettierte. Auf diese Weise wurde Reihe für Reihe bearbeitet. Nach dem zweiten Waschschrift mit eisgekühltem HBSS-Puffer wurde ein Volumen von 0,5 ml gekühlter Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von etwa 45 min zeigte sich eine Ablösung der Zellen. Das Lysat wurde in beschriftete Messröhrchen überführt, das Well mit einem weiteren Volumen von 0,5 ml Lysepuffer ausgespült und ebenfalls in das jeweilige Messröhrchen pipettiert. Die Messung erfolgte über 10 min im γ -counter (Messmethode: Thalliumaktivierter NaI-Kristall).

Als Kontrollen wurden bei jeder Messreihe Radioiodidaufnahme-Duplikets bestimmt: Zellen ohne radioaktives Iod im Medium, Zellen mit Na^{125}I , Na^{125}I und DIDS, Na^{125}I und KClO_4 sowie Na^{125}I mit KClO_4 und DIDS.

Das Perchlorat hemmt dabei selektiv die NIS-vermittelte Iodid-Aufnahme in die Zellen. DIDS (4,4'-Diisothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonat) ist ein nicht-selektiver Anionenkanalblocker (Cabantchik und Greger 1992). Wie in der Literatur beschrieben, wurde eine Konzentration 1 mM DIDS verwendet (Amphoux-Fazekas et al. 1998, Shennan 2001, Manley et al. 2005).

2. 15. 2 Radioiodidaufnahmeversuche: Verlaufskurven mit / ohne Zeocin

Als Vorversuch für die *in vivo* Experimente wurden die stabil transfizierten Kulturen von HT29 und MCF-7 auch ohne den Zeocinselektionsdruck kultiviert. Nach einigen Zellkulturpassagen wurde dann u. a. mit Hilfe des Radioiodidaufnahmeversuchs überprüft, ob und in wie weit sich die Radioiodidaufnahme der Kulturen, die ohne Zeocin gehalten wurden, von denen unterschied, bei denen parallel das Selektionsmedium beibehalten wurde.

2. 15. 3 Radioiodidaufnahmeversuche: parallel zu *in vivo* gehaltene Zellkulturen

Parallel zu den ersten *in vivo* Experimenten wurde ferner ein Teil der Zellkulturen, die in die Mäuse injiziert wurden, weiterkultiviert (mit und ohne Zeocin). In regelmäßigen Abständen wurde ebenfalls mit Hilfe des Radioiodidaufnahmeversuchs überprüft, ob und in wie weit sich die Radioiodidaufnahme der Kulturen, die ohne Zeocin gehalten wurden, von denen unterschied, bei denen parallel das Selektionsmedium beibehalten wurde. Diese Analyse sollte als grober Anhaltspunkt für die hNIS-Expression in den sich bildenden Tumoren *in vivo* sowie als Verlaufskontrolle dienen.

2. 15. 4 Radioiodidaufnahmeversuche mit und ohne DIDS

Die Zellen wurden analog zum Radioiodidaufnahmeversuch vorbereitet. Allerdings wurde dem HBSS-Inkubationsmedium, je nach Versuchsarm, 1 mM DIDS (Amphoux-Fazekas et al. 1998, Shennan 2001, Manley et al. 2005) hinzugefügt oder nicht. Als Kontrollen wurden bei jeder Messreihe Radioiodidaufnahme-Duplikats bestimmt: Zellen ohne radioaktives Iod im Medium, Zellen mit Na^{125}I , Na^{125}I und DIDS, Na^{125}I und KClO_4 sowie Na^{125}I mit KClO_4 und DIDS. Kaliumperchlorat (KClO_4) diente hierbei als bekannter Blocker der Iodaufnahme. Nach dem zeitkritischen zweifachen Waschen wurden die Zellen zunächst bis zu den einzelnen Messpunkten in nicht-radioaktivhaltigem Puffer mit / ohne 1 mM DIDS inkubiert. Der Überstand wurde zum Zeitpunkt des Messpunktes (2, 5, 10, 20, 30 oder 45 min) abgenommen und in ein Messröhrchen überführt. Die Zellen wurden noch einmal schnell mit

einem Volumen von 0,5 ml eisgekühltem HBSS-Medium gewaschen, dieses abgesaugt und Lysepuffer auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubation von mind. 45 min wurde das Lysat in Messröhrchen überführt, das Well mit weiteren 0,5 ml Lysepuffer ausgespült und ebenfalls in das jeweilige Messröhrchen pipettiert.

In einem zweiten Versuchsaufbau wurden die Zellen im DIDS-Versuchsarm nicht nur erst nach dem Waschen mit DIDS inkubiert, sondern bereits vorher, d. h. auch schon während der Inkubation mit ^{125}I war dem Medium DIDS zugesetzt.

Die Messung erfolgte immer über 10 min im γ -counter.

2. 16 *In vivo* Experimente: Tiermodelle

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der BSG mit der Genehmigungsnummer für beschriebene Tierexperimente G06/11 durchgeführt.

Es handelte sich um SCID-Mäuse, die frühestens nach einer einwöchigen Akklimatisierung für die Versuche verwendet wurden. Die Versuchstiere wurden unter sterilen Bedingungen in Käfigen mit einer Besatzdichte von maximal fünf Tieren pro Käfig im zentralen Tierstall des UKE im Campus Forschung in klimatisierten Räumen mit automatischem Lichtprogramm (zwölf Stunden Licht- / Dunkelrhythmus und ggf. verwendetem Rotlicht) gehalten. Die Mäuse wurden ad libitum mit sterilem Wasser und Standardfutter versorgt. Die Versuche wurden nur tagsüber durchgeführt.

2. 16. 1 Xenotransplantation

Es wurden mykoplasmennegative „HT29 post 2. sort“ und native BxPc3 und HT29 - Zellen unter sterilen Bedingungen subkutan über der rechten Scapula in die SCID-Mäuse injiziert. Hierzu wurden die Zellen wie zur Passage behandelt, allerdings zweimal mit PBS gewaschen, und ein Rest weiterkultiviert. Die Zellzahl wurde mit der Neubauerkammer bestimmt. Da pro Maus 1×10^6 Zellen injiziert wurden, wurde das entsprechende Volumen der Zellsuspension für 3 min mit 1500 RPM zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet in einem Volumen von 200 μl RPMI aufgenommen und zur Injektion verwendet. Zur Injektion wurden die Mäuse kurz in CO_2 / O_2 -Narkose gelegt.

2. 16. 2 Anästhesie und Euthanasie

Für die Xenotransplantation wurde eine CO₂ / O₂-Narkose verwendet. Bei der nicht-invasiven Bildgebung wurde eine 2 %-ige Isofluran-Inhalationsnarkose benutzt. Zur Formalinfixierung der Mausorgane wurde eine Ketamin-Rompun-Narkose verwendet. Ketamin-Rompun-Narkose: 2 ml Ketamin + 0,25 ml Rompun + 7,75 ml NaCl.

Pro 25g Mausekörpergewicht wurde ein Volumen von 200 µl i. p. injiziert.

2. 16. 3 Radionuklidaufnahme *in vivo*

Nach Bildung eines ca. 400 mm³ großen Tumors wurde die Radionuklidaufnahme (¹²⁵I, ^{99m}Tc) des Tumorgewebes untersucht. Zunächst wurde die Aufnahme von Iodid getestet, später die von ^{99m}Tc.

Den Mäusen wurden jeweils 1,1-1,5 MBq ¹²⁵I bzw. 0,92 MBq ^{99m}Tc i.v. bzw. 2,12 MBq ^{99m}Tc über einen liegenden Katheter in die Schwanzvene injiziert. Die Zirkulationszeit der Radioaktivität betrug 1 h. Danach wurden die Mäuse unter Ketamin-Rompun-Narkose geopfert. Um die Organmesswerte nicht durch im Blut befindliche Aktivität zu verfälschen, wurden bei den narkotisierten Mäusen der Thorax eröffnet, das rechte Atrium eröffnet, der linke Ventrikel punktiert und mittels NaCl-Infusion das zirkulierende Blut ausgeschwemmt. Anschließend wurden einzelne Organe sowie die Primärtumoren herauspräpariert, zum Teil aufgrund ihrer Größe zerteilt und in beschriftete Messröhrchen gegeben. Einige Mäuse wurden auf diese Weise auch in Formalin fixiert. Die Organe wurden einzeln präpariert und im γ -counter gemessen.

2. 16. 4 *In vivo* Bildgebung

Nach Bildung eines ca. 400 mm³ großen Tumors wurde eine *in vivo* Bildgebung mit ^{99m}Tc und einer klinischen γ -Kamera (Symbia; Klinik für Nuklearmedizin, UKE) durchgeführt. Untersucht wurden Mäuse mit Tumoren von HT29 post 3. sort und native BxPc3 und HT29 -

Zellen. Es erfolgte eine Narkose mit 2 % Isofluran. Den Mäusen wurden jeweils etwa 1,1 MBq ^{99m}Tc i.v. über einen liegenden Katheter in die Schwanzvene injiziert. Die Bildgebung wurde nach 75 min gestartet. Es wurden statische (für 10 min) und dynamische Aufnahmen (eine Aufnahme pro Minute über 60min; ein im Ergebnisteil abgebildetes Bild entstand zum Zeitpunkt $t_1 = 1,5$ h nach Injektion der Radioaktivität, das andere zum Zeitpunkt $t_2 = 2,5$ h nach Radionuklidinjektion) gemacht.

Des Weiteren wurden Aufnahmen mit einem Kleintier- SPECT / CT (Berlin Charité Zentrum für präklinische Bildgebung (SAIC: Small Animal Imaging Center); Institut für Nuklearmedizin) gemacht. Die Versuchstiere haben 1 h vor der Messung etwa 120 MBq ^{99m}Tc intravenös über die Schwanzvene erhalten. die Messung erfolgte unter 1-2 % Isoflurannarkose.

2. 17 Immunhistochemie

Es wurden in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Zellpellets sowie Schnitte von Maustumoren gefärbt. Die Gewebe wurden zuvor in 4% Paraformaldehyd in 0,1M Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2 - 7,4 gelöst und anschließend für 24h bei RT fixiert (die Zellpellets vgl. 2. 9. 8). Hierbei wurden Zellpellets von nativen und hNIS GVO MCF-7 -Zellen verwendet sowie Schnitte von HT29 GVO hNIS-positiven und -negativen (also ein nativer HT29 -Tumor) Maustumoren und eine Schilddrüse genommen. Zunächst wurden die Zellen entparaffiniert. Es erfolgte eine Vorbehandlung mit einem Steamer (steamer retrieval Sol., DAKO 1699; Verdünnung 1 : 10) bei einer Temperatur von 121 °C für 10 min. Anschließend wurde für 5 min mit Aqua dest., zweimal für 5 min mit TBST und einmal für 5 min mit TBS gespült. Die unspezifischen Bindungen wurden mit Kaninchenserum (rabbit serum DAKO) in einer Verdünnung von 1 : 10 in TBS für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Inkubation mit den primären Antikörpern erfolgte in einer jeweils zuvor ermittelten Verdünnung von 1 : 150 bzw. 1 : 75 (anti-hNIS bzw. Isotypkontrolle: Maus IgG1 DAKO) bei einer Temperatur von 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die nicht-gebundenen Antikörper durch zweimalige Spülung mit TBST und einmaliger Spülung mit TBS jeweils für 5 min entfernt. Es schloss sich die Inkubation mit dem Detektionssystem an. Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem ABC AP Komplex in TBS für 30 min bei RT. Nach zweimaligem Spülen mit TBS für jeweils 5 min wurde für 15 min mit permanent red gefärbt. Gestoppt wurde mit Leitungswasser für 10 min und an-

schließender Spülung mit Aqua dest. für 5 min. Die Kerngegenfärbung mit Hämalaun erfolgte für 7 sec. Dann wurde mit fließendem Leitungswasser für 10 min gebläut, für 5 min mit Aqua dest. gespült und zum Schluss eingedeckt.

Die gefärbten Schnitte wurden mittels MIRAX digitalisiert und photographiert.

2. 18 Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm Graph Pad Prism (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde ein t-Test für zwei unabhängige Variablen sowie eine one way ANOVA durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde $p < 0,05$ gewertet. Die Abbildungen im Ergebnisteil zeigen Mittelwerte und Fehlerbalken. Berechnet wurden Mittelwerte sowie SD und SEM (standard deviation bzw. Standardabweichung und standard error of the mean bzw. Standardfehler).

3. Ergebnisse

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es stabile hNIS-positive, überexprimierende Zellen zu generieren. Diese sollten dann im Labor etabliert und weiter untersucht werden. Hierzu erfolgte zunächst die bakterielle DNA-Amplifikation der gelieferten Vektoren (pcDNA3.1/Zeo(+)) und pcDNA3.1/Zeo(+)-hNIS) sowie die Versuche zur Bestimmung der für die nativen humanen Tumorzellen minimalen toxisch-letalen Antibiotikumkonzentration. Die Korrektheit der Amplifikate wurde mittels diagnostischen Restriktionsverdaus und anschließender Agarosegelelektrophorese im Vergleich zu den Originalplasmiden überprüft. Mit der amplifizierten DNA erfolgte die Transfektion. Im Weiteren wurde die erfolgreiche Transfektion mittels Proteinnachweises und physiologischer Testung der Radioaktivitätsaufnahme nachgewiesen. Aufgrund der anfänglich geringen membranösen hNIS-Expressionsrate wurden erfolgreich transfizierte Zelllinien einer durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung bzw. der Zellausdünnung („limiting dilution“) unterzogen. Dadurch wurden die meisten Experimente mit gentechnisch veränderten Organismen der Zelllinien HT29 und MCF-7 durchgeführt. Native Zellen wurden mittels tRA zur hNIS-Proteinexpression stimuliert und diese weiter untersucht. Zudem wurden Iodideffluxversuche unternommen, um die Iodidretentionszeit in den Zellen zu verlängern. In den *in vivo* Experimenten wurden HT29 hNIS GVO -Tumoren mit zwei verschiedenen Radionukliden untersucht und mittels Bildgebungsverfahren dargestellt. Die Tumoren wurden auch immunhistochemisch angefärbt.

3. 1 Bestimmung der minimalen toxisch-letalen Antibiotikumkonzentration

Die Versuche zur Bestimmung der für die nativen humanen Tumorzellen minimalen toxisch-letalen Antibiotikumkonzentration liefen über zwei Wochen und wurden teilweise mit anderen Konzentrationen wiederholt, da die Zeocinempfindlichkeit der einzelnen Zelllinien deutlich schwankte (vgl. Tabelle der später verwendeten Zeocinkonzentrationen im Kulturmedium zur Selektion post transfectionem). Eine Zeocinkonzentration von 500µg / ml im Kulturmedium beispielsweise war bei allen Zellkulturen innerhalb weniger Tage letal. Waren nach den zwei Wochen noch Zellen vorhanden, wurden diese mittels Trypanblau - Färbung auf Vitalität hin untersucht.

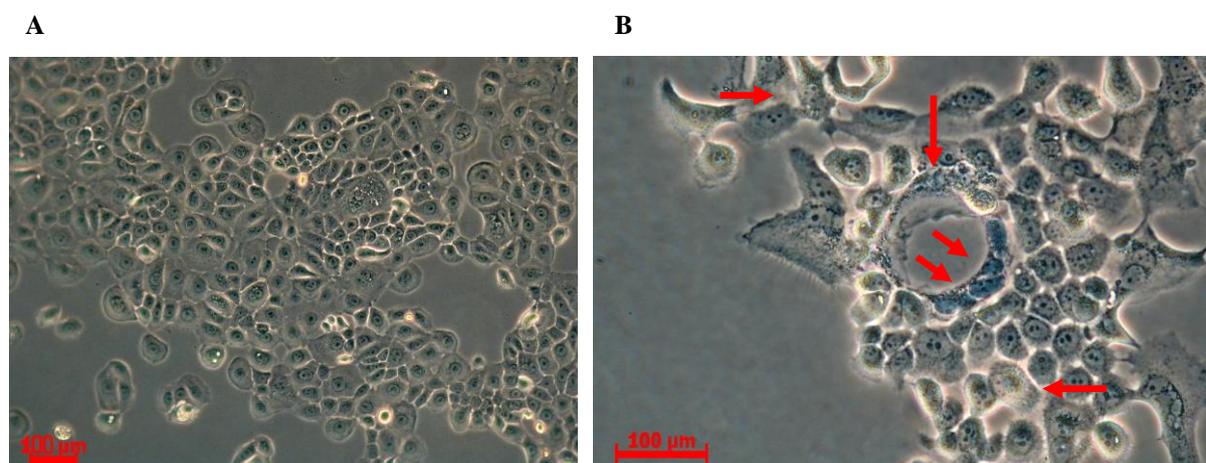


Abb. 10: Die Versuche zur Bestimmung der minimalen toxisch-letalen Antibiotikumkonzentration von Zeocin liefen über zwei Wochen. Beispiele Trypan blau gefärbter BxPc3 -Zellen:

A: Vitale Zellen ohne Zeocinbehandlung, die Zellen sind nicht angefärbt.

B: Letale Zeocindosis, blau- angefärbte vergrößerte Zellen (Pfeile).

Die Abbildung 10 veranschaulicht die morphologischen Veränderungen nativer Zellen, die in einem Medium kultiviert werden, dass eine dauerhaft toxisch-letale Wirkung aufgrund der vorhandenen Zeocinkonzentration auf sie hat (vgl. auch **Abb. 6**). Diese Toxizität zeigte sich bei hohen Antibiotikumkonzentrationen durch einen schnellen Zelluntergang. Bei Konzentrationen, die erst im Verlauf letal waren, traten zunächst die beschriebenen morphologischen Veränderungen auf. Die Zellen wuchsen nicht mehr und im Verlauf der zwei Wochen waren keine Zellen mehr vorhanden.

Tab. 6: Verwendete Zeocinkonzentrationen im Zellkulturmedium

Zelllinie	HT29	MCF-7	MeWo	PaCa 5061	BxPc3
Zeocinkonzentration in µg / ml	200	250	70	22	12

Mit den in der Tabelle 6 gezeigten Zeocinkonzentrationen im Kulturmedium (Selektionsmedium) wurden die transfizierten Zellen inkubiert. Und auch im weiteren Verlauf wurden die gentechnisch veränderten Organismen unter diesen Kulturbedingungen gehalten (Ausnahme: Zeocinauslassversuch s. u.).

3. 2 Transfektion

Mittels GFP-Transfektion wurde geprüft, ob die Transfektion erfolgreich war und jeweils die Transfektionsrate abgeschätzt.

Folgende Zelllinien konnten dauerhaft erfolgreich stabil transfiziert werden: HT29, MCF-7, MeWo und PaCa 5061. Bei den BxPc3 -Zellen gelang keine Aufzucht eines Zellklons. Die HEK 293 -Zellen wurden transient direkt zu den einzelnen Versuchen transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in normalem Kulturmedium kultiviert, bevor die GFP-Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte.

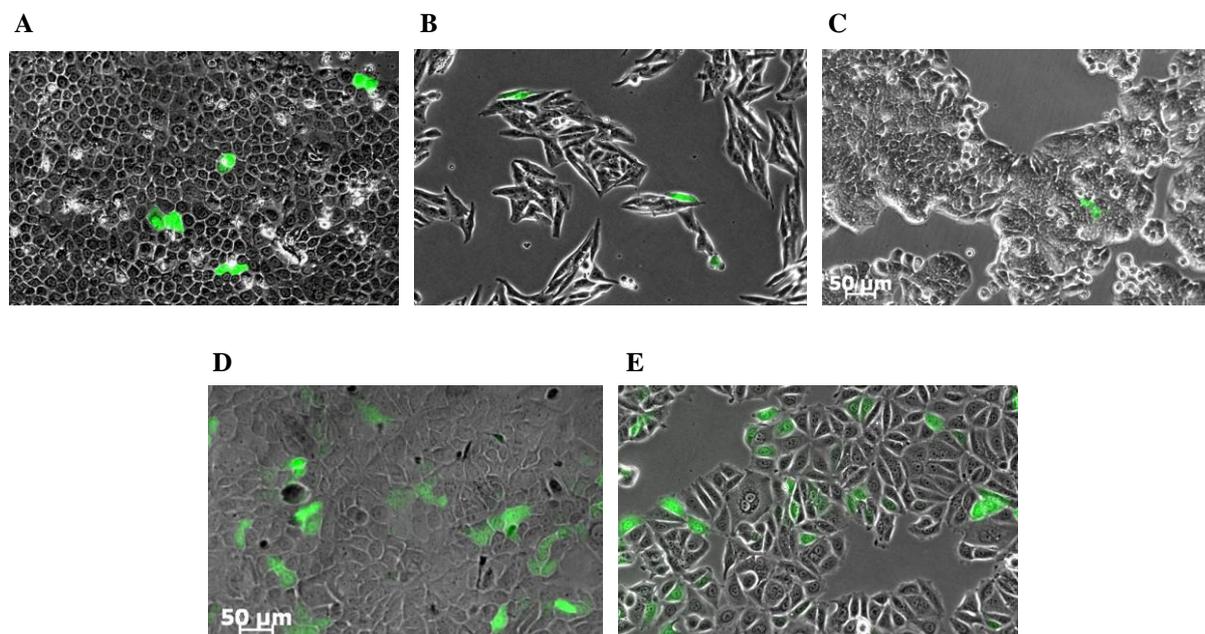


Abb. 11: Beispielaufnahmen von GFP-transfizierten Zellen. Die Wildtypzellen sind in grau, GFP ist grünlich dargestellt. Man erkennt in den jeweiligen Bildausschnitten unterschiedlich große Anteile an grünen Zellen, eine entsprechend unterschiedliche Transfektionsrate.

A: BxPc3, **B:** MeWo, **C:** HT29, **D:** PaCa 5061, **E:** MCF-7.

Es stellte sich heraus, dass die Transfektionsrate bei den verschiedenen Zellarten sehr unterschiedlich war.

Nachdem die GFP-Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgt war, wurden die Zellen lysiert, auf 10 cm²-Petrischalen verteilt und im jeweiligen Selektionsmedium mit entsprechender Zeocinkonzentration kultiviert, sodass nur solche Zellen anwachsen sollten, die die Zeocinresistenz trugen. Als „Negativkontrollen“ wurden auch die GFP-transfizierten Zellen ausgesät. Für diese war das Selektionsmedium stets letal. Es wurde auch mit dem Negativkontrollvektor pcDNA3.1/Zeo(+) transfiziert. Dessen Zellklone dienten anfänglich als zusätzliche Negativkontrolle bei den ersten Experimenten.

Die folgende Abbildung **12** zeigt Beispiele hNIS-positiver Zellklone im Selektionsmedium.

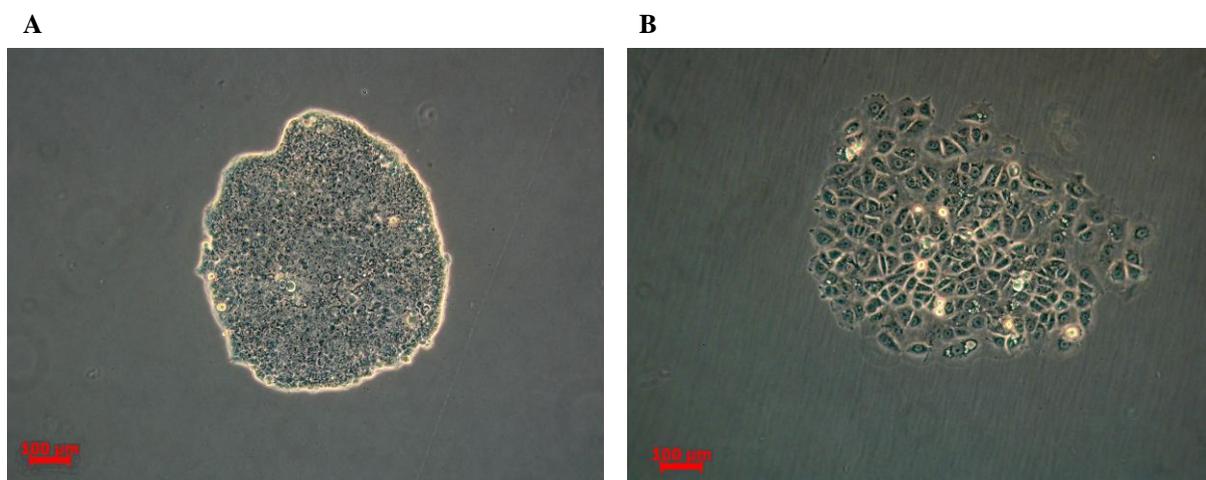


Abb. 12: Beispiele von hNIS GVO-Klonen nach der durchflusszytometrisch-gesteuerten Zell-sortierung im Selektionsmedium. Man sieht jeweils einen einzelnen Zellhaufen / -klon, der von keinen weiteren Zellen umgeben ist. Derart wurden auch die ersten GVO-Klone nach Transfektion herangezogen und kultiviert. Aufnahme mit dem Axiovert.

A: Gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 GVO post 3. sort), **B:** Gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 hNIS GVO post 2. sort).

Die Abbildung **12** zeigt anhand zweier Beispiele, wie trotz des Selektionsdrucks durch eine Zeocinkonzentration, die für native Zellen in den beschriebenen Vorversuchen letal war, einzelne Zellklone wachsen. Da die Zellen trotz des Selektionsdrucks wuchsen, wurde davon ausgegangen, dass sie die Zeocinresistenz des Plasmidvektors trugen. Teilweise fand sich lediglich ein solcher Klon auf einer 10 cm²-Petrischale. Hatten die GVO- Klone eine Größe erreicht, bei der sie gerade makroskopisch-optisch sichtbar in der Petrischale waren, wurden sie mittels der selbst hergestellten Klonierungsringe abgelöst, in 12- bzw. 6-Well-Platten umgesetzt, weiterkultiviert und später selektiert. Die Selektion erfolgte mittels Radioaktivitätsaufnahme. Nur die am meisten Iodid-pumpenden Zellen wurden weiterkultiviert.

3. 3 Bestätigung der NIS-Expression in transfizierten und tRA- stimulierten Zellen

Mit Hilfe der transient transfizierten HEK 293, die bekannter Weise eine gute Transfektions- und eine hohe Expressionsrate aufweisen, wurden die verschiedenen WB- bzw. Durchflusszytometrie- und Objekträgerfärbe- Protokolle und -Antikörper etabliert.

3. 3. 1 Western Blot

Unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers der Maus von neomarkers, der gegen das hNIS-Protein-Epitop der Aminosäuren 625 bis 643 gerichtet ist (Castro et al. 1999a), wurde die hNIS-Expression in Immunpräzipitationsproben sowie in Gesamtproteinlysaten untersucht. Zur Erstellung der Immunpräzipitationsproben wurden Gesamtproteinlysate zuvor mit dem ein extrazellulär gelegenes hNIS-Protein epitop bindenden, monoklonalen Antikörper VJ1 inkubiert (s. Material und Methoden). Aufgetragen wurden transient transfizierte HEK 293, native sowie stabil transfizierte MCF-7 -Proben (s. Abbildung 13).

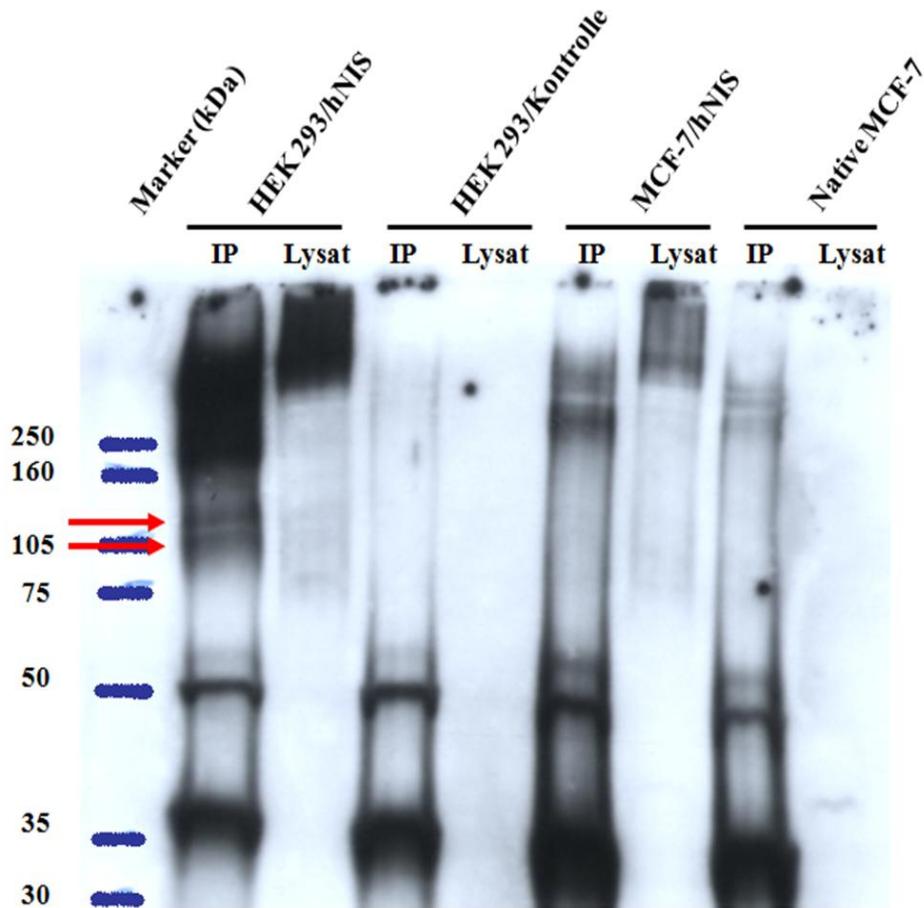


Abb. 13: Western Blot -Analyse nach ECL-Entwicklung mit einer Expositionszeit des Röntgenfilms von 1 min. HEK293 und MCF-7 -Zellen wurden mit hNIS transfiziert und die Zelllysate wurden direkt oder nach Immunpräzipitation aufgetrennt (SDS-PAGE). Nachweis des hNIS-Proteins bei der transient transfizierten HEK 293 IP -Probe (siehe Markierung durch rote Pfeile). Als Negativkontrollen dienten die Proben HEK 293 GVO GFP IP sowie HEK 293 GVO pcDNA+.

Das hNIS-Protein konnte im Western Blot bei den transient transfizierten HEK 293 GVO hNIS - Immunpräzipitationsproben nachgewiesen werden. In der Abbildung sind die zwei Banden mit roten Pfeilen gekennzeichnet, die den bekannten Massen des hNIS-Proteins, je nach Glykosylierung, von 107 kDa, 97 kDa, u. a. entsprechen (Levy et al. 1997 und 1998, Tazebay et al. 2000, Vadysirisack et al., 2007 Dayem et al. 2008, Kogai et al. 2000, Spitzweg et al. 2001).

3. 3. 2 Durchflusszytometrie

Die ersten Durchflusszytometrie-Analysen wurden mit dem Fixationsprotokoll durchgeführt. Anschließend wurde auf das Protokoll ohne Fixation gewechselt und alle via Durchflusszytometrie sortierten hNIS GVO -Zellklone wurden ohne Fixation gefärbt. Als Marker für tote Zellen wurde Propidiumiodid eingesetzt. Nachfolgend sind die Ergebnisse beispielhaft dargestellt.

3. 3. 2. 1 Durchflusszytometrie-Analyse der hNIS GVO HEK 293 -Zellen

Zunächst wurde, wie bereits oben erwähnt, das Fixationsprotokoll mit den HEK 293 durchgeführt. Da bei diesen Zellen der Proteinnachweis im Western Blot gelang, wurden diese transient transfizierten HEK 293 -Zellen verwendet, um das Durchflusszytometrie -Färbeprotokoll zu etablieren. In der auf der nächsten Seite gezeigten Abbildung **14** sind die Durchflusszytometrieergebnisse mit den HEK 293 -Zellen dargestellt.

In der Durchflusszytometrie der transient transfizierten HEK 293 -Zellen zeigte sich eine hNIS-positive Fraktion von ca. 16 % der Zellen.

Nach der Etablierung dieses Protokolls musste aufgrund der Tatsache, dass die Radioaktivitätsaufnahme der hNIS-GVOs in den Radioaktivversuchen abnahm, das Protokoll derart geändert werden, dass die Zellen vital gefärbt werden konnten. Die vitale Färbung ist Grundvoraussetzung für das Weiterleben der Zellen nach der durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung. Deshalb wurde das Protokoll ohne Fixation etabliert und die Zellklone im Folgenden nach dem zweiten Durchflusszytometrie -Protokoll gefärbt. Alle unterschiedlichen Stufen der durchflusszytometrisch-gesteuerten Zellsortierung von HT29 und MCF-7 hNIS GVO- Zellen wurden nach anschließender Zellkultivierung und -expansion durchflusszytometrisch untersucht. Im Folgenden sind jeweils die für spätere Versuche eingesetzten Zellen abgebildet.

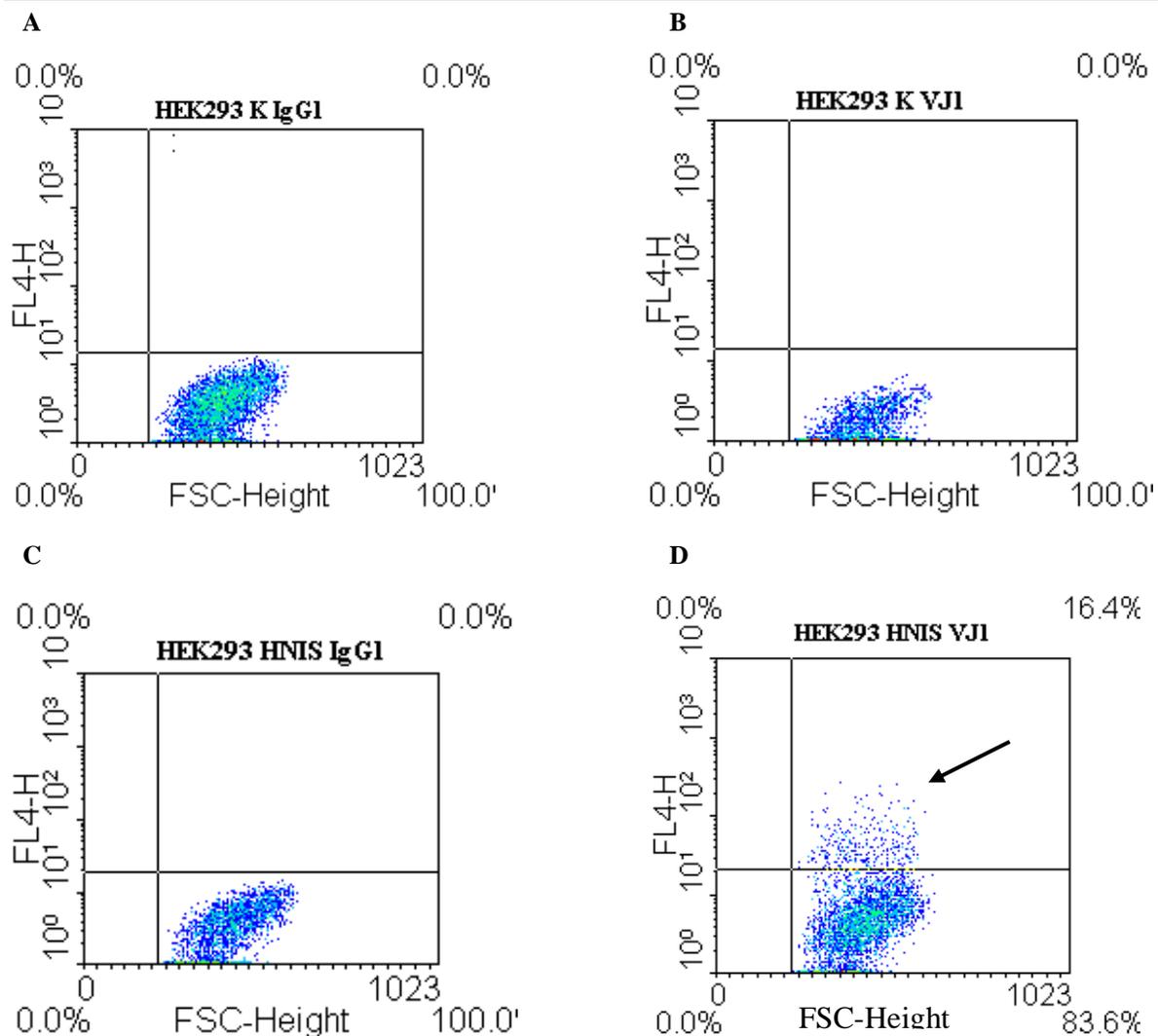


Abb. 14: Durchflusszytometrie: Nachweis der Expression des hNIS-Proteins durch transient transfizierte HEK 293 -Zellen mittels des VJ1-Antikörpers im Fixationsprotokoll. Als Negativkontrolle dienten HEK 293 GVO pcDNA+ -Zellen, also mit dem Plasmidvektor ohne hNIS transfizierte Zellen. Als Marker für tote Zellen wurde Propidiumiodid benutzt. Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre Ziege anti-Maus APC mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Ziege anti-Maus APC war in allen Fällen der sekundäre Antikörper.

A: Isokontrollfärbung der HEK 293 GVO pcDNA+ -Zellen mit dem IsoIgG1-Antikörper als primärem Antikörper.

B: HEK 293 GVO pcDNA+ -Zellen mit VJ1 als primärem Antikörper.

C: Isotypkontrollfärbung der HEK 293 GVO hNIS -Zellen mit dem IsoIgG1-Antikörper als primärem Antikörper.

D: HEK 293 GVO hNIS -Zellen mit VJ1 als primärem Antikörper. Hier sieht man einen Anteil von etwa 16 % hNIS-positiven Zellen, markiert durch den schwarzen Pfeil im Quadranten rechts oben.

In der Durchflusszytometrie der transient transfizierten HEK 293 -Zellen zeigte sich eine hNIS-positive Fraktion von ca. 16 % der Zellen (vgl. **Abb. 14D**).

3. 3. 2. 2 Durchflusszytometrie-Analyse der hNIS GVO MCF-7 -Zellen

In der nachfolgenden Abbildung 15 ist die durchflusszytometrische Analyse der MCF-7 hNIS GVO -Zellen nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung gezeigt. Die Zellen wurden nach dem Nicht-Fixationsprotokoll (s. Material und Methoden) gefärbt.

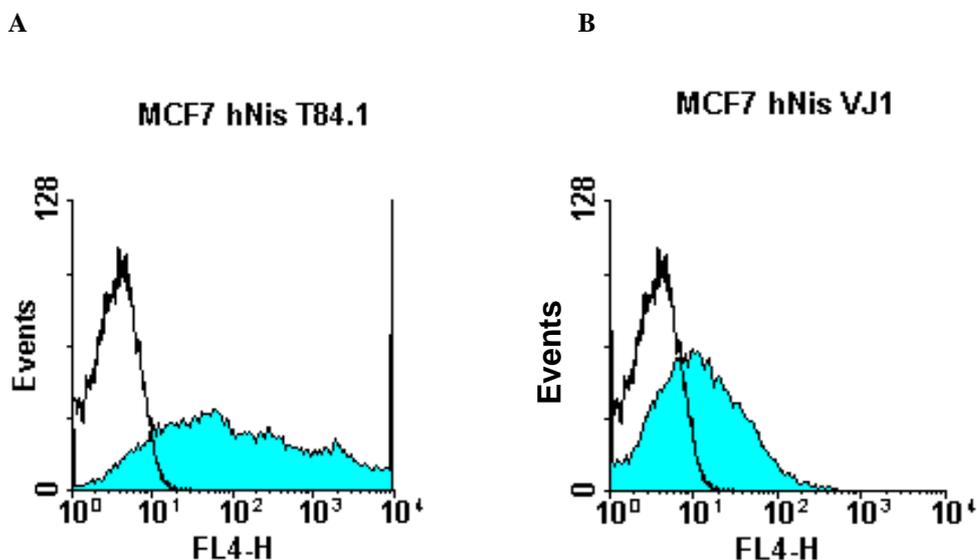


Abb. 15: Durchflusszytometrie: Nachweis der Expression des hNIS-Proteins durch stabil transfizierte gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) mittels des VJ1-Antikörpers im Nicht-Fixationsprotokoll. Als Marker für tote Zellen wurde Propidiumiodid benutzt. Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre Ziege anti-Maus APC -Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Ziege anti-Maus APC war in allen Fällen der sekundäre Antikörper. In beiden Abbildungen (A und B) zeigen die schwarz-weißen Kurven die Isotypkontrollfärbungen mit dem IsoIgG1-Antikörper als primärem Antikörper.

A: Dargestellt sind gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch -gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen). Die hellblaue Kurve zeigt die T84.1- gefärbten Zellen in der Positivkontrollfärbung.

B: Dargestellt sind gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch -gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen). Die hellblaue Kurve zeigt die VJ1-Antikörper gefärbten Zellen. Im Vergleich zu der Isotypkontrolle zeigt sich ein Anteil hNIS-positiver Zellen von > 40 %.

In der Durchflusszytometrie der stabil transfizierten MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen zeigte sich eine hNIS-positive Fraktion von > 40 % der Zellen. Diese wurden daraufhin für die Radioaktivversuche verwendet. Die Durchflusszytometrie -Analysen der vorherigen durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierungsstufen hatten eine prozentual geringere hNIS-Expressionsrate ergeben.

3. 3. 2. 3 Durchflusszytometrie-Analyse der hNIS GVO HT29 -Zellen

In der nachfolgenden Abbildung **16** ist die durchflusszytometrische Analyse der HT29 hNIS GVO -Zellen nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung gezeigt. Die Zellen wurden nach dem Nicht-Fixationsprotokoll (s. Material und Methoden) gefärbt.

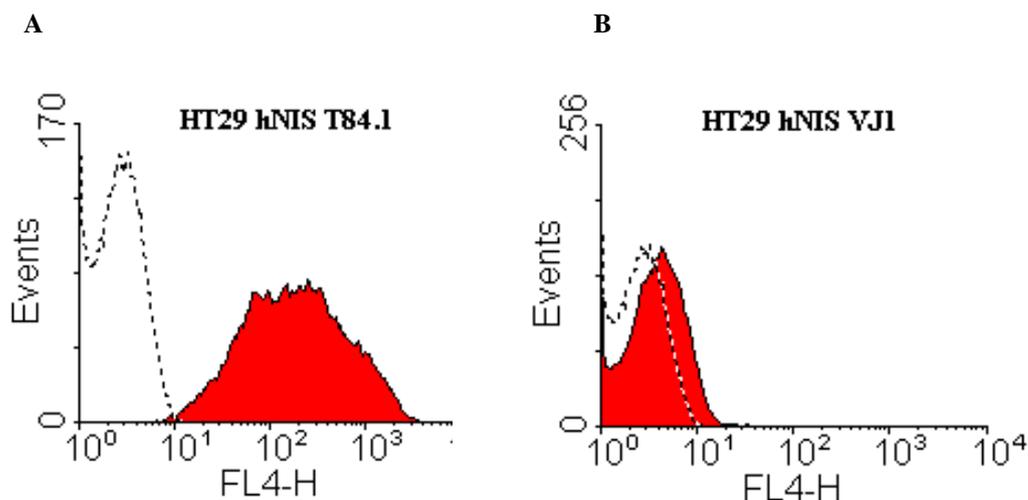


Abb. 16: Durchflusszytometrie: Nachweis der Expression des hNIS-Proteins durch stabil transfizierte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch -gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3.sort -Zellen) mittels des VJ1-Antikörpers im Nicht-Fixationsprotokoll. Als Marker für tote Zellen wurde Propidiumiodid benutzt. Der primäre Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre Ziege anti-Maus APC -Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Ziege anti- Maus APC war in allen Fällen der sekundäre Antikörper.

In beiden Abbildungen (A und B) zeigen die schwarz-weißen Kurven die Isotypkontrollfärbungen mit dem IsoIgG1-Antikörper als primärem Antikörper.

A: Dargestellt sind gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch -gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen). Die rote Kurve zeigt die T84.1-gefärbten Zellen in der Positivkontrollfärbung.

B: Dargestellt sind gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch -gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen). Die rote Kurve zeigt die VJ1-Antikörper gefärbten Zellen. Im Vergleich zu der Isotypkontrolle zeigt sich ein Anteil hNIS-positiver Zellen von < 10 %.

In der Durchflusszytometrie der stabil transfizierten HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen zeigte sich eine hNIS-positive Fraktion von < 10 % der Zellen. Diese wurden daraufhin für die Radioaktivversuche sowie für die ersten *in vivo* Versuche verwendet, da die Durchflusszytometrie-Analysen der vorherigen durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierungsstufen eine prozentual geringere hNIS-Expressionsrate ergeben hatten.

3. 3. 3 Objektträger-Färbung

Als alternative Methode zur oberflächlichen Anfärbung der Zellen neben der Durchflusszytometrie-Analyse wurde die Objektträger-Färbung nach oben beschriebenem Protokoll (s. Material und Methoden) verwendet. Hierbei diente der Antikörper T84.1 als Positivkontrolle für die Färbung. Erfolgreich gefärbte Zellen sind in den folgenden Abbildungen jene mit den grünlich-scheinenden Rändern / Ringen um die blau angefärbten Zellkerne herum. Die runde Form der Färbung spricht für die Zellmembran-ständige Position des Zielproteins.

Alle Zellen (native, tRA-stimulierte, pcDNA3.1/Zeo(+) und pcDNA3.1/Zeo(+)-hNIS -GVOs sowie die FACS-Sortierungsstufen der hNIS -GVOs) wurden auf diese Weise gefärbt. Im Folgenden sind einige Beispiele gezeigt. Man erkennt anhand der Bilder die Schwierigkeit mehrere Zellen gleichzeitig scharf einzustellen, da die Zellen unter dem Deckglas in mehreren Ebenen angeordnet zu liegen kamen. Ferner ist jedes Bild nur ein Beispiel, da die Zellen auf den Objektträger unterschiedlich verteilt zu liegen kamen.

Die auf der nachfolgenden Seite darstellten Beispiele zeigen deutlich, dass die blau-gefärbten Kerne, die - im Falle der erfolgreichen Anfärbung - mit etwas Abstand von grünlichen Ringen umgeben sind:

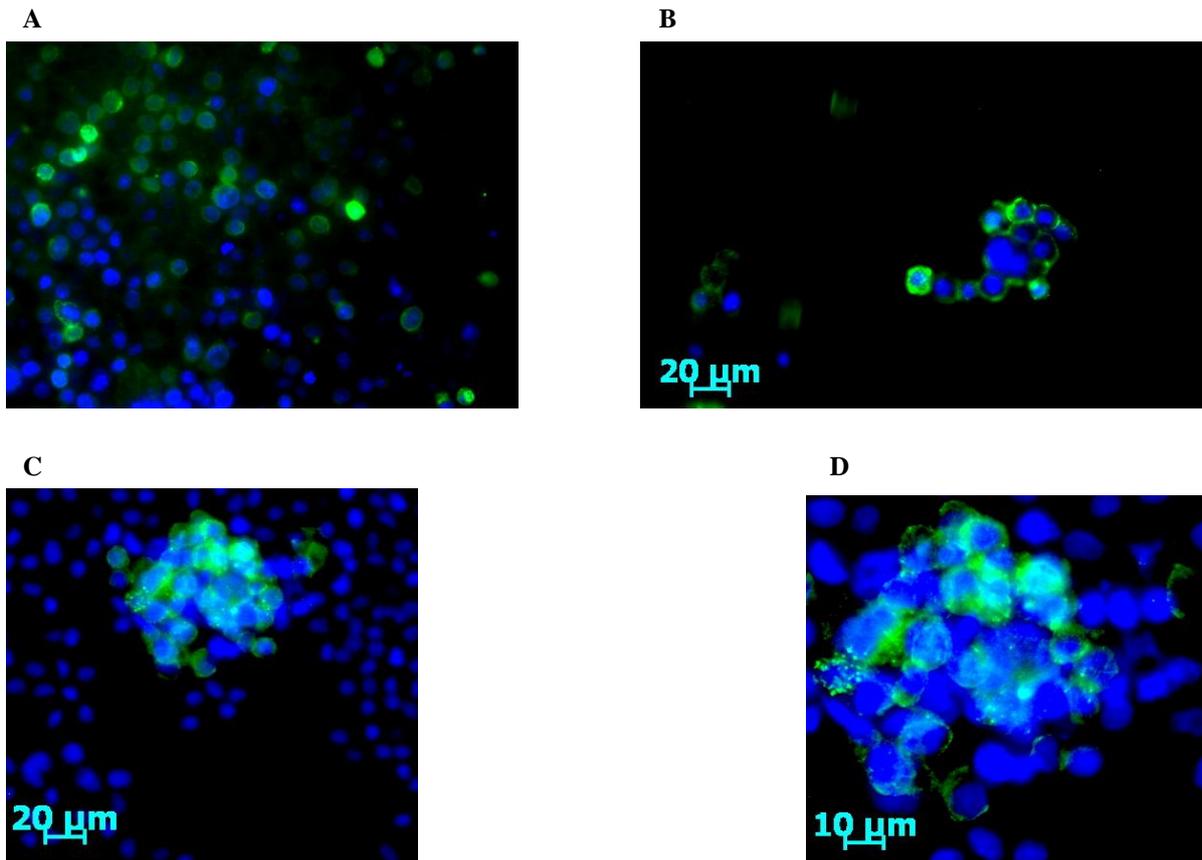


Abb. 17: Objektträger-Färbung: Verschiedene positiv-gefärbte Zellen im Vergleich. Gezeigt sind jeweils höhere durchflusszytometrisch-gesteuert sortierte GVO hNIS-Klone. Es wurden der primäre Antikörper VJ1 oder T84.1, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) eingesetzt. Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) verwendet. Aufnahme mit dem Axiovert 200 und Bildverarbeitung mit Axiovision. Man erkennt jeweils deutlich die membranständige Grünfärbung.

A: Gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 hNIS GVO post 2. sort -Zellen) mit VJ1 als primärem Antikörper.

B: Gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 hNIS GVO post 3. sort -Zellen) mit T84.1 als primärem Antikörper.

C: Gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der ersten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 hNIS GVO post 1. sort -Zellen) mit VJ1 als primärem Antikörper.

D: Gleiches Bild wie C, nur in größerer Vergrößerung.

Man erkennt jeweils die ringförmig-durchscheinende Grünfärbung, die die blau-angefärbten Zellkerne umgibt und in Abbildung **17B** besonders deutlich ist. Dies weist auf eine membranöse Expression des Zielproteins hin. Abbildung **17A** zeigt exemplarisch eine Aufnahme, die eine Häufung hNIS-positiver Zellen zeigt. Abbildung **17C** und **D** zeigen neben der membranständigen grün-Anfärbung auch die unterschiedliche Intensität sowie die Tatsache, dass die Zellen auf dem Objektträger nicht plan in einer Ebene zu liegen kamen, was bei den Aufnahmen auch zu Überlagerungserscheinungen führte.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen jeweils Negativ- und Positivkontrollen sowie VJ1-gefärbte Zellen.

3. 3. 3. 1 Native MCF-7 -Zellen

In der nachfolgenden Abbildung **18** sind exemplarische Bilder für native MCF-7 -Zellen gezeigt.

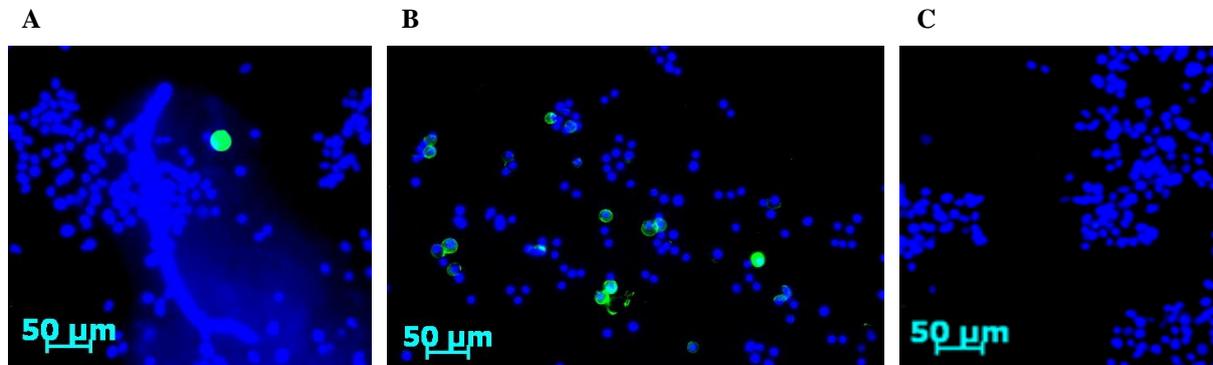


Abb. 18: Objektträger-Färbung: Nachweis der Expression des hNIS durch native MCF-7 Zellen. Der primäre Antikörper (VJ1, IsoIgG1 oder T84.1) wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200 sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) eingesetzt.

A: Dargestellt sind native MCF-7 Zellen in der Isotypkontrollfärbung. In diesem Fall ist beispielhaft eine Aufnahme mit Artefakten gewählt. Von diesen zeigten sich jeweils mehrere auf einem Objektträger. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, grün stellt in diesem Fall ein Artefakt durch unspezifische Bindung des tertiären Antikörpers dar. Dieses Artefakt lag auch in einer anderen Ebene als die blau angefärbten Zellkerne, erkennbar daran, dass es nicht scharf eingestellt ist. Auch die längliche, blau angefärbte Struktur ist ein Artefakt, wahrscheinlich ein Fussel.

B: Dargestellt sind native MCF-7 Zellen in der Positivkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, grün die T84.1-positiven Zellen. Man erkennt < 10 % positiv angefärbte Zellen.

C: Dargestellt sind native MCF-7 Zellen in der VJ1-Antikörperfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, keine Grünfärbung und entsprechend kein hNIS-Nachweis.

Die Färbung zeigte im Vergleich zu den Negativ- und Positivkontrollfärbungen keine hNIS-Expression der nativen MCF-7 -Zellen. Die Artefakte sind u. a. dadurch zu erkennen, dass sie nicht in einer Beziehung zu den blau gefärbten Zellkernen stehen, die Zellen nicht ringförmig umgeben und außerdem im Vergleich zur Positivkontrolle auch deutlich intensiver angefärbt sind. Zudem lagen sie häufig in einer anderen Ebene als die Zellen, was daran zu erkennen war, dass sie in einer anderen Ebene scharf einzustellen waren. Erkennbar u. a. aber auch an der starken Intensität der Färbung bei etwa gleicher Belichtungszeit der Aufnahme wie in der Vergleichsabbildung **B**, so das Artefakt in derselben Ebene zur Darstellung kam. Teilweise zeigten sich auch Verschmutzungen der Objektträger, wie Fussel (vgl. Abb. **18A**).

In der Positivkontrollfärbung mit T84.1 zeigten sich <10% positiv-gefärbte Zellen. Es fanden sich keine VJ1-positiven Zellen, ein Nachweis von hNIS bei den nativen MCF-7-Zellen gelang bei dieser Färbung folglich nicht.

3. 3. 3. 2 Native, tRA-stimulierte MCF-7 -Zellen

In der nachfolgenden Abbildung **19** sind exemplarische Bilder für tRA-stimulierte MCF-7 - Zellen, die durch die Stimulation den hNIS exprimieren sollten, gezeigt. Die nativen Zellen wurden 48 h vor dem Versuch durch Zusatz von 1 μ M tRA im Kulturmedium stimuliert.

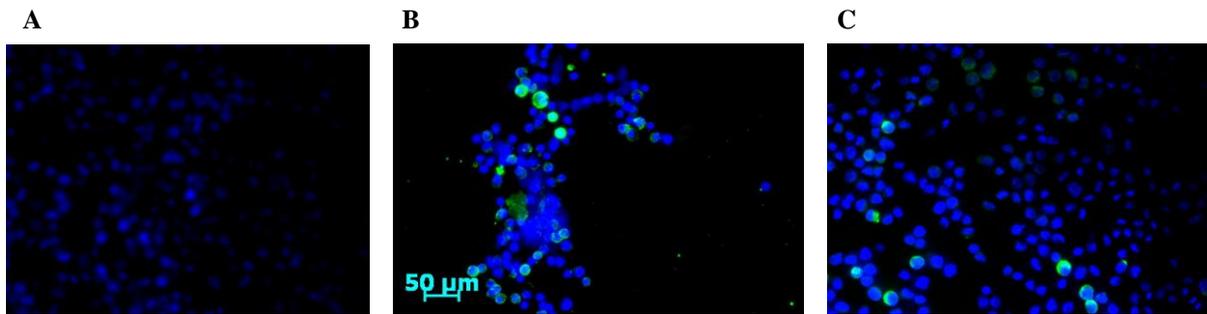


Abb. 19: Objektträger-Färbung: Nachweis der Expression des hNIS durch native, mittels tRA zur hNIS-Expression, stimulierte MCF-7 Zellen. Der primäre Antikörper (VJ1 oder IsoIgG1) wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200 sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) verwendet. Man erkennt in **B** und **C** jeweils die membranständige Grünfärbung.

A: Dargestellt sind tRA-stimulierte MCF-7 Zellen in der Isokontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt. Es ist keine Grünfärbung, d. h. keine Verunreinigung oder NIS-Expression, zu erkennen.

B: Dargestellt sind tRA-stimulierte MCF-7 Zellen in der T84.1-Kontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, grün die T84.1-bindenden Zellen. Etwa ein Drittel der abgebildeten Zellen ist positiv angefärbt.

C: Dargestellt sind tRA-stimulierte MCF-7 Zellen in der VJ1-Antikörperfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, grün die hNIS-positiven Zellen. < 10 % der abgebildeten Zellen ist positiv angefärbt.

Die Färbung zeigte im Vergleich zu den Negativ- und Positivkontrollfärbungen hNIS-positive tRA-stimulierte Zellen (s. **Abb. 19C**). Quantitativ fanden sich weniger hNIS-positive Zellen als bei den entsprechenden MCF-7 GVOs. Mit dieser Färbemethode ergab sich ein Nachweis von etwa <10% hNIS-positiven tRA-stimulierten MCF-7-Zellen.

3. 3. 3. 3 MCF-7 GVO hNIS post 2. sort - Zellen

In der nachfolgenden Abbildung **20** sind exemplarische Bilder für stabil transfizierte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) gezeigt (vgl. Durchflusszytometrie, **Abb. 15**).

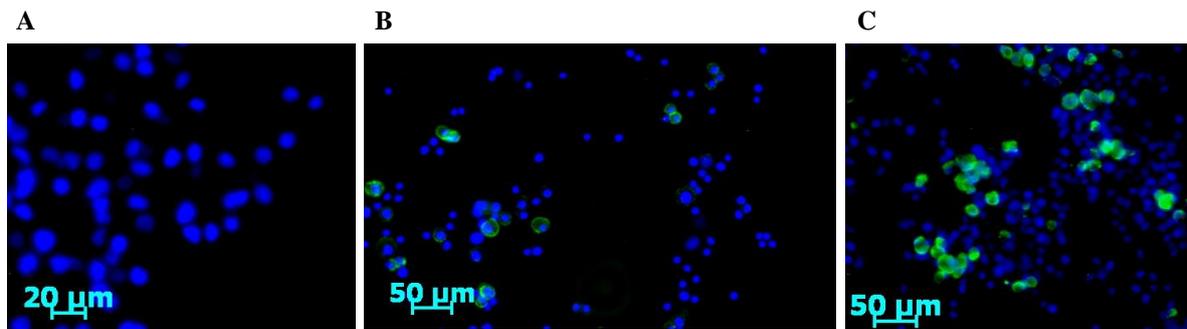


Abb. 20: Objektträger-Färbung: Nachweis der Expression des hNIS durch gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen). Der primäre Antikörper (VJ1, IsoIgG1 oder T84.1) wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200 sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) eingesetzt. In **B** und **C** erkennt man jeweils die membranständige Grünfärbung.

A: Dargestellt sind gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) in der Isotypkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt. Es zeigte sich keine Grünfärbung.

B: Dargestellt sind gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) in der Positivkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, grün die T84.1-positiven Zellen. Etwa 10 % der Zellen sind positiv.

C: Dargestellt sind gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) in der VJ1-Antikörperfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, grün die hNIS-positiven Zellen. Etwa ein Viertel der Zellen erscheinen positiv-angefärbt.

Die Färbung zeigte im Vergleich zu den Negativ- und Positivkontrollfärbungen hNIS-positive MCF-7 GVO -Zellen (s. **Abb. 20C**, vgl. auch **Abb. 19C**). Etwa ein Viertel der dargestellten gentechnisch veränderten MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) zeigten sich mit dieser Färbemethode hNIS-positiv.

3. 3. 3. 4 Native HT29 -Zellen

In der nachfolgenden Abbildung **21** sind exemplarische Bilder für native HT29 -Zellen (vgl. Durchflusszytometrie, **Abb. 16**) gezeigt.

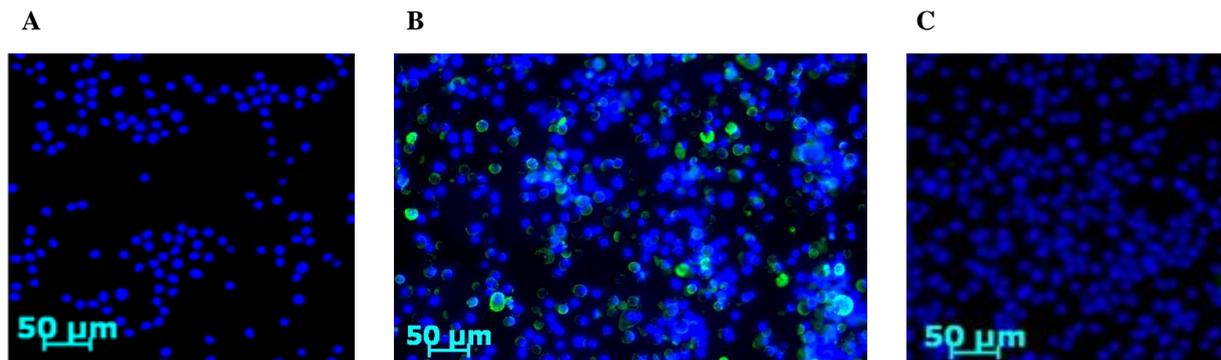


Abb. 21: Objektträger-Färbung: Kein Nachweis der hNIS-Expression durch native Ht29 -Zellen. Der primäre Antikörper (VJ1, IsoIgG1 oder T84.1) wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200 sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) verwendet.

A: Dargestellt sind native HT29 -Zellen in der Isokontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, keine Grünfärbung.

B: Dargestellt sind native HT29 -Zellen in der Positivkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt, grün die T84.1-positiven Zellen. Man erkennt die membranständige Grünfärbung.

C: Dargestellt sind native HT29 -Zellen in der VJ1-Antikörperfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne dargestellt. Es zeigte sich keine Grünfärbung, entsprechend kein Nachweis einer hNIS-Expression durch die nativen HT29 -Zellen.

Die Färbung zeigte im Vergleich zu den Negativ- und Positivkontrollfärbungen keine hNIS-Expression der nativen HT29 -Zellen (**Abb. 21C**).

3. 3. 3. 5 HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen

In der nachfolgenden Abbildung **22** sind exemplarische Bilder für stabil transfizierte HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen (vgl. Durchflusszytometrie, **Abb. 16**) gezeigt.

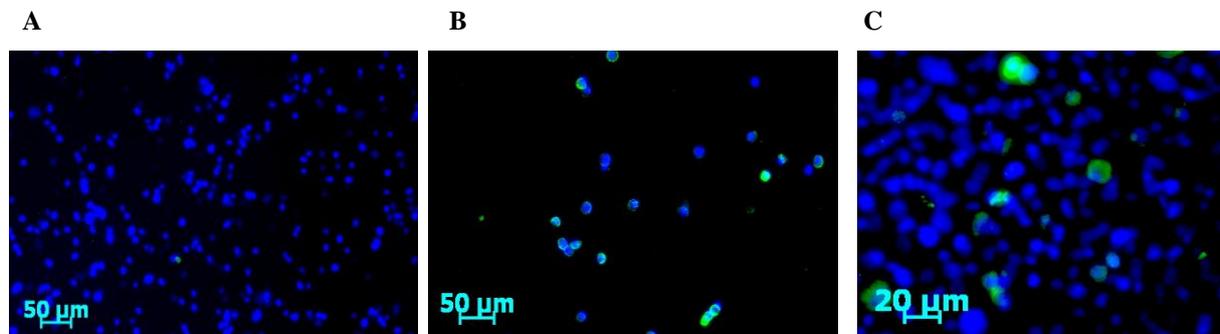


Abb. 22: Objektträger-Färbung: Nachweis der hNIS-Expression durch gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen). Der primäre Antikörper (VJ1, IsoIgG1 oder T84.1) wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200 sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) eingesetzt. In **B** und **C** erkennt man jeweils die membranständige Grünfärbung.

A: Dargestellt sind HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen in der Isotypkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne, grün stellt in diesem Fall ein Artefakt dar.

B: Dargestellt sind HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen in der Positivkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne, grün T84.1-positive Zellen.

C: Dargestellt sind HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen in der VJ1-Antikörperfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne, grün hNIS-positive Zellen.

Die Färbung zeigte im Vergleich zu den Negativ- und Positivkontrollfärbungen hNIS-positive gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen).

3. 3. 3. 6 HT29 und MCF-7 GVO hNIS -Zellen nach durchflusszytometrischer Sortierung ohne Zeocin im Kulturmedium

In den folgenden Abbildungen sind beispielhaft die Färbungen von MCF-7 GVO -Zellen nach der ersten durchflusszytometrischen Sortierung sowie von HT29 GVO -Zellen nach der ersten bzw. der dritten durchflusszytometrischen Sortierung, jeweils etwa eineinhalb bzw. drei Monate ohne Zeocin im Kulturmedium, gezeigt.

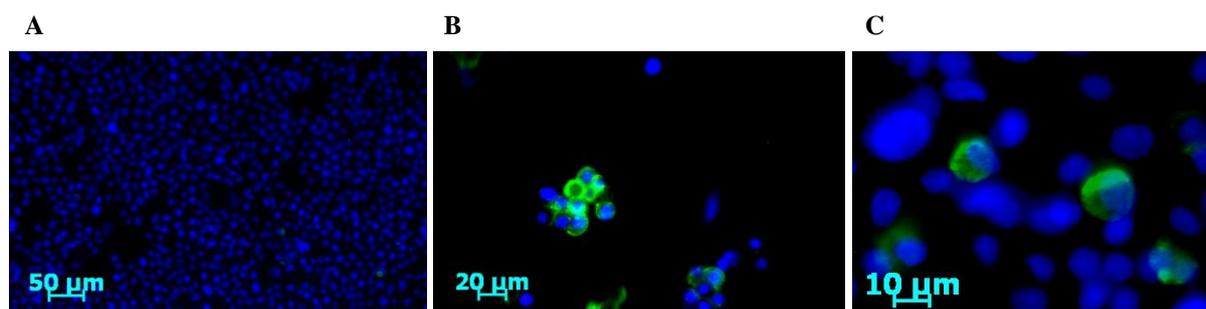


Abb. 23: Objektträger-Färbung: Nachweis der hNIS-Expression durch gentechnisch veränderte HT29 hNIS -Klone nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen) etwa eineinhalb Monate ohne Zeocin im Kulturmedium (vgl. auch **Abb. 27**). Der primäre Antikörper (VJ1, IsoIgG1 oder T84.1) wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200 sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) eingesetzt. In **B** und **C** erkennt man jeweils die membranständige Grünfärbung.

A: Dargestellt sind HT29 GVO hNIS post 1. sort -Zellen in der Isotypkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne.

B: Dargestellt sind HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen in der Positivkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne, grün T84.1-positive Zellen.

C: Dargestellt sind HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen in der VJ1-Antikörperfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne, grün hNIS-positive Zellen.

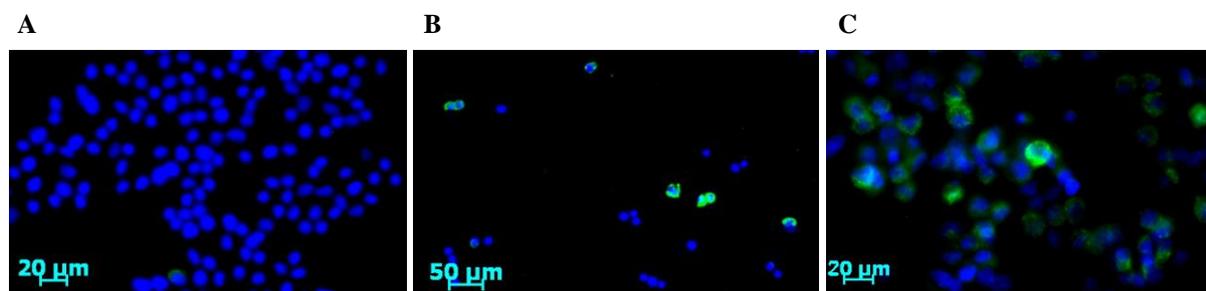


Abb. 24: Objektträger-Färbung: Nachweis der hNIS-Expression durch gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS -Klone nach der ersten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 1. sort -Zellen) etwa drei Monate ohne Zeocin im Kulturmedium (vgl. auch **Abb. 27**). Der primäre Antikörper (VJ1, IsoIgG1 oder T84.1) wurde mit einer Verdünnung von 1 : 50, der sekundäre biotinylierte polyklonale Ziege anti-Maus Antikörper mit einer Verdünnung von 1 : 200 sowie der tertiäre Antikörper Alexa Fluor Streptavidin 488 (grün) mit einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt.

Dapi mounting Medium wurde als Kernfärbung (blau) eingesetzt. In **B** und **C** erkennt man jeweils die membranständige Grünfärbung.

A: Dargestellt sind MCF-7 GVO hNIS post 1. sort -Zellen in der Isotypkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne.

B: Dargestellt sind MCF-7 GVO hNIS post 1. sort -Zellen in der Positivkontrollfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne, grün T84.1-positive Zellen.

C: Dargestellt sind MCF-7 GVO hNIS post 1. sort -Zellen in der VJ1-Antikörperfärbung. Blau angefärbt sind die Zellkerne, grün hNIS-positive Zellen.

Sowohl in **Abb. 23C** als auch in **Abb. 24C** erkennt man, analog zum funktionellen Befund vgl. **Abb. 27**, dass die HT29 bzw. MCF-7 hNIS-GVOs auch ohne den Selektionsdruck von Zeocin über einen längeren Zeitraum (eineinhalb bzw. drei Monate) in Kultur hNIS-positiv angefärbt sind.

3. 4 *In vitro* Experimente mit radioaktiven Nukliden

3. 4. 1 *In vitro* Radioiodidaufnahmeversuche

Im Radioaktivversuch wurde mittels der nachgewiesenen Radioiodidaufnahme untersucht, ob die verschiedenen Zelllinien-Klone das hNIS-Protein funktionell exprimierten. Die Zelllinien MeWo, HT29, MCF-7 und PaCa 5061 konnten erfolgreich transfiziert werden (s. **Abb. 23**). Als Kontrollen dienten jeweils native Zellen bzw. GVO pcDNA+ und tRA-stimulierte Zellen. Weiterhin wurden auch Negativkontrollen der getesteten Zellen mit Kaliumperchlorat, das den NIS-vermittelten Transport blockiert (Carrasco 1993), untersucht.

Erfolgreich transfizierte und ein funktionelles hNIS-Protein exprimierende Zell-Klone wurden durch die nachgewiesene Radioiodidaufnahme identifiziert.

Im Radioiodidaufnahmeversuch zeigten zunächst alle erfolgreich kultivierten hNIS-GVOs eine signifikante Mehraufnahme an Radioaktivität als die jeweiligen Kontrollzellen. Bei den ersten Versuchsdurchläufen wurde auch die Restaktivität in den Zellüberständen (nicht abgebildet) gemessen. Hierbei zeigten sich reziproke Werte zu den Zelllysatzmesswerten.

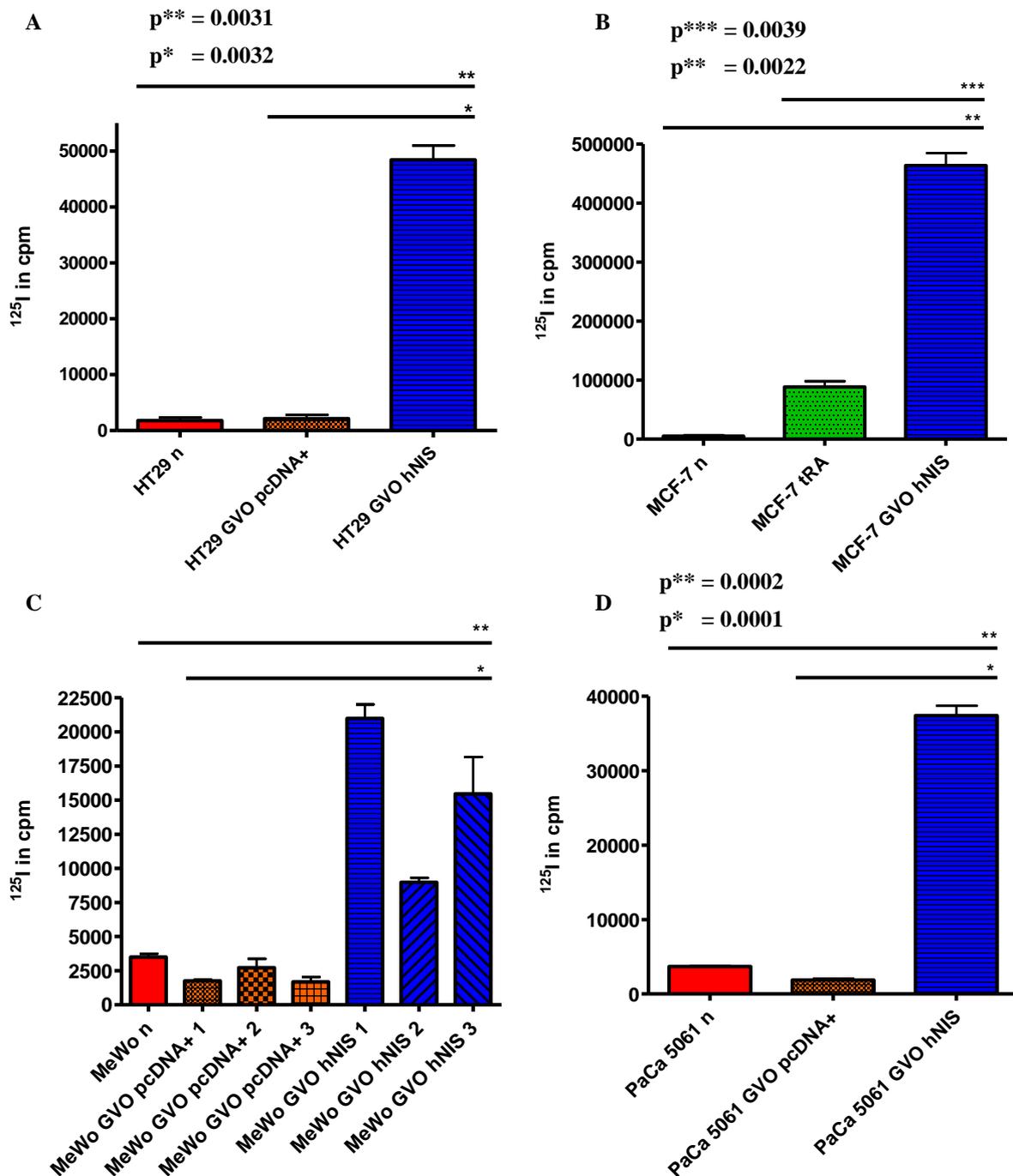


Abb. 25: *In vitro* Radioiodidaufnahme verschiedener gentechnisch veränderter Zellklone sowie nativer Zellen, gentechnisch veränderter Kontrollzellen und tRA-stimulierter Zellen.

A: HT29: Die hNIS GVO -Zellen zeigten, in Bezug auf die Mittelwerte, eine 27-fache Mehranreicherung bzw. eine 23-fache Mehranreicherung an Iodid in Bezug auf die nativen bzw. die Negativkontrollzellen.

B: MCF-7: Die hNIS GVO -Zellen zeigten, in Bezug auf die Mittelwerte, eine 90-fache Mehranreicherung bzw. eine 5-fache Mehranreicherung an Iodid in Bezug auf die nativen bzw. die stimulierten Kontrollzellen.

C: MeWo: Die hNIS GVO -Zellen zeigten, in Bezug auf die Mittelwerte, eine 6-fache Mehranreicherung an Iodid in Bezug auf die nativen Kontrollzellen.

D: PaCa5061: Die hNIS GVO -Zellen zeigten, in Bezug auf die Mittelwerte, eine 10-fache Mehranreicherung bzw. eine 20-fache Mehranreicherung an Iodid in Bezug auf die nativen bzw. die Negativkontrollzellen. $p_{\text{pcDNA}+ 1/\text{hNIS}1} = 0,0029$; $p_{\text{pcDNA}+ 1/\text{hNIS}2} = 0,0021$; $p_{\text{pcDNA}+ 1/\text{hNIS}3} = 0,0369$;

$p_{\text{pcDNA+ 2/hNIS1}} = 0,0045$; $p_{\text{pcDNA+ 2/hNIS2}} = 0,0134$; $p_{\text{pcDNA+ 2/hNIS3}} = 0,0447$; $p_{\text{pcDNA+ 3/hNIS1}} = 0,0032$; $p_{\text{pcDNA+ 3/hNIS2}} = 0,0042$; $p_{\text{pcDNA+ 3/hNIS3}} = 0,0371$; $p_{\text{n/hNIS1}} = 0,0037$; $p_{\text{n/hNIS2}} = 0,0053$; $p_{\text{n/hNIS3}} = 0,0480$

*: Statistisch signifikanter Unterschied in der Radioiodidaufnahme zwischen den pcDNA+ -GVO und den hNIS-GVO -Kulturen.

**: Statistisch signifikanter Unterschied in der Radioiodidaufnahme zwischen den nativen Zelllinien und den hNIS-GVO -Kulturen.

***: Statistisch signifikanter Unterschied in der Radioiodidaufnahme zwischen den mit tRA stimulierten und den hNIS-GVO -Kulturen.

Abbildung **25** zeigt jeweils einen statistisch signifikanten Unterschied in der Aufnahme an Radioaktivität zwischen den nativen Zellen und den hNIS-GVO -Klonen (vgl. jeweils die zu den schwarzen Balken in der Abbildung angegebenen p-Werte). Hier wird, kongruent zu den vorhergehend gezeigten Ergebnissen der verschiedenen Färbemethoden und den jeweiligen Anteilen des exprimierten hNIS-Proteins (vgl. 3.3.2 und 3.3.3), deutlich, dass die MCF-7 und HT29 hNIS-GVO -Klone quantitativ am meisten Radioaktivität aufnahmen (um einen Faktor 90 bzw. 27-mal mehr Radioaktivität als die jeweiligen nativen Kontrollzellen). Im Fall der gentechnisch veränderten MeWo und PaCa 5061 -Zellen zeigte sich allerdings durch wiederholte Durchführung des Radioaktivversuchs, dass die Aufnahme der Radioaktivität mit der Zeit abnahm und sich im zeitlichen Verlauf mehrerer Passagen denen der nativen Kulturen annäherten. Schließlich nahmen diese Zellklone keine - signifikant von der nativen Kultur erhöhte - Radioaktivität mehr auf. Auch bei den HT29 und MCF-7 hNIS -GVOs nahm die Aufnahme der Radioaktivität mit der Zeit in Kultur ab. Allerdings stellte sich dieser Effekt bei den HT29 und MCF-7 hNIS -GVOs als nicht so eklatant, wie bei o. g. Zellen heraus. Deswegen wurden die MCF-7 und HT29 hNIS -GVO-Klone weiterverwendet und durchflusszytometrisch-gesteuert sortiert, damit der Anteil der das hNIS-Protein membranös-exprimierender Zellen in der Zellkultur anstieg.

Die Zellen wurden im Radioaktivversuch auch auf ihre Fähigkeit hin getestet, ein funktionelles hNIS-Protein durch die Stimulation mit tRA zu exprimieren (vgl. **Abb. 25B** und **26**).

Die nächste Abbildung (**Abb. 26**) zeigt außerdem beispielhaft die Auswirkungen von Kaliumperchlorat auf die Radioiodidaufnahme durch HT29 - und MCF-7 - Zellen.

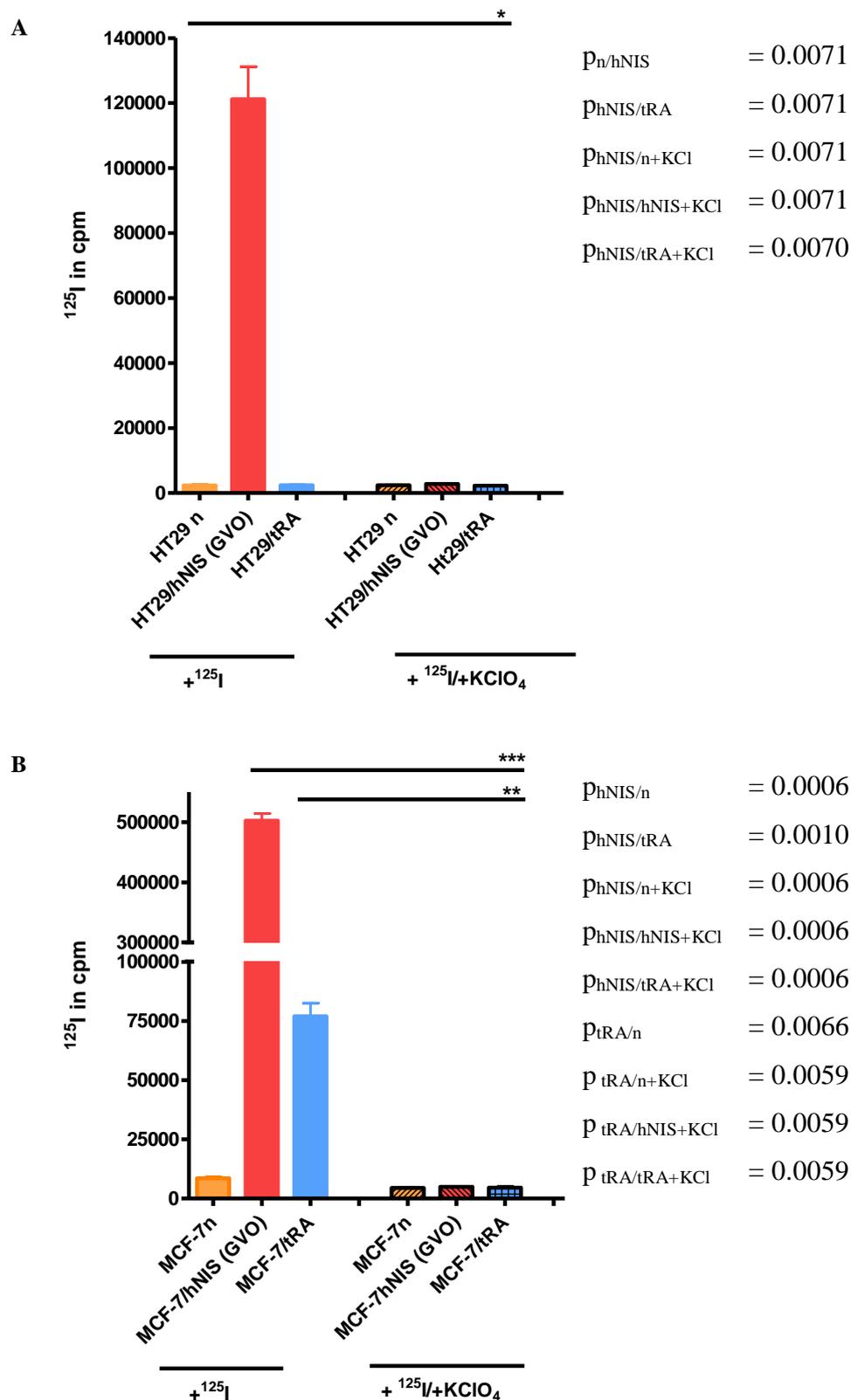


Abb. 26: Radioiodidaufnahmeversuch (^{125}I -Aufnahme): Vergleich von HT29- und MCF-7- Zellen. Die Zellen wurden für 1 h mit $1 \mu\text{Ci}$ pro Probe inkubiert, dann zweimal mit Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Zellsuspension im γ -counter für 10 min gemessen. Dargestellt ist der Unterschied in der Aufnahme von Radioaktivität durch die Blockung mit Kaliumperchlorat, das dem Inkubationsmedium zugesetzt worden war.

A: Messwerte von gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen), HT29 tRA -Zellen (nach 24 h Stimulation mit tRA) sowie nativen Zellen. Die Werte der Perchlorat-blockierten Zellen entsprechen im Wesentlichen denen der nativen Zellen.

*: Der dargestellte Unterschied zwischen den gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen) und allen anderen dargestellten Zellen war signifikant. In Bezug auf die nativen Zellen reicherten die GVOs 526-mal mehr Iodid an.

B: Messwerte von gentechnisch veränderten MCF-7 hNIS -Klone nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen), MCF-7 tRA -Zellen (nach 48 h Stimulation mit tRA) sowie nativen Zellen. In Bezug auf die nativen bzw. die stimulierten Zellen reicherten die GVOs 58,5-mal bzw. 6,5-mal mehr Iodid an. Die stimulierten nativen Zellen reicherten 9-mal mehr Iodid an als die nativen Zellen. Die Mittelwerte der Perchlorat-blockierten Zellen schwankten unterhalb von 5000 cpm, sodass die nativen MCF-7 im Mittel etwas mehr Iodid aufnahmen (weniger als zweimal mehr).

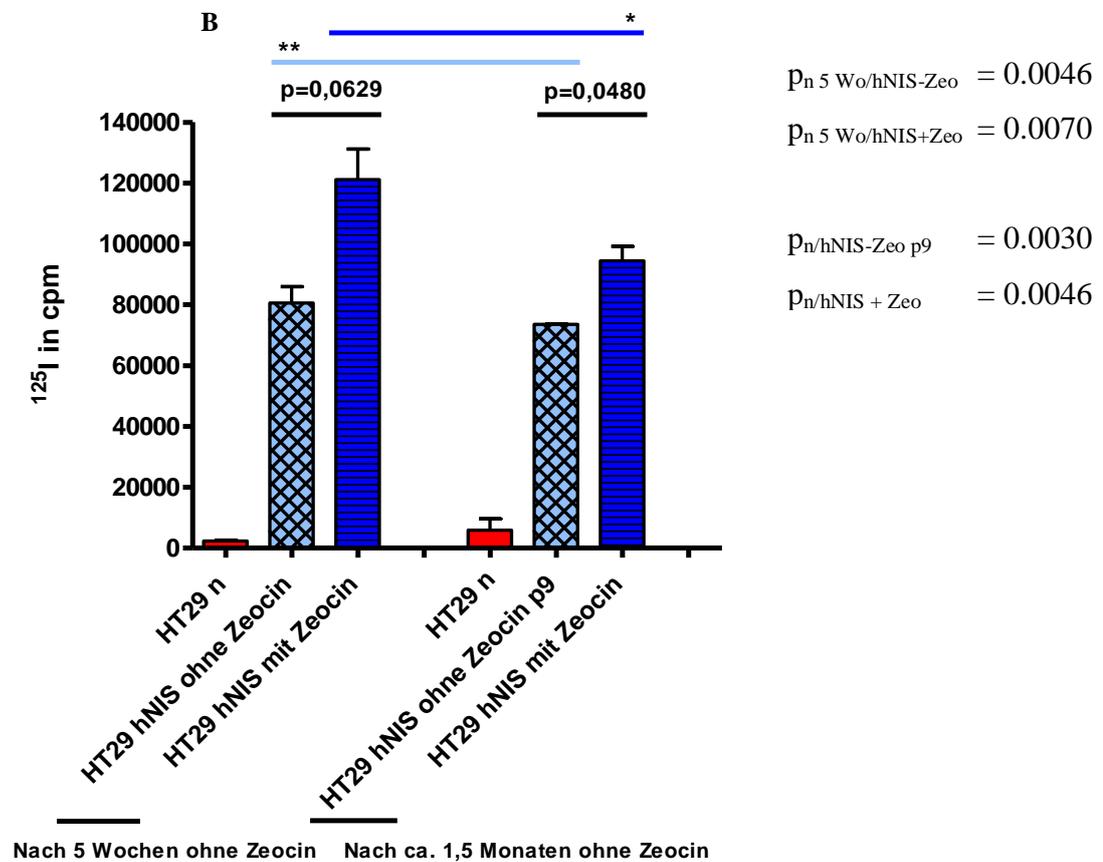
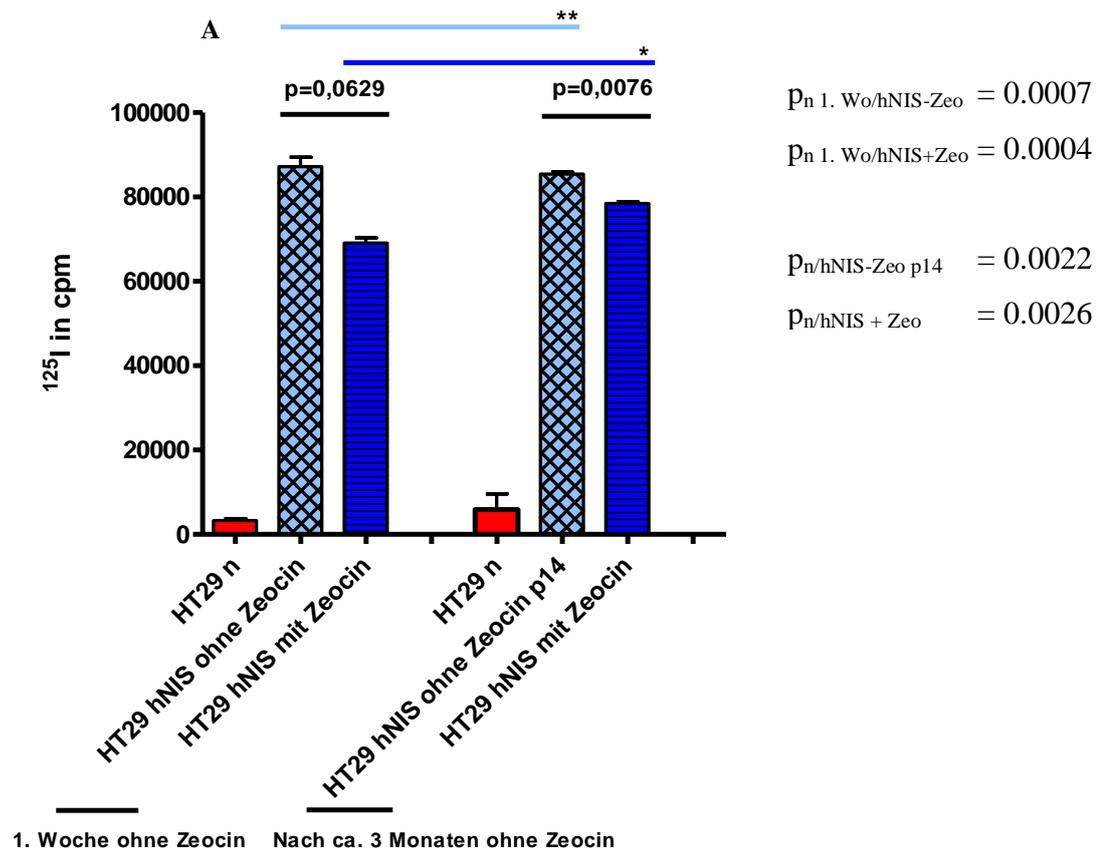
** : Der dargestellte Unterschied zwischen den MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen und allen anderen dargestellten Zellen war signifikant.

***: Der dargestellte Unterschied zwischen den stimulierten Zellen und den mit Kaliumperchlorat blockierten Zellen war signifikant.

Es stellte sich heraus, dass vor allem MCF-7 -Zellen durch tRA zur Expression eines funktionellen hNIS-Proteins gebracht werden konnten. Bei den HT29 -Zellen zeigte sich dies nicht. Bei der wiederholten Durchführung o. g. Experimentes zeigte sich, wie in der Literatur für MCF-7 beschrieben, dass eine 48-stündige Inkubation mit tRA den maximalen hNIS-Expressionseffekt zeigt (Kogai et al. 2000, Spitzweg et al. 2003). Da Ht29 aber keine hNIS-Expression zeigte, wurde nur eine 24h Inkubation durchgeführt, wie oben gezeigt. Für weitere Experimente wurden dann nur die stimulierten MCF-7 -Zellen verwendet. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Kaliumperchlorat die Radioiodidaufnahme signifikant sowohl bei den tRA-stimulierten Zellen als auch bei den GVOs verhindert.

3. 4. 2 Radioiodidaufnahmeversuch: Zellklone mit und ohne Zeocin im Kulturmedium

Zunächst wurde als Vorversuch für die *in vivo* Experimente das Zeocin im Kulturmedium von gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der ersten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 post 1. sort -Zellen) weggelassen. Zeocin wurde auch den Versuchstieren später nicht zugeführt und somit hatten die Tumorzellen in den Versuchstieren keinen Kontakt mit dem Antibiotikum. Im Radioaktivversuch wurde kontrolliert, ob und wie weit dies eine Auswirkung auf die Aufnahme von Radioaktivität hatte (vgl. **Abb. 27A**).



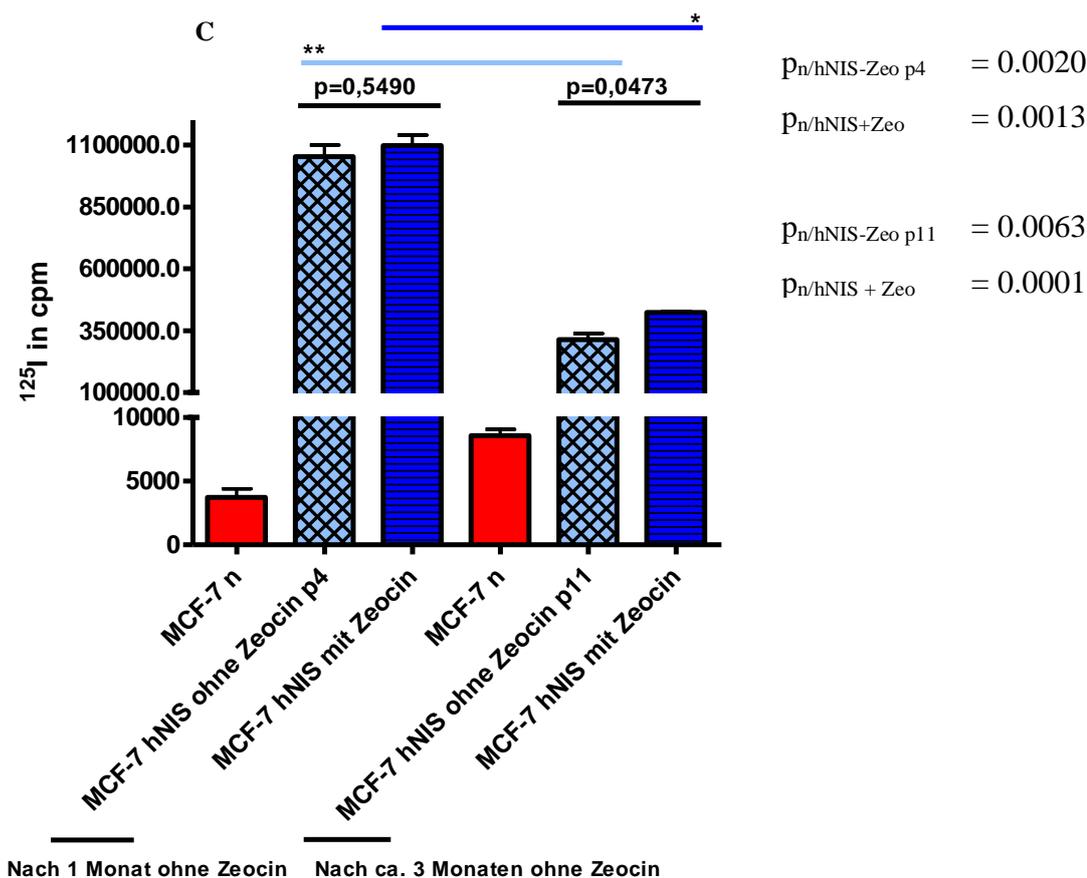


Abb. 27: Zeitlicher Verlauf der Radioiodidaufnahme der verschiedenen gezeigten GVO-Klone in verschiedenen durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierungsstufen mit Zeocin als Selektionsmedium im Vergleich zu Klonen in Kulturmedium ohne Zeocin; beides jeweils mit nativen Zellen als Kontrollpopulation. Der Unterschied der GVOs zu den nativen Zellen war jeweils signifikant.

A: HT29 post 1. sort -Zellen in Kultur mit / ohne Zeocin im Vergleich zur nativen Kultur (21-fach bzw. 26-fach mehr Iodid als die nativen Zellen) nach einer Woche unter diesen Kulturbedingungen sowie nach vierzehn Passagen, also etwa drei Monaten (13-fach bzw. 15-fach mehr Iodid als die nativen Zellen). Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich nach drei Monaten (schwarzer Balken). *: Nach drei Monaten zeigte sich eine statistisch signifikante ($p = 0,0180$) Steigerung der Radioaktivitätsaufnahme bei den GVOs mit Selektionsdruck. **: Nach drei Monaten zeigte sich keine statistisch signifikante ($p = 0,5195$) Reduktion der Radioaktivitätsaufnahme bei den GVOs ohne Selektionsdruck.

B: HT29 post 3. sort -Zellen in Kultur mit / ohne Zeocin im Vergleich zur nativen Kultur nach fünf Wochen (52,5-fach bzw. 35-fach mehr Iodid als die Nativen) unter diesen Kulturbedingungen sowie nach neun Passagen, also etwa nach eineinhalb Monaten (16-fach bzw. 12,5-fach mehr Iodid als die nativen Zellen). Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich nach eineinhalb Monaten (schwarzer Balken). * und **: Nach eineinhalb Monaten zeigte sich weder bei den GVOs mit noch bei denen ohne Zeocin eine statistisch signifikante ($p^* = 0,1379$ bzw. $p^{**} = 0,3175$) Reduktion der Radioaktivitätsaufnahme.

C: MCF-7 post 1. sort -Zellen mit / ohne Zeocin im Vergleich zur nativen Kultur-Zeo nach einem Monat (also nach vier Passagen) unter diesen Kulturbedingungen (294-fach bzw. 282-fach mehr Iodid als die Nativen) sowie nach elf Passagen, also etwa nach drei Monaten (49-fach bzw. 36-fach mehr Iodid als die Nativen). Ein statistisch signifikanter Unterschied zeigte sich nach drei Monaten (schwarzer Balken). * und **: Nach drei Monaten zeigte sich sowohl bei den GVOs mit als auch bei denen ohne Zeocin eine statistisch signifikante ($p^* = 0,0039$ bzw. $p^{**} = 0,0051$) Reduktion der Radioaktivitätsaufnahme.

Dieser Versuch zeigte, dass die stabil-transfizierte GVO-Klone auch ohne den Selektionsdruck des Zeocins das hNIS-Protein weiterhin funktionell membranös exprimierten (statistisch signifikant erhöhte Messwerte im Vergleich zu den nativen Kontrollzellen, vgl. p-Wertangaben jeweils rechts neben der Abbildung; vgl. auch **Abb. 23C** und **24C**). Des Weiteren stellte sich heraus, dass die Abnahme der Radioaktivitätsaufnahme der HT29-Zellen nicht signifikant war und sich im Vergleich mit / ohne Zeocin nicht wesentlich unterschied. Bei den MCF-7-Zellen war die Abnahme statistisch signifikant, im Vergleich zu den Zellen, die weiterhin mit Zeocin in Kontakt standen, aber ähnlich.

Im Anschluss an den Versuch mit gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der ersten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 post 1. sort -Zellen), wurden HT29 -Zellen der dritten Sortierungsstufe (HT29 hNIS post 3. sort -Zellen) in die ersten Versuchsmäuse injiziert und die Kulturen zeitlich parallel mit und ohne Zeocin in Kultur gehalten (vgl. **Abb. 27B**). Auch hier zeigte sich in der Zellkultur keine statistisch signifikante Reduktion der Radioaktivitätsaufnahme der Zellen. Zusätzlich wurde der Versuch auch mit den MCF-7 GVO-Klonen durchgeführt, da diese für spätere *in vivo* Experimente getestet werden sollten. Bei diesen zeigte sich nach drei Monaten ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne Zeocin sowie im zeitlichen Verlauf eine statistisch signifikante Reduktion der Radioaktivitätsaufnahme der Zellen.

3. 4. 3 Versuche zur Iodideffluxhemmung mit DIDS

Um die Iodidretentionszeit in der Zelle zu verlängern, wurde der nicht-selektive Anionenkanalblocker DIDS in einer Konzentration von 1 mM dem Inkubationsmedium im DIDS-Versuchsarm zugesetzt (Amphoux-Fazekas et al. 1998, Shennan 2001, Manley et al. 2005). Die Negativkontrollen hatten normales Medium ohne DIDS. Nach dem Waschvorgang wurden die Zellen in HBSS-Puffer bis zu den einzelnen Messpunkten inkubiert. Die Messpunkte lagen bei 2, 5, 10, 20, 30 und 45 min. Für jeden Messpunkt wurden zwei Messwerte erhoben. Außerdem wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ min Ausgangswerte erhoben und die beschriebenen Kontrollen untersucht (s. Material und Methoden). Da der Versuchsablauf sehr komplex war (durch das zeitkritische Waschen und die hohe Anzahl an Zellen) wurden die Versuche doppelt ausgeführt, um die Auswirkungen möglicher Fehler gering zu halten (vgl. Gärtner 2009). Die Versuche wurden mit HT29 und MCF-7 -Zellen durchgeführt.

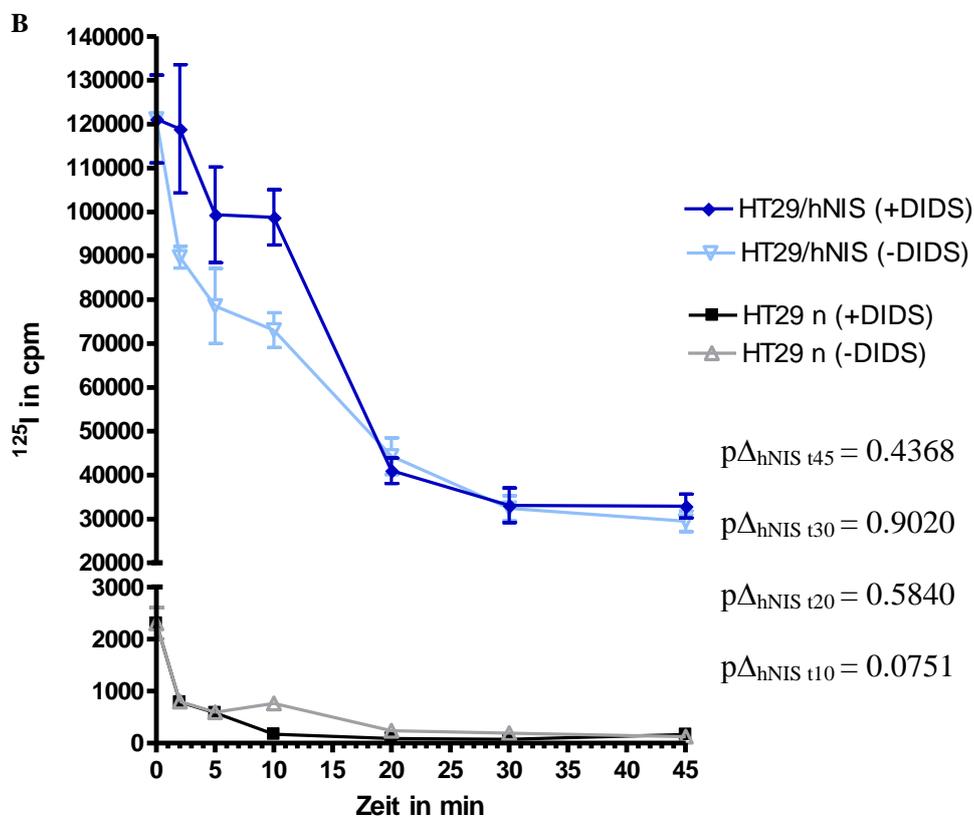
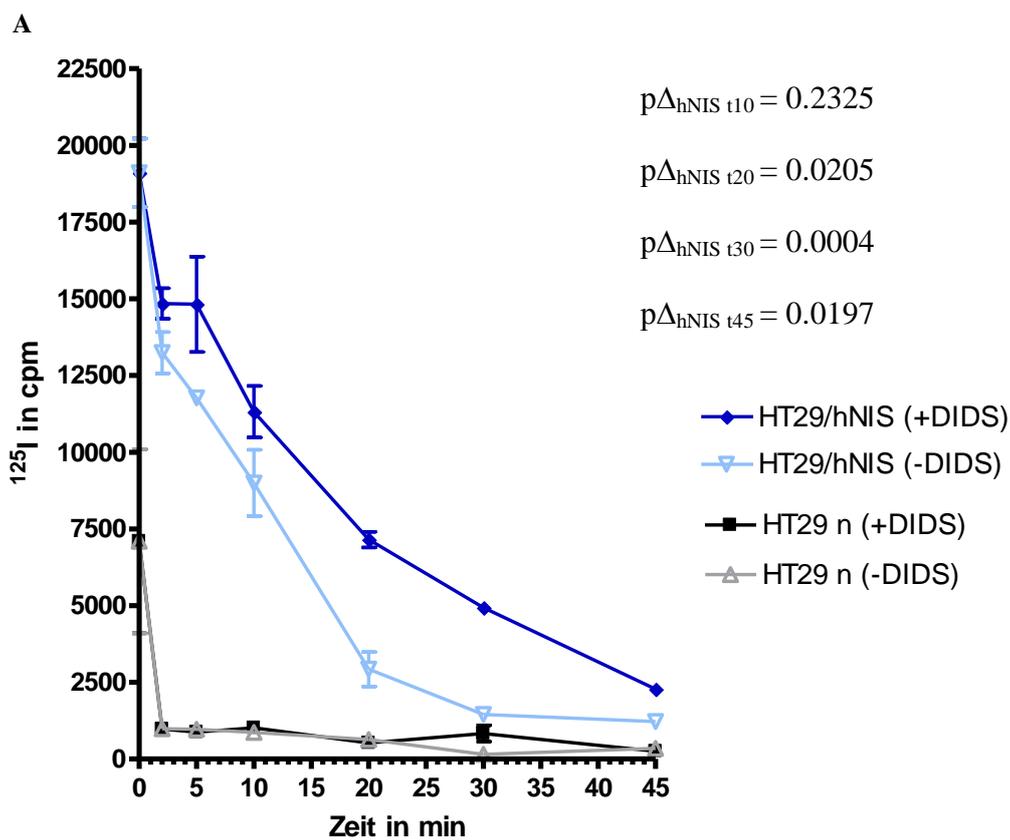


Abb. 28: HT29 -Zellen: Radioiodideffluxversuch mit Hemmung des Effluxes durch DIDS. Die Zellen wurden 1 h mit ^{125}I (1 μCi pro Probe) mit bzw. ohne DIDS mit einer DIDS-Konzentration von 1 mM

inkubiert, anschließend gewaschen und bis zu den Messpunkten (2, 5, 10, 20, 30, 45 min) im HBSS-Puffer inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und für 10 min im γ -counter gemessen.

Dargestellt sind die Zellysatmesswerte von gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 GVO hNIS post 3. sort -Zellen) und von nativen HT29 -Zellen.

$p_{\Delta_{\text{hNIS } t}}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied der Messwerte zum Zeitpunkt t zwischen GVOs mit und ohne DIDS. Der Unterschied zwischen den GVOs und den nativen Zellen war statistisch signifikant.

A: Nur die letzten drei Messwerte zeigten einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den HT29 GVOs mit und ohne DIDS.

B: Hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Der Unterschied zwischen den GVOs und den nativen Zellen war statistisch signifikant (**Abb. 25A** und **26A**). Es zeigten sich teilweise statistisch signifikant erhöhte Messwerte bei den gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung, die mit DIDS inkubiert worden waren, im Vergleich zu denen ohne DIDS. Allerdings - wie auch an den Fehlerbalken in den Abbildungen zu sehen ist - zeigten die Messwerte teilweise große Schwankungen.

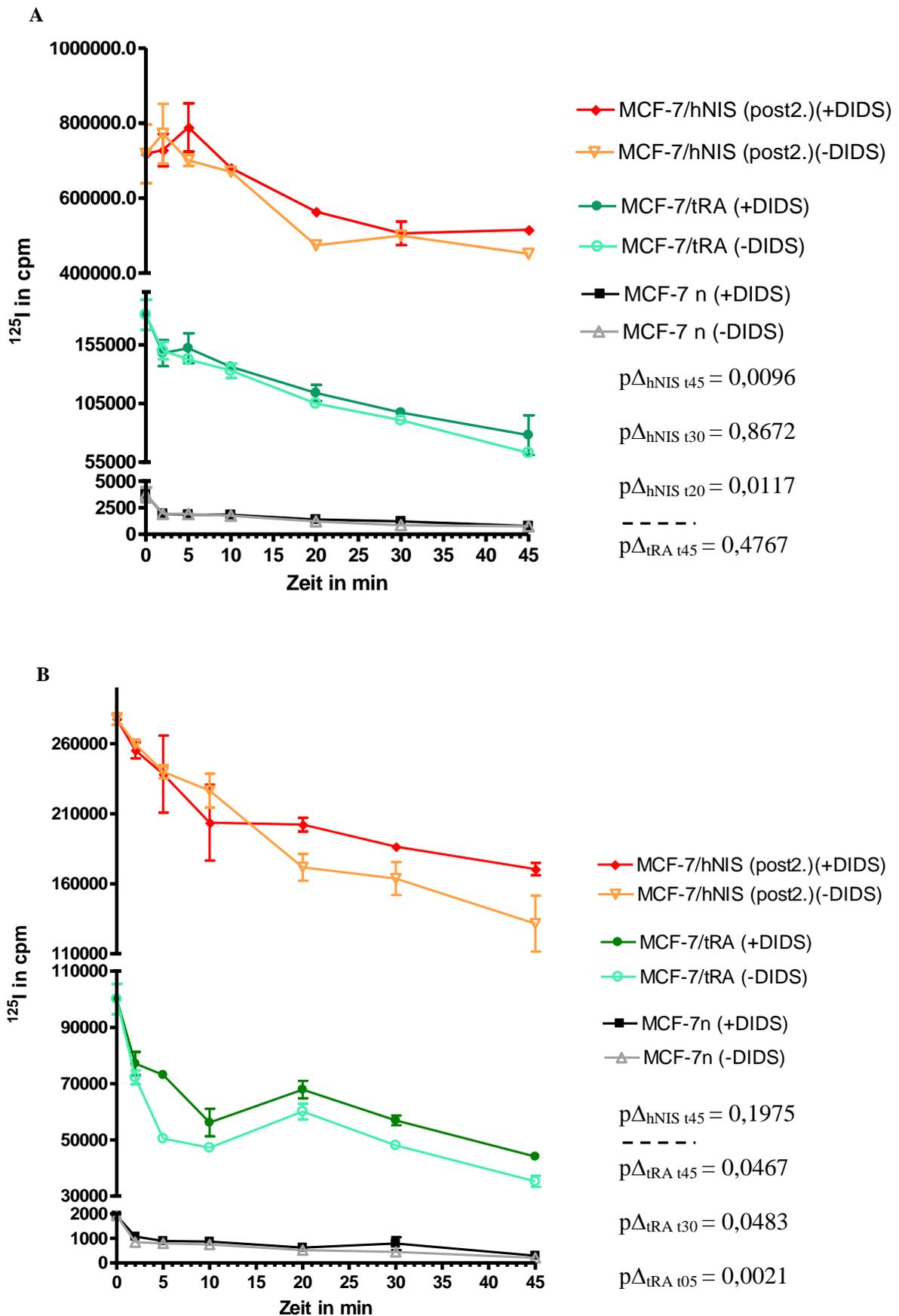


Abb. 29: MCF-7 -Zellen: Radioiodideffluxversuch mit Hemmung des Effluxes durch DIDS. Die Zellen wurden 1 h mit ^{125}I ($1\mu\text{Ci}$ pro Probe) mit bzw. ohne DIDS mit einer DIDS-Konzentration von 1

mM inkubiert, anschließend gewaschen und bis zu den Messpunkten (2, 5, 10, 20, 30, 45 min) im HBSS-Puffer inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und für 10 min im γ -counter gemessen.

Dargestellt sind die Zelllysatmesswerte von gentechnisch veränderten MCF-7 hNIS -Klonen nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) und von nativen MCF-7 -Zellen. Die tRA-Stimulation nativer MCF-7 -Zellen erfolgte zuvor für 48 h.

$p_{\Delta_{\text{hNIS } t}}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied der Messwerte zum Zeitpunkt t zwischen GVOs mit und ohne DIDS. $p_{\Delta_{\text{tRA}}}$ bezieht sich auf die stimulierten Zellen.

Die nativen Zellen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied mit und ohne DIDS. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied jeweils zwischen den GVOs, den stimulierten MCF-7 -Zellen und den nativen MCF-7 -Zellen.

A: Die tRA-stimulierten Zellen zeigten keinen signifikanten Unterschied. Bei den MCF-7 GVOs zeigen nur die Messpunkte $t = 20$ min und $t = 45$ min einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den GVOs mit und ohne DIDS.

B: Die GVOs zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied bei den Messpunkten 5, 30 und 45 min mit und ohne DIDS.

Die nativen MCF-7 -Zellen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied mit und ohne DIDS. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied jeweils zwischen den gentechnisch veränderten MCF-7 hNIS -Klonen nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen), den tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen und den nativen MCF-7 -Zellen (vgl. **Abb. 25B** und **26B**). Es zeigten sich teilweise statistisch signifikant erhöhte Messwerte bei den MCF-7 hNIS GVO -Zellen sowie den tRA-stimulierten Zellen, die mit DIDS inkubiert worden waren. Allerdings zeigten die Messwerte ebenfalls große Schwankungen.

Da zwar eine Tendenz zu erkennen war, die für eine erhöhte Iodidretentionszeit bei den mit DIDS behandelten Zellen sprach, diese aber nur selten signifikant war, wurde der Versuchsaufbau geändert. Um die Iodidretentionszeit in der Zelle zu verlängern, wurde der Anionenkanalblocker DIDS in einer Konzentration von 1 mM zusätzlich auch in das radioaktive Inkubationsmedium und - wie gehabt - nach dem Waschvorgang in dem HBSS-Puffer auf die Zellen pipettiert und diese so bis zu den einzelnen Messpunkten inkubiert. Die Messpunkte lagen bei 2, 5, 10, 20, 30 und 45 min. Für jeden Messpunkt wurden zwei Messwerte erhoben. Außerdem wurden zum Zeitpunkt $t = 0$ min Ausgangswerte erhoben.

Da der Versuchsablauf sehr komplex war (durch das zeitkritische Waschen und die hohe Anzahl an Zellen) wurden auch hier die Versuche doppelt ausgeführt (vgl. Gärtner 2009).

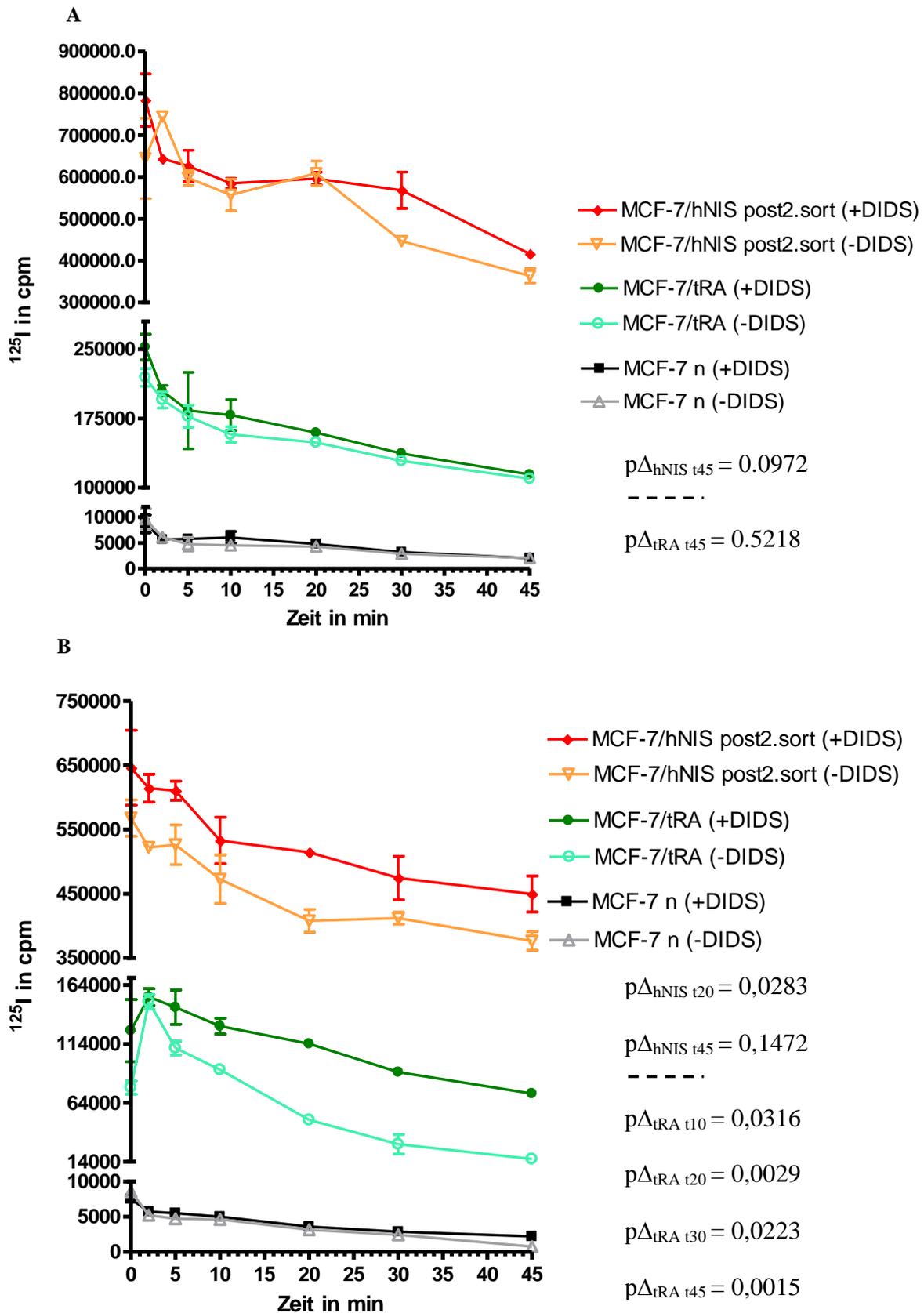


Abb. 30: DIDS-Zusatz auch im radioaktiven Inkubationsmedium der MCF-7 -Zellen: Radioiodid-effluxversuch mit Hemmung des Effluxes durch DIDS. Die Zellen wurden 1 h mit ^{125}I (1 μCi pro Probe) mit bzw. ohne DIDS mit einer DIDS-Konzentration von 1 mM inkubiert, anschließend gewaschen und bis zu den Messpunkten (0, 2, 5, 10, 20, 30, 45 min) im HBSS-Puffer, der im DIDS-

Versuchsaarm ebenfalls DIDS enthielt, inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und für 10 min im γ -counter gemessen.

Dargestellt sind die Zelllysatmesswerte von gentechnisch veränderten MCF-7 hNIS -Klonen nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen) und von nativen MCF-7 -Zellen. Die tRA-Stimulation nativer MCF-7 -Zellen erfolgte zuvor für 48 h.

$p\Delta_{\text{hNIS } t}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied der Messwerte zum Zeitpunkt t zwischen GVOs mit und ohne DIDS. $p\Delta_{\text{tRA}}$ bezieht sich auf die stimulierten Zellen.

Die nativen Zellen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied mit und ohne DIDS. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied jeweils zwischen den GVOs, den stimulierten MCF-7 -Zellen und den nativen MCF-7 -Zellen.

A: Die tRA-stimulierten Zellen und die GVOs zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied mit und ohne DIDS.

B: Die GVOs zeigten nur teilweise einen statistisch signifikanten Unterschied, die tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen zeigen meistens einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich mit und ohne DIDS.

Die nativen MCF-7 -Zellen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied mit und ohne DIDS. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied jeweils zwischen den gentechnisch veränderten MCF-7 hNIS -Klonen nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen), den tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen und den nativen MCF-7 -Zellen (vgl. **Abb. 25B, 26B** und **29**). Es zeigten sich weiterhin teilweise statistisch signifikant erhöhte Messwerte bei den MCF-7 hNIS GVO -Zellen sowie den tRA-stimulierten Zellen, die mit DIDS inkubiert worden waren. Allerdings zeigten die beiden jeweiligen Einzelmesswerte auch hier große Schwankungen (erkennbar an der dargestellten Standardabweichung).

3. 4. 3. 1 Tripletts mit / ohne DIDS

Da der Verlauf der abgebildeten Kurven zwar die Tendenz erkennen ließ, dass das Iodid bei der Behandlung mit DIDS langsamer wieder aus den Zellen gelang, dies aber nicht immer statistisch signifikant gezeigt werden konnte, wurde der zuletzt beschriebene Versuchsaufbau noch mal mit drei Proben pro Messzeitpunkt durchgeführt. Damit sollte der statistische Fehler einer einzelnen Messung abgemildert werden. Da sich hierdurch die Anzahl der Proben erhöhte, wurden weniger Messpunkte verwendet. Auch dieser Versuchsaufbau wurde zweimal durchgeführt. In der folgenden Abbildung (**Abb. 31**) ist jeweils ein Versuchsdurchgang dargestellt. Verwendet wurden beim ersten Durchgang die Zellen wie in den vorbeschriebenen Versuchen, beim gezeigten zweiten Durchgang wurden Klone nach Zellausdünnung („limiting dilution“) benutzt.

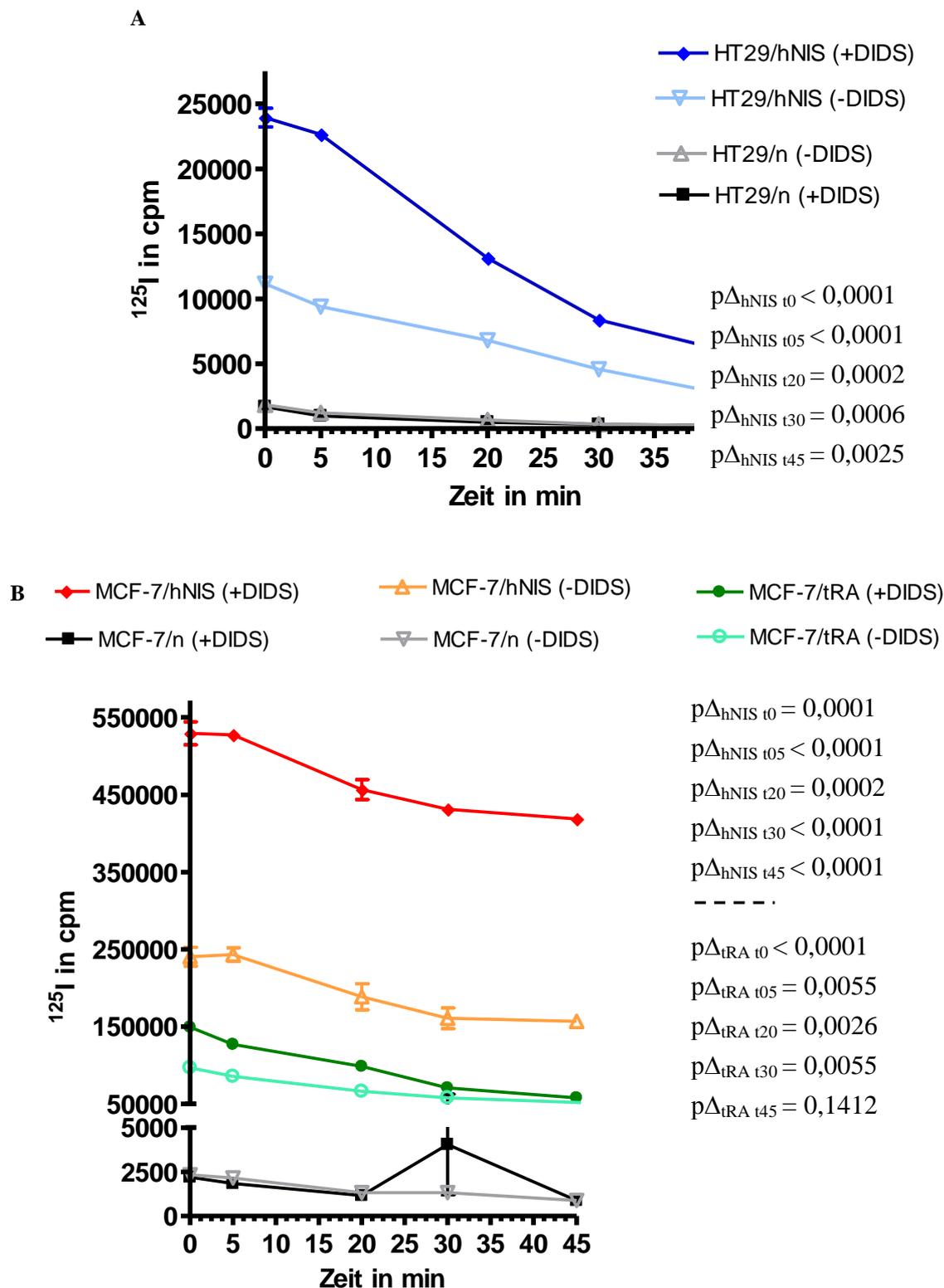


Abb. 31: Triplets mit / ohne DIDS: ^{125}I Iodideffluxmessungen zu den Messzeitpunkten 0, 5, 20, 30 und 45 min. Zu allen Messzeitpunkten wurden drei Messwerte erhoben. DIDS wurde im DIDS-Versuchsarm in einer Konzentration von 1 mM dem radioaktiven Inkubationsmedium sowie dem HBSS-Puffer bis zum jeweiligen Messzeitpunkt zugesetzt.

A: Dargestellt sind die Zelllysatzmesswerte von gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der vierten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung sowie nach Zellausdünnung („limitig dilution“) und Auswahl des das hNIS-Proteins am stärksten funktionell exprimierenden Zellklons (HT29 GVO hNIS post 4. sort Klon#28 -Zellen) und von nativen HT29 -Zellen.

$p\Delta_{\text{hNIS } t}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied der Messwerte zum Zeitpunkt t zwischen GVOs mit und ohne DIDS. Die nativen Zellen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied mit und ohne DIDS. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied jeweils zwischen den GVOs und den jeweiligen nativen Zellen sowie zwischen den MCF-7 GVOs und den tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen und sowie den tRA-stimulierten Zellen und den nativen MCF-7 -Zellen. Bei den GVOs mit und ohne DIDS war der Unterschied immer statistisch signifikant.

B: Dargestellt sind die Zelllysatzmesswerte von MCF-7 GVO hNIS post 2. sort Klon#1 -Zellen und nativen MCF-7 -Zellen. Die tRA-Stimulation nativer MCF-7 -Zellen erfolgte zuvor für 48 h.

$p\Delta_{\text{hNIS } t}$ beschreibt die Wahrscheinlichkeit für einen Unterschied der Messwerte zum Zeitpunkt t zwischen GVOs mit und ohne DIDS. $p\Delta_{\text{tRA } t}$ bezieht sich auf die stimulierten Zellen.

Bei diesem Versuch wurde als HT29 hNIS-Klon ein gentechnisch veränderter HT29 hNIS -Klon nach der vierten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung sowie nach Zellausdünnung („limitig dilution“) und Auswahl des das hNIS-Proteins am stärksten funktionell exprimierenden Zellklons (HT29 GVO hNIS post 4. sort Klon#28 -Zellen) benutzt.

Die nativen Zellen zeigten keinen statistisch signifikanten Unterschied mit und ohne DIDS. Wie in den vorherigen Versuchen gesehen, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied jeweils zwischen den GVOs und den jeweiligen nativen Zellen sowie zwischen den MCF-7 GVOs und den tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen und sowie zwischen den tRA-stimulierten Zellen und den nativen MCF-7 -Zellen (vgl. **25B**, **26B**, **29** und **30**). Bei den tRA-stimulierten Zellen war nur bei $t = 45$ min kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen, ansonsten zeigte sich eine statistisch signifikante Mehraufnahme an Radioaktivität bei den tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen mit DIDS im Vergleich zu denen ohne DIDS-Behandlung. Bei den GVOs war der Unterschied immer statistisch signifikant (vgl. jeweils die in der Abbildung **31** dargestellten p-Werte).

Bei diesem Versuchsaufbau zeigten sich vor allem bei den hNIS GVOs über den gesamten Messzeitraum statistisch signifikant erhöhte Radioaktivmesswerte der Zellen, die mit DIDS behandelt wurden. Auch bei den tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen waren die Messwerte in dieser Gruppe statistisch signifikant höher. Allerdings war sowohl bei den HT29 hNIS GVOs als auch bei den tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen eine Annäherung der beiden Kurven im Zeitverlauf zu erkennen.

3. 5 *In vivo* Radioaktivversuche

Die *in vivo* Versuche wurden mit gentechnisch veränderten HT29 hNIS -Klonen nach der dritten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (HT29 hNIS GVO post 3. sort) und mit nativen BxPc3 und HT29 -Zellen in den Versuchstieren durchgeführt.

Zunächst wurde, analog zu den Versuchen *in vitro*, die Aufnahme von ^{125}I iodid in die Organe der Versuchstiere untersucht. Anschließend wurden erste Versuche mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ gemacht, da dieses für die Bildgebung verwendet werden sollte.

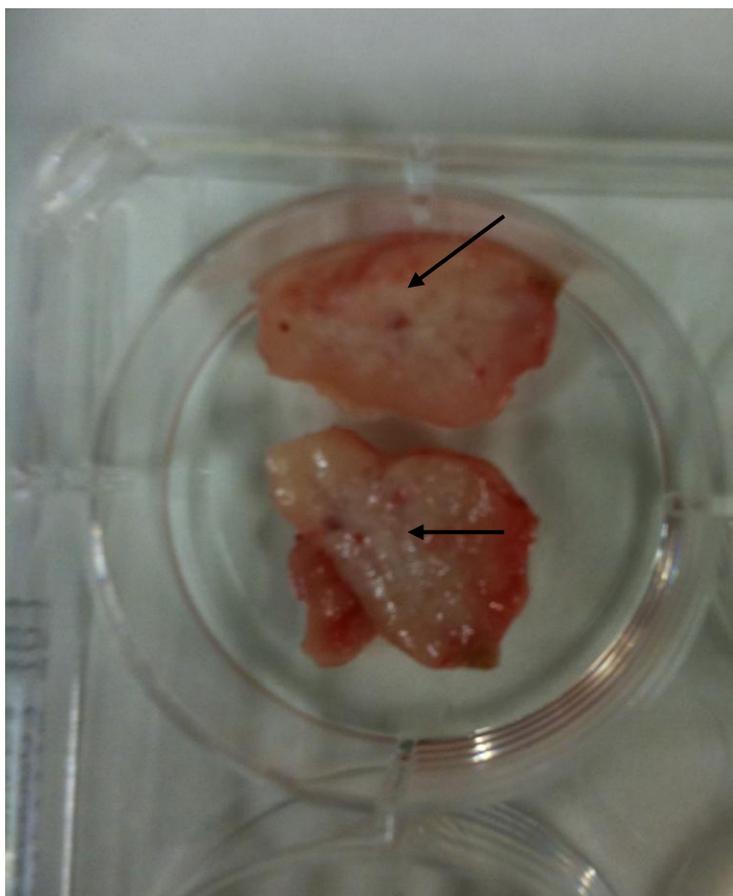


Abb. 32: Beispiel eines zerteilten HT29 hNIS GVO -Tumors in einer 6-Well-Platte vor der Messung im γ -counter. Die schwarzen Pfeile deuten auf nekrotische Anteile des Tumors. Die vitalen, besser perfundierten, proliferierenden Tumoranteile liegen eher peripher.

Abbildung 32 zeigt einen in einer 6-Well-Platte zerteilten HT29 GVO-Tumor. Man erkennt deutlich die nekrotischen Tumoranteile in der Mitte des Tumors sowie die deutlich vitaleren, rosig erscheinenden, besser perfundierten, peripheren Anteile.

Die nachfolgenden Graphen zeigen die Radioiodidaufnahme der einzelnen Gewebetypen / Organe bei den *in vivo* Experimenten.

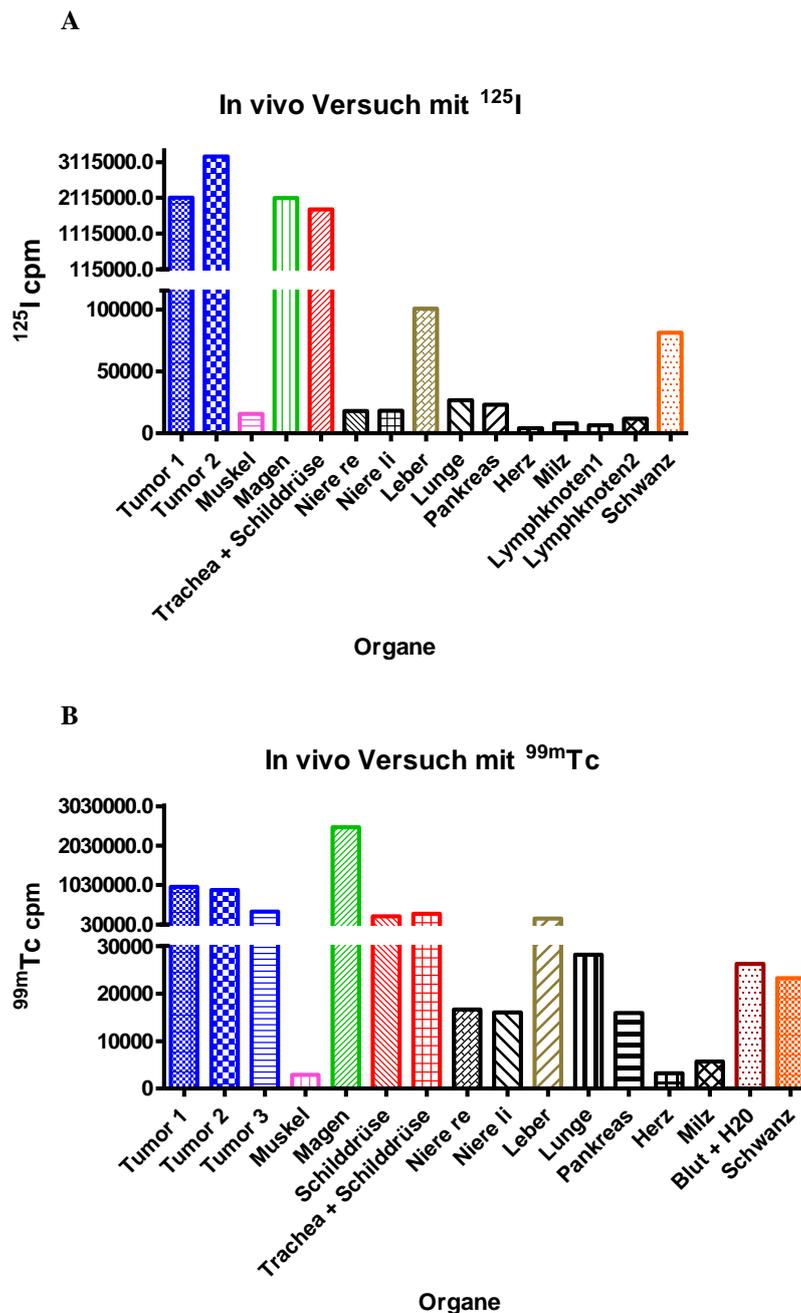


Abb. 33: *In vivo* Experiment mit zwei HT29 hNIS GVO -Tumor -positiven Mäusen, die sechs Wochen zuvor mit Tumorzellen injiziert worden waren. Einer Maus waren zu Versuchsbeginn am Messtag jeweils 1,1-1,5 MBq ^{125}I i. v. injiziert worden. Anschließend zirkulierte die Radioaktivität für eine Stunde in den Versuchstieren.

Die gewachsenen Tumoren waren zu groß für die Messröhrchen. Deswegen wurden sie geteilt. Die tatsächlichen Tumormesswerte berechnen sich also aus der Addition der Messwerte der aufgeführten einzelnen Tumoren. Der GVO-Tumor hat jeweils am meisten Radioaktivität aufgenommen.

A: Versuch mit ^{125}I . Gemessen wurde für 10 min im γ -counter. Der GVO -Tumor zeigte etwa dreimal mehr Radioaktivität als die Schilddrüse (+Tracheanteile).

B: Versuch mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Gemessen wurde für 1 min im γ -counter. Auffällig ist hier, dass die Leber fast so viel Radioaktivität aufgenommen hat wie die Schilddrüse. Der GVO -Tumor zeigte etwa viermal mehr Radioaktivität als die Schilddrüse (+Tracheanteile).

In der Interpretation von Abbildung 33 muss mit eingegangen werden, dass die GVO -Tumoren zu groß für die Messröhrchen waren und deshalb für die γ -counter-Messung zerteilt wurden (vgl. auch Abb. 32). Dementsprechend ergaben sich die Messwerte der von dem jeweiligen Tumor aufgenommenen Radioaktivitätsmenge aus der Addition der dargestellten Einzelmesswerte. Zunächst wurde, analog zu den *in vitro* Versuchen, ^{125}I Iodid verwendet. Anschließend wurde der Versuch mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ wiederholt, da dieses für die spätere Bildgebung eingesetzt werden sollte. In beiden Versuchen ist der hNIS GVO -Tumor das Gewebe, das mit Abstand am meisten Radioaktivität aufgenommen hat. Dann folgen Magen, Schilddrüse und Leber. Der Schwanz hat relativ viel Radioaktivität, da über die Schwanzvene der i. v. -Zugang gelegt wurde und die Tiere hierüber die radioaktive Lösung infundiert bekommen haben. Der Versuch mit $^{99\text{m}}\text{Tc}$ wurde noch mit einer Negativkontrolltumormaus zum Vergleich wiederholt (vgl. Abb. 34A).

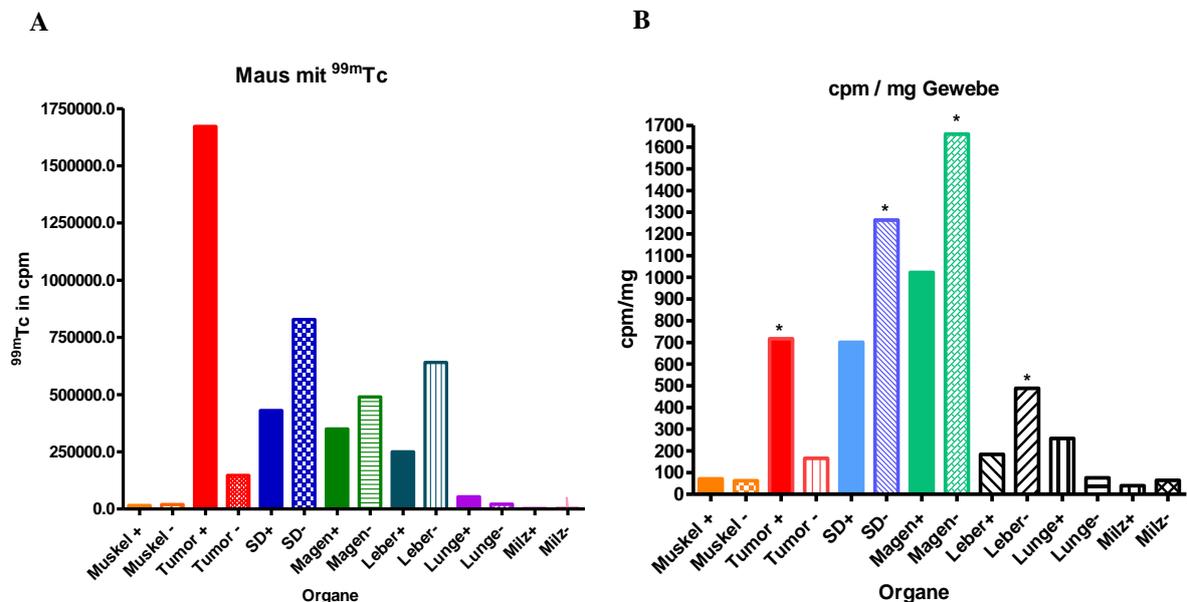


Abb. 34: *In vivo* Experiment mit einer hNIS-positiven und einer -negativen Maus, die HT29 - Tumoren trugen und acht Wochen zuvor die Tumorzellen s. c. injiziert bekommen hatten. Einer Maus waren zu Versuchsbeginn am Messtag jeweils etwa 0,92MBq $^{99\text{m}}\text{Tc}$ i. v. injiziert worden. Die Radioaktivität zirkulierte für eine Stunde im Organismus.

Links ist immer das jeweilige Organ der hNIS-GVO-positiven Maus, rechts das mit dem nativen HT29 -Tumor (gekennzeichnet mit "+" und "-") dargestellt.

A: Organverteilung der gemessenen Radioaktivität.

B: Darstellung der gemessenen Aktivität in Bezug auf das jeweilige Organ- / Gewebegewicht entsprechend Tabelle 7 (gemessene Aktivität dividiert durch das jeweilige Gewicht). Die entnommenen Gewebe / Organe wurden zunächst gewogen und anschließend im γ -counter gemessen.

*: Der hNIS -Tumor zeigt 56 % der Aktivität der normalen Schilddrüse, 43 % der Aktivität des normalen Magens sowie 146 % der Aktivität der normalen Leber.

In der Verteilung der Radioaktivität zeigten sich deutliche Unterschiede. Quantitativ nahm der GVO -Tumor am meisten Radioaktivität auf, gefolgt von der Schilddrüse, der Leber und dem

Magen des Versuchstiers mit dem hNIS-negativen Tumor sowie der Schilddrüse des Versuchstiers mit dem hNIS-positiven Tumor (vgl. **Abb. 34A**).

Die in der nachfolgenden Tabelle 7 gezeigten Werte gehören zu Abbildung 34B. Da sich die Messwerte im γ -counter auf Organe verschiedener Größe beziehen, wurden die dort gemessenen Werte in Bezug zur jeweiligen Organmasse gesetzt, die gemessene Aktivität wurde also durch das gemessene Gewebe- /Organgewicht dividiert (cpm / mg). Dies bringt eine qualitativ höherwertige Aussage über die Verteilung der aufgenommenen Radioaktivität.

Tab. 7: Entsprechend der **Abb. 34B** werden die Verhältnisse der aufgenommenen Aktivität zum jeweiligen Gewicht des entnommenen Gewebes bzw. Organs (cpm / mg) aufgeführt. Gezeigt sind die Werte für die Gewebe / Organe des den hNIS -positiven und des den hNIS-negativen Tumor tragenden Versuchstiers. Relevante Unterschiede sind farblich markiert.

Maus	Tumor	Magen	Herz	Niere	Leber
hNIS-positiv	716,4	1022,2	75,1	136,9	183,7
hNIS-negativ	165,9	1660,4	51,8	181,3	488,8
	Milz	Lunge	Muskel	Schilddrüse	
hNIS-positiv	39,8	257,4	70,9	700,1	
hNIS-negativ	64,3	75,6	62,2	1264,3	

In Bezug auf das Gewebe- / Organgewicht relativiert sich die quantitativ größte Radioaktivitätsaufnahme durch den hNIS-GVO-Tumor, denn der hNIS GVO -Tumor nahm ~4,32-mal mehr Radioaktivität auf als der native Vergleichstumor, aber etwa halb soviel wie die Schilddrüse bzw. wie der Magen des Versuchstiers mit dem hNIS-negativen Tumor und etwa gleich viel wie die Schilddrüse desselben Versuchstieres (vgl. **Tab. 7** und **Abb. 34B**). Der hNIS -Tumor zeigte in Zahlen gewichtsgewichtet 56 % der Aktivität der Schilddrüse, 43 % der Aktivität des Magens sowie 146 % der Aktivität der Leber des Versuchstiers mit dem hNIS-negativen Tumor (vgl. **Abb. 35**). Umgerechnet auf das Organ- bzw. Gewebegewicht sieht man anhand von Tabelle 7 und Abbildung 34B, dass bei dem nativen Tumor ein viel höherer Anteil der Radioaktivität u. a. im Magen, der Schilddrüse und der Leber ist, als dies bei dem GVO -Tumor der Fall ist (vgl. farbige Schrift in **Tab. 7**), sprich umkehrt war die Radioaktivitätsaufnahme bei dem hNIS-positiven Versuchstier in diesen Organen relativ geringer. Quantitativ-gewichtsgewichtet nimmt der hNIS-negative Tumor etwa soviel Radioaktivität auf die Niere desselben Tieres. Summiert man die in Tabelle 7 gezeigten gemessenen Aktivitäten der beiden Tumoren und nimmt diese als Rechengrundlage, zeigte sich, dass der hNIS-GVO -Tumor etwa 22,3% (Schilddrüse: 21,8%) der gewichtsbezogenen

Aktivität in diesem Versuchstier aufgenommen hatte, der Vergleichstumor aber 4,1% (Schilddrüse: 31,5%) der gewichtsbezogenen Aktivität in diesem jeweiligen Versuchstier.

Die nachfolgende Abbildung 34 und die dazugehörige Tabelle 8 zeigen eine prozentuelle Wiedergabe der Werte aus Abbildung 34 und Tabelle 7.

^{99m}Tc -Verhältnisse zwischen Tumorgewebe und Referenzgewebe in %

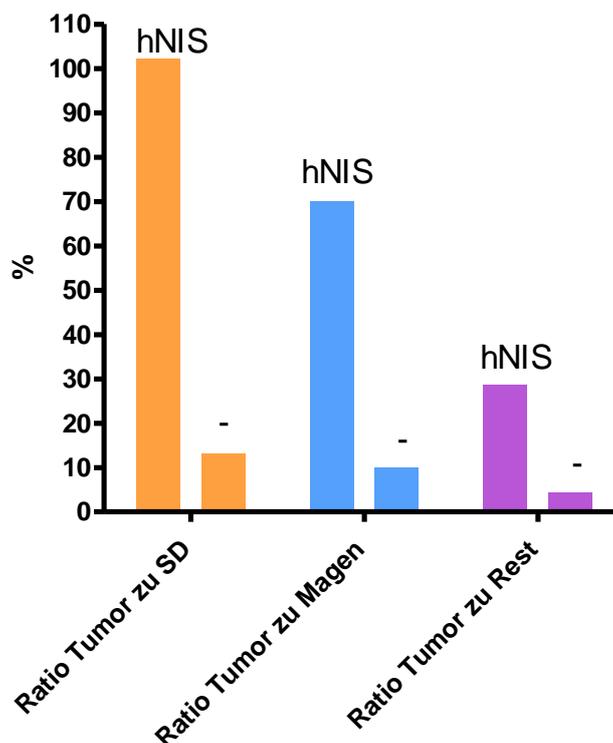


Abb. 35: *In vivo* Experiment mit einer hNIS-positiven und einer -negativen Maus, die HT29 - Tumoren trugen. Einer Maus waren zu Versuchsbeginn am Messtag jeweils etwa 0,92MBq ^{99m}Tc i. v. injiziert worden. Es sind die gewichtsbezogenen Aktivitätsmesswerte der genannten Organe / Gewebe (cpm / mg) in Relation zueinander gezeigt, d. h., dass die Werte aus **Abb. 34B** und **Tab. 7** verwendet wurden. (Beispiel: 716,4cpm / mg : 700,1cpm / mg = 102,3). Die Werte wurden entsprechend Tabelle 8 graphisch aufgetragen.

Tab. 8: Verhältnisse der Aktivität der jeweiligen Mausgewebe zueinander in %. Die Werte gehen durch Division der Werte (cpm / mg) der genannten Gewebe aus **Tab. 7** hervor, in der die Verteilung der durch das jeweilige Gewebe aufgenommenen Aktivität ins Verhältnis zur jeweiligen Masse des entnommenen Organs / Gewebes gesetzt wurde. (Beispiel: 716,4cpm / mg : 700,1cpm / mg = 102,3).

Maus	Tumor zu Schilddrüse	Tumor zu Magen	Tumor zum Rest
HT29 hNIS GVO	102,3	70,1	28,8
HT29 n GVO	13,1	10,0	4,3

Tabelle 8 und die entsprechende Abbildung 35 zeigen noch einmal die unterschiedliche Verteilung der Radioaktivität in den Geweben der beiden Tiere. Man erkennt, dass der Ht29

hNIS GVO -Tumor in etwa so viel Radioaktivität (2 % mehr) aufnimmt wie die Schilddrüse desselben Versuchstiers. Im Vergleich nimmt jedoch ein nativer HT29 -Tumor lediglich etwa 13 % der Radioaktivität auf wie die Schilddrüse dieses Versuchstiers. Der Ht29 hNIS GVO – Tumor nimmt etwa 70% soviel Radioaktivität auf wie der Magen desselben Versuchstiers.

Nachdem die zuletzt beschriebenen Versuche erkennen ließen, dass die HT29 hNIS GVO - Tumoren *in vivo* vermehrt Radioaktivität aufnahmen (quantitativ etwa halb so viel Aktivität wie normales Schilddrüsengewebe in Bezug auf das jeweilige Gewebegewicht), wurden die ersten Bildgebungsversuche durchgeführt.

3. 6 *In vivo* Bildgebung

Die *in vivo* Bildgebung fand jeweils mit einer einen nativen Tumor tragenden Maus als Negativkontrolle statt. Im Folgenden sind Beispielaufnahmen der Untersuchung mit einer klinischen γ -Kamera (Symbia) gezeigt.

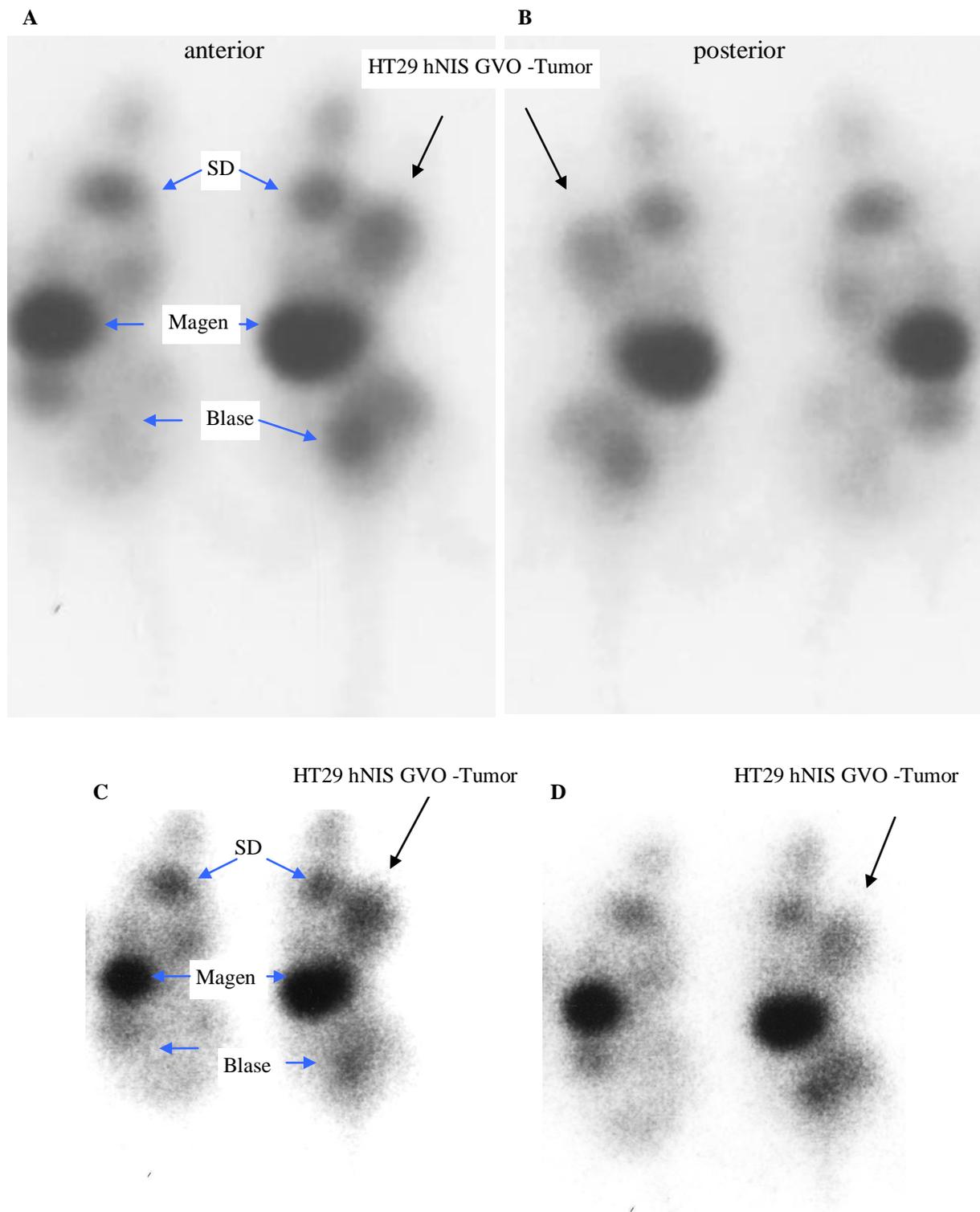


Abb. 36: Aufnahme mit einer klinischen γ -Kamera (Symbia); 256 x 256 Matrix. Die Mäuse erhielten etwa 1,1 MBq ^{99m}Tc i. v. über die Schwanzvene injiziert. Die Pfeile deuten jeweils auf den HT29 hNIS GVO -Tumor über der Mausskapula. Die Tumorzellen waren der Maus sieben Wochen zuvor injiziert worden.

A und B: Statische Aufnahme für 10 min ab $t = 75$ min nach Injektion der Aktivität. Das linke Bild zeigt die beiden Mäuse von ventral, das rechte zeigt sie von dorsal.

C und D: Dynamische Aufnahmen über 60 min mit einem Scan pro min. **C** Bild nach 1,5 h post iniectionem, **D** Bild nach 2,5 h post iniectionem.

In der *in vivo* Bildgebung mit einer klinischen γ -Kamera war der HT29 hNIS GVO -Tumor relativ gut dorsal über der Mausskapula zu erkennen (vgl. **Abb. 36**). Entsprechend den Ergebnissen bei den Messungen der einzelnen Organe (vgl. **Abb. 33** und **34**) waren auch bei diesen Messungen die jeweilige Schilddrüse und der Magen deutlich sichtbar. Zusätzlich sieht man auf der Abbildung die Blase, da das Nuklid renal ausgeschieden wird (vgl. Einleitung). Zusätzlich wurden Aufnahmen mit einem Kleintier SPECT / CT gemacht. Die Bildgebung der Tumormausmodelle wurde unter Isofluran (1-2 %) -Narkose durchgeführt.

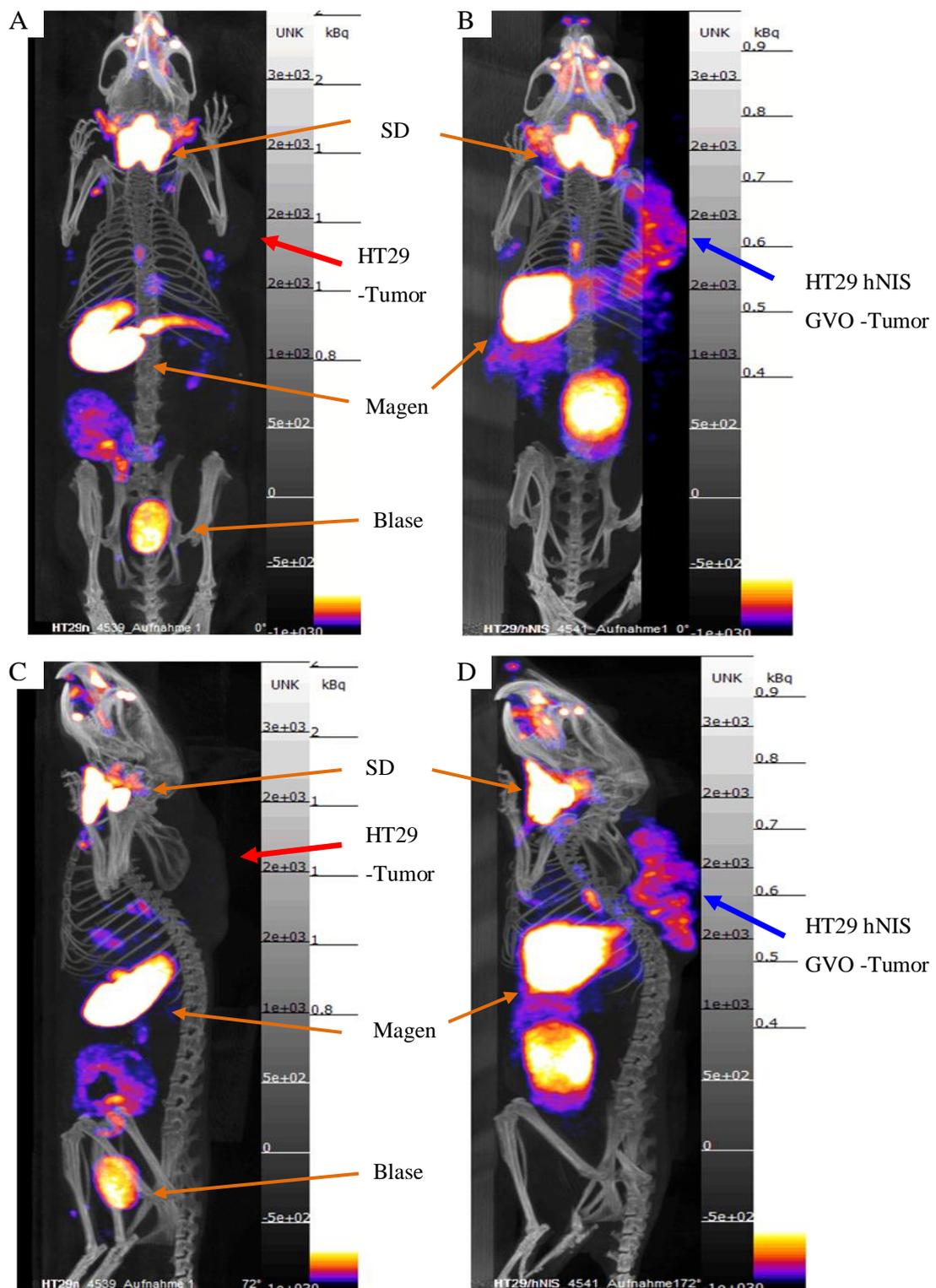


Abb. 37: Aufsichts- und Seitenansicht einer einen HT29 hNIS GVO - und einer einen nativen HT29 -Tumor-tragenden Maus, die im Kleintier SPECT / CT untersucht wurden. Ihnen wurde jeweils 1 h vor dem SPECT / CT etwa $100 \text{ MBq } ^{99m}\text{Tc}$ -Pertechnetat i. v. über die Schwanzvene injiziert. Die Tiere wurden anschließend im SPECT / CT gemessen. Die Abbildungen sind farbkodiert nach der Menge an aufgenommener Radioaktivität (in kBq). UNK steht für den Winkel der Drehachse. Der Negativkontrolltumor (HT29) ist durch einen roten Pfeil, der HT29 hNIS GVO -Tumor durch einen blauen Pfeil gekennzeichnet.

A und **C** zeigen den Negativkontrolltumor bei 0° und 72° , **B** und **D** den hNIS GVO -Tumor, bei 0° und 72° . Bei beiden Tieren sind auch Schilddrüse und Magen klar abzugrenzen.

Bei den Kleintier SPECT / CT -Aufnahmen erkennt man deutlich die Anreicherung der Radioaktivität im hNIS -Tumor dorsal der Mausskapula (**Abb. 37**). Auch der Negativkontrolltumor ist als Kontur zu erkennen. Weiterhin zeigt sich, wie in den Vorversuchen, eine Anreicherung der Radioaktivität in der Schilddrüse und im Magen beider Tiere. Des Weiteren ist bei den *in vivo* Aufnahmen eine Traceranreicherung in der Blase zu sehen.

3. 7 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen erfolgten mit PFA-fixierten Zellpellets von MCF-7 hNIS GVO -Zellen sowie HT29 hNIS GVO -Tumoren. Gefärbt wurde mit dem hNIS-Antikörper von neomarkern wie beim Western Blot.

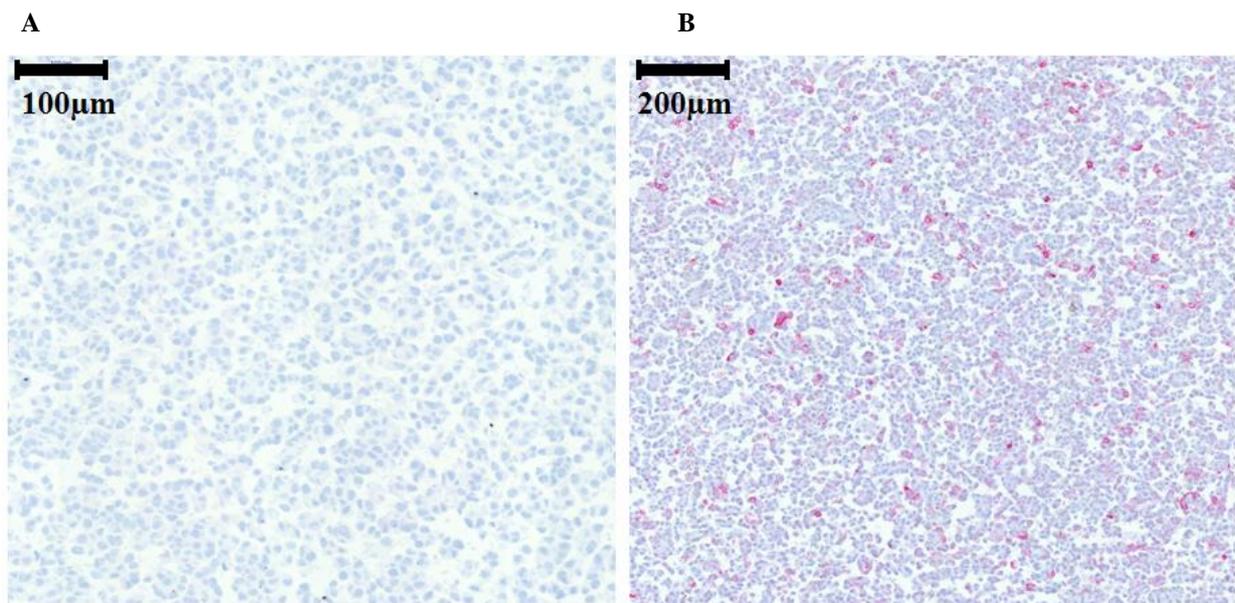


Abb. 38: Immunhistochemie: Mit dem MIRAX eingescannte gentechnisch veränderte MCF-7 hNIS - Klonen nach der zweiten durchflusszytometrisch-gesteuerten Sortierung (MCF-7 GVO hNIS post 2. sort) -Zellpelletschnitte.

A: Negativkontrolle: Primäre Färbung mit IsoIgG1: keine Rotfärbung.

B: hNIS-Antikörper von neomarkern: Positive Zellen sind rot angefärbt.

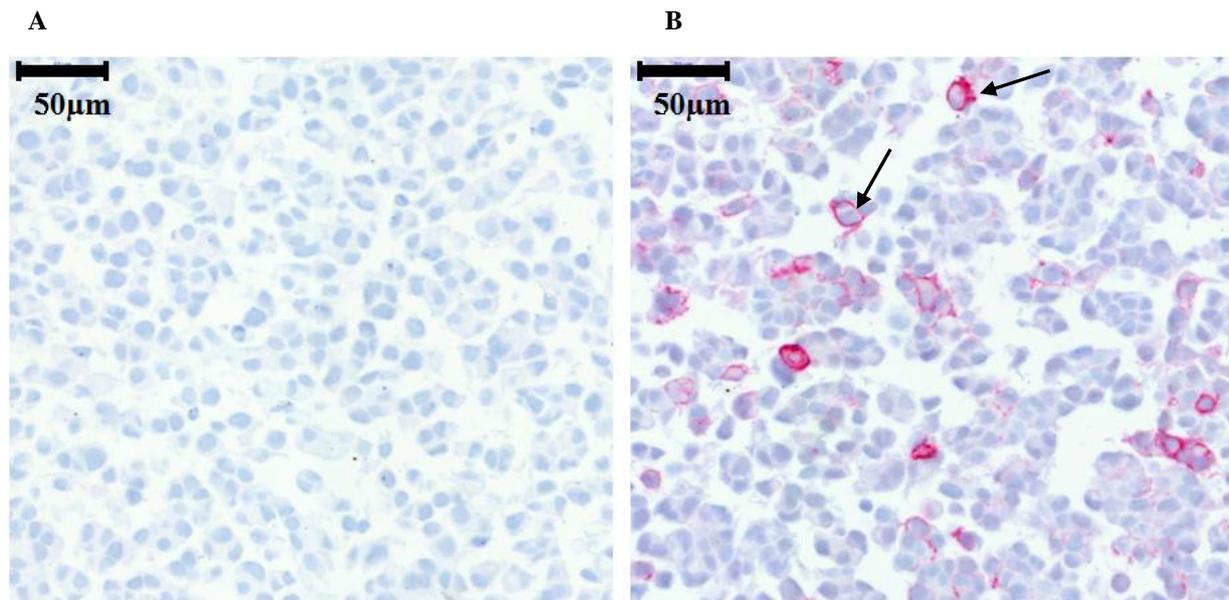


Abb. 39: Immunhistochemie: Mit dem MIRAX eingescannte MCF-7 GVO hNIS post 2. sort - Zellpelletschnitte. Beide Aufnahmen wurden mit einer 400x Vergrößerung gemacht. Die Zellkerne zeigen sich bläulich.

A: Negativkontrolle: Primäre Färbung mit IsoIgG1: keine Rotfärbung,

B: HNIS-Antikörper von neomarkers: Positive Zellen sind rot angefärbt (Pfeile).

Man erkennt, dass ca. 10 % der MCF-7 GVO hNIS post 2. sort -Zellen in der Immunhistochemie positiv gefärbt wurden. Des Weiteren sieht man auch in den immunhistochemischen Färbungen die randständige Positivfärbung in Korrelation zur membranösen Proteinexpression.

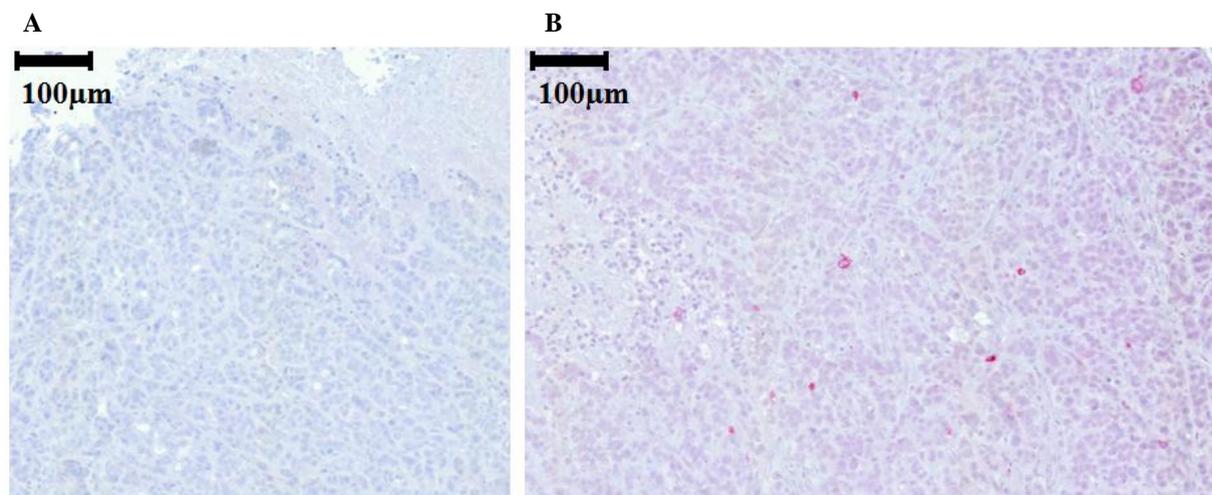


Abb. 40: Immunhistochemie: Mit dem MIRAX eingescannte HT29 hNIS post 3. sort GVO - Tumorschnitte. Beide Aufnahmen wurden mit einer 200x Vergrößerung gemacht.

A: Negativkontrolle: Primäre Färbung mit IsoIgG1: keine Rotfärbung,

B: HNIS-Antikörper von neomarkers: Positive Zellen sind rot angefärbt.

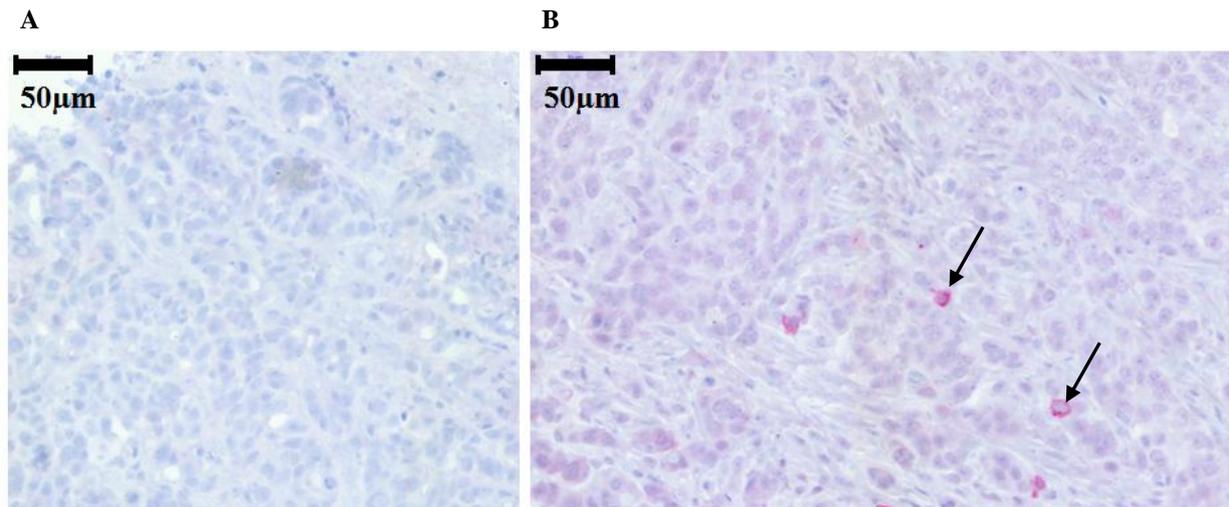


Abb. 41: Immunhistochemie: Mit dem MIRAX eingescannte HT29 hNIS post 3. sort GVO - Tumorschnitte. Beide Aufnahmen wurden mit einer 400x Vergrößerung gemacht. Die Zellkerne zeigen sich bläulich.

A: Negativkontrolle: Primäre Färbung mit IsoIgG1: keine Rotfärbung,

B: hNIS-Antikörper von neomarkers: Positive Zellen sind rot angefärbt (Pfeile).

Bei dem HT29 hNIS GVO -Tumor finden sich immunhistochemisch nur wenige deutlich angefärbte Zellen. Dies ist ein Unterschied zu den vorherigen Experimenten *in vitro* und *in vivo*, bei denen der Nachweis des Proteins in den HT29 hNIS post 3. sort GVO -Zellen bei deutlich über 5 % lag (vgl. **Abb. 16**).

Das hNIS-Protein konnte immunhistochemisch bei den hNIS GVO -Zellen bzw. dem -Tumor auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Korrespondierend zu den Ergebnissen der Objektträgerfärbung sowie der Durchflusszytometrie zeigt sich nun auch in der Immunhistochemie eine stärker ausgeprägte Anfärbung bzw. von der Anzahl mehr angefärbte Zellen der MCF-7 hNIS GVO -Population gegenüber den HT29 hNIS GVOs.

4. Diskussion

Primäres Ziel dieser Arbeit war es zunächst *in vitro*, stabile, das hNIS-Protein funktionell exprimierende Zellen zu generieren. In unseren Experimenten wurde dies mittels Induktion und Gentransfer durchgeführt. Stabil funktionelle Zellen sollten untersucht und anschließend für *in vivo* Versuche etabliert werden.

Ein Teilziel war es daher, die stabile Gentransfektion versus Retinsäure-induzierter NIS-Expression *in vitro* qualitativ zu vergleichen. Ferner sollte der Einfluss eines nicht-selektiven Anionenkanalblockers auf die Iodretentionszeit untersucht werden. Die gentechnisch veränderten Zellen sollten für *in vivo* Xenotransplantationsbildgebungsversuche dienen und somit einen weiteren Beitrag zur Forschung in der Bildgebung und zur Etablierung und Überwachung von Tumormodellen leisten.

Die Eigenschaften des Natrium-Iodid-Symporters machen ihn zu einem idealen Protein für diagnostische und gentherapeutische Anwendungen (Spitzweg 2009). Die Vorteile sind (Spitzweg 2009):

- natürliches humanes Gen und Protein (keine Abwehrreaktion),
- hoher Grad an Wirksamkeit und bereits klinisch in der Therapie von Schilddrüsenerkrankungen eingesetzt,
- bystander effect durch z. B. den β - und γ -Strahler ^{131}I bis zu einem Abstand von 2,4 mm,
- durch die NIS-Funktion ist der Einsatz verschiedener Radionuklide zu diagnostischen Zwecken (Szintigraphie, PET) und zur Genterapie (Radiotherapie) möglich,
- hoher Grad an Spezifität, da die NIS-Expression extrathyreoidal gering ist (man denke an die geringen Nebenwirkungen der Radioiodtherapie der Schilddrüse).

Durch den Radionuklidtransport via NIS ist das funktionelle Protein die Voraussetzung für die Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen in der Klinik, z. B. auch in der Detektion von Metastasen differenzierter Schilddrüsenkarzinome bei Patienten / -innen mit Z. n. Thyreoidektomie mittels γ -Kamera und ^{123}I (Ahn 2012).

In der vorliegenden Arbeit konnten die humanen Zelllinien HT29, MCF-7, MeWo und PaCa 5061 erfolgreich mit dem hNIS-Gen transfiziert werden, sodass sie ein funktionelles hNIS-Protein exprimierten. Bei den BxPc3 -Zellen gelang dies nicht, wobei zu sagen ist, dass sich bereits die Ermittlung der gerade letalen Zeocinkonzentration bei diesen Zellen besonders schwierig gestaltete. Ähnliches ist in der durchsuchten Literatur nicht beschrieben. Z. B. Penheiter et al. (2010) verwendeten BxPc3 -Zellen und infizierten diese mit einem NIS-DNA-tragenden Masernvirus. Die GFP-Transfektionsrate war im Vergleich zu den anderen Zelllinien bei den BxPc3 -Zellen sogar relativ hoch (vgl. **Abb. 11**). Erstaunlicherweise zeigten die HT29 -Zellen eine geringe Transfektionsrate, die Fähigkeit zur Aufnahme von Radioaktivität war jedoch bei diesen und den MCF-7 -Zellen am höchsten (vgl. **Abb. 25**).

Wie u. a. von der Arbeitsgruppe Oneal et al. (2012) beim Prostatakarzinom, konnten Penheiter et al. (2010) bei BxPc3-Zellen zeigen, dass virale Infektion von Xenografttumoren (hier: Masernvirus) zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Tumorwachstumstopp und einem verlängertem Überleben ($p = 0,02$) im Vergleich zu den Kontrolltieren führte. Allerdings zeigte sich auch bei dieser Gruppe keine Synergie zwischen der Virus-induzierten Onkolyse und der NIS-vermittelten ^{131}I -Therapie, obwohl sie eine signifikante Korrelation in der intratumoralen Iodidlokalisation und der Peakvolumenreduktion ($p = 0,04$) des Tumors feststellen konnten (Penheiter et al. 2010). Diesbezüglich wäre eine erfolgreiche Transfektion der BxPc3 -Zellen zum Vergleich mit unseren eigenen anderen Zellen sowie mit der Literatur erfreulich gewesen. Ggf. könnte man im Nachfolgenden eine erfolgreiche Transfektion mit einer anderen Transfektionssystem erreichen.

Erfreulicherweise ließen sich die MCF-7 -Zellen, wie bereits von anderen Autoren beschrieben, mit einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ tRA über eine Zeit von 48 h durch die Entdifferenzierung zur Expression eines funktionellen hNIS-Proteins stimulieren (Kogai et al. 2000, 2004, 2006; Tanosaki et al. 2003, Spitzweg et al. 2003). Allerdings konnte vor allem HT29 auf diese Weise nicht stimuliert werden.

Die ermittelten Zeocinkonzentrationen variierten ein wenig von den in der Literatur beschriebenen (Löfling et al. 2008: CHO-K1-Zellen, die Lewis B exprimierten). Soeth et al. (2001) nutzten z. B. eine Zeocinkonzentration von $400 \mu\text{g} / \text{ml}$ für die Selektion von HT29 -Klonen und Skobe et al. (2001; HT29-Zellen und CEA) eine Zeocinkonzentration von $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ für die Selektion von MeWo-Klonen, die anschließend VEGF überexprimierten.

Das hNIS-Protein ließ sich im Western Blot mit dem beschriebenen Protokoll lediglich bei den Immunpräzipitationsproben der transient transfizierten HEK 293 -Zellen nachweisen.

Dies könnte an der höheren Expressivität dieser Zellen liegen. Möglicherweise wäre eine Western Blot -Analyse von Proben einer Membranproteinpräparation von größerem Erfolg gekrönt gewesen, wie dies in der beschriebenen Literatur erfolgreich gewesen ist (Levy et al. 1997, Castro et al. 1999a, b; Jhiang et al. 1998, Kakinuma et al. 2003, Neumann et al. und Trouttet-Masson et al. 2004; Cengic et al. 2005, Peyrottes et al. 2009), wobei Peyrottes et al. dieselben Anti-körper (VJ1 und den von neomarkern) zur NIS-Detektion verwendeten, die auch für diese Arbeit genutzt wurden. Allerdings gelang Lim et al. (2007) z. B. der Western Blot -NIS-Nachweis ohne Membranpräparation von tRA-stimulierten MCF-7 -Zellen und Yeom et al. (2008) wiesen das intrazytoplasmatische Protein nach. Der erste Versuch einer Membran-proteinpräparation scheiterte allerdings und es hatten zum Zeitpunkt der Western Blot -Analyse bereits erste positive Radioiodidaufnahmeergebnisse vorgelegen, so dass dieser An-satz nicht weiter verfolgt wurde. Zudem konnte das Protein in der Durchflusszytometrie sowie in der Objektträgerfärbung nachgewiesen werden.

Zunächst ließen sich bei allen erfolgreich transfizierten hNIS-GVO-Zellklonen signifikant von den Kontrollzellen erhöhte Messwerte bei den Radioiodidaufnahmeversuchen nachweisen (vgl. **Abb. 25**). Diese ließ, wie beschrieben, vor allem bei den MeWo- und PaCa 5061- Zellen wieder nach.

Angesichts dessen, dass bei der DNA-Amplifikation mehrere verschiedene Klone benutzt und für die DNA-Gewinnung ein DNA Mini Präparationskit verwendet wurde, liegt hierin auch eine der möglichen Ursachen für das Misslingen (BxPc3) bzw. den nur geringen bzw. kurzfristigen Erfolg der Transfektion (MeWo und PaCa5061). Für die Transfektion wurden verschiedene hNIS-DNA-Klone verwendet, die bei der DNA-Konzentrationsmessung am stärksten amplifiziert worden waren. Im Restriktionsverdau (hier nicht gezeigt) zeigten sich alle später eingesetzten amplifizierten DNA-Klone als - soweit beurteilbar - identisch zu den Originalplasmiden. Kleinere Mutationen wären hier allerdings sicherlich nicht nachweisbar gewesen. Die oben beschriebenen Misserfolge wurden außerdem mehrfach mit demselben Ergebnis wiederholt. Die hNIS-Expressionsrate nach stabiler Gentransfektion lag zunächst bei deutlich unter 10 % in der Durchflusszytometrie -Analyse. Dieses wurde mittels durchflusszytometrisch-gesteuerter Zellsortierung deutlich angehoben (**Abb. 15** und **16**).

Für den NIS-Gentransfer und seine Verwendung in der Bildgebung sind vor allem Zellen / Gewebetypen interessant, die das NIS-Protein nicht exprimieren, um einer etwaigen minimalen Expression und damit einem erhöhten Hintergrundsignal zu entgehen (Ricci et al. 2008, Rao et al. 2007). Beide Arbeitsgruppen (um Ricci und Rao) untersuchten transplantierte

Herzen und nutzten NIS zur nicht-invasiven Überwachung via Bildgebung. Rao et al. (2007) infizierten Rattenherzen mittels Adenovirus (+NIS), transplantierten sie und machten Reihenaufnahmen mit ^{123}I zwischen zwei und 14 Tagen nach Transplantation mit einem Kleintier SPECT / CT. Des Weiteren entnahmen sie in einer weiteren Gruppe am fünften Posttransplantationstag das Organ wieder und machten eine *ex vivo* Bilddarstellung, wobei die Ergebnisse beider Gruppen korrelierten und somit eine weitere Einsatzmöglichkeit von NIS in der Bildgebung offerieren (Rao et al. 2007). Ricci et al. (2008) nutzten ebenfalls einen adenoviralen Vektor und machten SPECT / CT -Aufnahmen am fünften, zehnten und 15. postoperativen Tag mit 1 mCi ^{123}I i. v. und kamen zu dem Schluss, dass sich NIS sehr gut als Reporter gen eignet.

Als Positivkontrolle für die Färbungen wurde der CEACAM-Antikörper T84.1 verwendet, da HT29 -Zellen hohe Level an CEACAM exprimieren und MCF-7 zumindest positiv ist (Heine et al. 2011). PaCa 5061 hat sehr hohe CEACAM-Expressionslevel, MeWo eher geringe Level an CEACAM-Expression.

Wie bereits oben erwähnt, wurde das Durchflusszytometrie -Fixationsprotokoll (modifiziert nach Sander et al. 1991) verlassen, um die hNIS-Protein-positiven Zellen Durchflusszytometrie -gesteuert zu sortieren und damit anreichern zu können. Anschließende Färbungen sowie Radioiodidaufnahmeversuche zeigten eine, durch die Sortierung stufenweise zunehmende Anfärbung bzw. der Aufnahme an Radioaktivität. Dementsprechend exprimierten diese Zellen anteilig mehr funktionelles hNIS-Protein. Kritisch anzumerken ist, dass der Isotypkontrollantikörper in derselben Konzentration eingesetzt wurde wie der VJ1-Antikörper, da dieser eher verdünnt und die Isokontrolle vom Hersteller eher konzentriert ist, was zu unspezifischen Bindungen führen kann.

Dass die Messwerte der aufgenommenen Radioaktivität in den ersten ^{125}I -Aufnahmeversuchen mit der Zeit, die die GVO -Zellen in Kultur gehalten wurden, abnahmen, könnte u. a. darauf zurückzuführen sein, dass die Zellpopulation der einzelnen Klone nicht rein war. Zum Einen könnten sich zwischen den zeocinresistenten Zellen noch native Zellen befunden haben, die also das Plasmid nicht aufgenommen hatten, zum Anderen könnten die GVO -Zellen auch das Protein nicht membranös exprimiert haben. In letzterem Fall wäre denkbar, dass es gar nicht exprimiert wurde und / oder nur nicht in die Zellmembran integriert worden war. In diesem Fall hätte es nur zytosolisch vorgelegen, wie u. a. auch in der Literatur beschrieben (Dayem et al. 2008: ca. 40% intrazellulär exprimierter hNIS). Ggf. wurde auch

ein fehlerhaftes Protein oder aber auch anteilig nur sehr wenig Protein exprimiert. Dayem et al. (2008) konnten ferner zeigen, dass mNIS effektiver ist als hNIS, was u. a. daran liegt, dass hNIS nur zu Teilen in der Plasmamembran integriert vorliegt; der Rest ist im Zytoplasma. Vorher hatten andere Gruppen gezeigt, dass rNIS hNIS überlegen ist (Heltemes et al. 2003, Mitrofanova et al. 2006, Zhang et al. 2005). Wichtig für die Verwendung des hNIS in der Bildgebung ist aber eine hohe Transportkapazität und daher auch eine hohe funktionelle Expressionsrate. Als weitere Möglichkeit, präklinisch eine höhere hNIS-Expressionsrate zu erzielen, wäre auch ein System mit einem viralen Vektor denkbar, weil sich hierbei ebenfalls eine hohe Expressionsrate erzielen lässt. Dies haben schon mehrere Arbeitsgruppen auf unterschiedliche Weise probiert (Mandell et al. 1999, Cho et al. 2000, Boland et al. 2000, Dingli et al. 2004, Scholz et al. 2005, Rao et al. 2007, Goel et al. 2007, Ricci et al. 2008, Klutz et al. 2011).

Bereits 1999 nutzten z. B. Mandell et al. einen gewebespezifischen retroviralen Vektor zur Transfektion von humanen Melanom-, Leber-, Kolon- und Ovarialzellen mit rNIS und verglichen die funktionelle NIS-Proteinexpression im Xenograftmausmodell mittels γ -Kamera nach ^{123}I -Injektion. Es ergab sich eine 6,9-fach höhere Iodidakkumulation der NIS-positiven im Vergleich zu den Kontrolltumoren desselben Versuchstieres (Tumor jeweils an einer anderen Extremitätenseite; Mandell et al. 1999). Scholz et al. (2005) verglichen *in vitro* die hNIS-Expression einer Kolonkarzinomzelllinie (HCT 116) nach transienter und stabiler Transfektion sowie nach adenoviraler Infektion und konnten im Western Blot ein Protein von etwa 90kDa nachweisen. *In vitro* konnte nach Transfektion eine um den Faktor zehn höhere ^{125}I -Aufnahme der transfizierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollen und eine bis zu 13,6-fache Mehraufnahme der infizierten Zellen nachgewiesen werden (Scholz et al. 2005).

Dayem et al. (2008) beschrieben, dass das hNIS -Protein bei den verwendeten HEK 293 - Zellen zu etwa 40 % intrazellulär vorlag, also nicht funktionell transmembranös exprimiert wurde. Auch bei Brustkrebsarten wird davon ausgegangen, dass hNIS zwar exprimiert, aber durch fehlerhaften Transport nicht in die apikale Membran eingebaut wird und somit keine oder nur eine geringe Transportkapazität aufweist (Wapnir et al. 2003 und Tazebay et al. 2000).

Anhand wiederholter Objektträgerfärbungen und Radioiodidaufnahmeversuche sowie FACS-Untersuchungen ließ sich auch in unserer Versuchsreihe erkennen, dass die durchflusszytometrisch-gesteuerte Zellsortierung zu einer deutlichen Zunahme der das hNIS-Protein funktionell exprimierenden Zellen geführt hat.

In unseren Stimulationsversuchen wurde zunächst für 24 h mit tRA inkubiert, um zu testen, welche Zelllinien sich zur NIS-Expression stimulieren lassen. Für spätere vergleichende Versuche wurde für 48 h (gemäß Schmutzler et al. 1997, Kogai et al. 2000 und 2006) inkubiert. Die Stärke der Iodidaufnahme hängt vom Anteil hNIS-exprimierender Tumorzellen ab. Es hat sich gezeigt, dass nicht bei allen extrathyreoidalen Zelllinien die Expression des hNIS mit Hilfe von tRA induzierbar ist. Dass die Effektivität der Stimulation niedriger ist, kann auch daran liegen, dass der prozentuale Anteil an Zellen, die sich mit tRA stimulieren lassen eher gering ist (vgl. **Abb. 19**), während er bei der stabilen Transfektion nach Sorting hoch ist. Vergleicht man die Effektivität der Radioiodidaufnahme von nativen, den tRA-stimulierten, der ersten hNIS GVO- sowie den sortierten hNIS GVO -Zellen, so stellt man fest, dass die Kapazität der Aufnahme in der genannten Reihenfolge zunimmt. Die NIS-Expression von Pankreaszellen mittels viralen Vektors zeigte *in vitro* bei Dwyer et al. (2006a) z. B. eine um den Faktor 43 erhöhte Radioiodidaufnahme, 2005 erhielten sie an Brustkrebszellen einen Faktor 58 (Dwyer et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte bei MCF-7 -Zellen mittels tRA-Stimulation ein maximal 19-fach erhöhter Wert der Radioiodidaufnahme gefunden werden (nicht gezeigt). Die durchflusszytometrisch-gesteuerte Zellsortierung führte bei den HT29 hNIS GVO -Zellen zu einer bis etwa 530-fach erhöhten Radioiodidaufnahme im Vergleich zu Kontrollzellen. Bei den sortierten MCF-7 -Zellen war der Effekt nicht ganz so groß (vgl. **Abb. 23-26**). Ein derartiger Vergleich von verschiedenen Mechanismen, die NIS-Expression zu erzeugen und ihre Effektivität zu erhöhen, findet sich bislang nach bestem Wissen nicht in der durchsuchten Literatur.

Das Problem einer nachhaltigen Anreicherung des Radioiods in nicht-Schilddrüsengewebe ist die fehlende Organifizierung des Iods und damit die fehlende Iodspeicherung. In diesen Geweben kommt es zu einem relativ schnellen Wiederausstrom des Iods, sodass die Verweildauer in den Zellen geringer ausfällt als in den Schilddrüsenfollikelzellen bzw. im Kolloid (Elisei et al. 2006). Hier greift möglicherweise die pharmakologische Modulation / die Hemmung des Ausstroms ein und ermöglicht eine längere Halbwertszeit des Iods in den Zellen. Haberkorn et al. (2010) beschrieben, dass auch eine Co-Transfektion von TPO nicht zu einem Verstärkungseffekt führt, da die Enzymaktivität zu gering ist. Dahinter steckt der Versuch, die Iodspeicherung, die in der Schilddrüse über die TPO katalysiert wird (vgl. **Abb. 3**), auch auf andere Tumorentitäten zu übertragen. In der Schilddrüse kommt es nämlich als Folge der Iodspeicherung im Kolloid zu einer längeren Einwirkzeit von Radionukliden auf das Gewebe (vgl. Einleitung), was die erfolgreiche klinische Anwendung im Sinne einer

Radioiodtherapie ermöglicht. Daher wäre es günstig, solch eine Speicherung auch bei anderen Tumoren zu erzielen, da es selbst bei einem funktionellen NIS-Protein in extrathyreoidalem Gewebe schnell zu einem Iodausstrom kommt (Elisei et al. 2006).

DIDS (4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonat) ist ein nicht-selektiver Anionenkanalblocker (Cabantchik und Greger 1992). Zunächst war er als Chloridkanalblocker erforscht worden. Von Lepke et al. (1976) war er bereits in den 1970er Jahren zur Untersuchung der Erythrozytenmembran eingesetzt worden. Jessen et al. (1986) zeigten die reversible und irreversible Inhibition des Chlorideffluxes. U. a. Amphoux-Fazekas et al. (1998) konnten zeigen, dass NIS-exprimierende Zellen unter DIDS-Behandlung mehr radioaktives Iod anreicherten. Im Einklang damit konnten Lindenthal et al. (2009) zeigen, dass DIDS nicht zu einer direkten Aktivierung von NIS sondern zu einer Iodideffluxhemmung führt.

Durch DIDS konnte nach Durchführung des ersten Protokolls (vgl. Material und Methoden sowie **Abb. 28** und **29**) zunächst nur teilweise eine signifikante Iodideffluxhemmung erreicht werden. Wie in der Literatur beschrieben, wurde eine Konzentration von 1 mM DIDS verwendet (Amphoux-Fazekas et al. 1998, Shennan 2001, Manley et al. 2005). Durch Änderung des Protokolls zu einer vollzeitigen Inkubation mit DIDS zeigten sich deutlichere Unterschiede in den Versuchsrinnen (mit versus ohne DIDS, vgl. **Abb. 30**). Am deutlichsten wurde die signifikante Effluxhemmung durch die Erhebung von drei Messwerten zu jedem Messzeitpunkt, da hier die Abweichung eines einzelnen Messwertes nicht mehr so stark ins Gewicht fiel (vgl. **Abb. 31**). Es lässt sich folglich sagen, dass DIDS geeignet ist, die Iodretentionszeit sowohl bei gentechnisch veränderten Zellen als auch bei tRA-stimulierter NIS-Expression in einem gewissen Maße zu verlängern und bestätigt damit die vorliegenden Literaturergebnisse (Elisei et al. 2006, Lindencrona et al. 2007, Lindenthal et al. 2009). Unsere Ergebnisse haben aber auch gezeigt, dass der Effekt von DIDS mit der Menge an aufgenommener Radioaktivität ansteigt. Sprich, der Effekt war bei den GVOs ausgeprägter als bei den stimulierten Zellen, die insgesamt weniger Iodid aufgenommen hatten. Das bedeutet, dass die Wirkung von DIDS bei längerer Einwirkung und bei hoher Aufnahmekapazität der Zellen an Radioaktivität am größten ist.

Die Schwankungen der einzelnen Messwerte (auch an einem Versuchstag) lassen sich u. a. durch den Waschvorgang erklären (vgl. Gärtner 2009). Ein weiterer Punkt ist, dass die Zellen nach der Aussaat nicht immer einen völlig konfluenten Monolayer gebildet hatten und dort, wo freies Plastik war, Iodid haften bleiben konnte. Dies hätte dann falsch hohe Messwerte zur

Folge. Die Kombination aus tRA und DIDS zeigte sich *in vitro* als quantitativ nicht so effektiv wie die sortierten hNIS GVO-Klone.

Die Zellsortierung ist natürlich nicht klinisch einsetzbar, hilft aber durch die Erhöhung der vorhandenen NIS-Expressionsrate der präklinischen Forschung und eignet sich daher auch gut für Xenografttumorbildung.

Als Vorversuch, bevor die GVO -Zellen in die Versuchstiere injiziert wurden, wurden Zellen auch ohne Zeocin im Kulturmedium gehalten und überprüft, inwieweit dies einen Einfluss auf die Aufnahme von Radioiodid hat bzw. auf die Expression des funktionellen Transportproteins. Es zeigte sich (vgl. **Abb. 27**), dass diese Zellen sich über einen längeren Zeitraum so verhielten wie jene, die weiterhin unter dem Selektionsdruck durch Zeocin standen. Erst nach eineinhalb bzw. drei Monaten zeigte sich, wenn überhaupt, ein signifikanter Unterschied der Zellkulturen *in vitro*. Jedoch erscheint dieser Unterschied im quantitativen Vergleich immer noch relativ klein. Dies sprach für die Stabilität der Transfektion und der funktionellen NIS - Expression in den Tumorzellen, sodass sie für die *in vivo* Experimente eingesetzt wurden.

Eine ähnliche Aussage in der Kontinuität der funktionellen Expression lässt sich zu den Zellkulturen treffen, die parallel zu den in die Versuchstiere injizierten Zellen ohne Zeocin weiter *in vitro* gehalten worden sind.

Für präklinische Untersuchungen sind die GVOs, und insbesondere die durch die Sortierung angereicherten Zellen, von Vorteil, da ihre NIS-Expressionsrate höher liegt. Hierbei ist nämlich eine garantierte und möglichst hohe und stabile Expression entscheidend.

In den *in vivo* Radionuklidenaufnahmeversuchen zeigten die HT29 GVO -Tumoren signifikant die quantitativ höchste Aufnahme an Radioaktivität (Faktor drei bis vier in Bezug auf das Schilddrüsengewebe der jeweiligen Maus, zu der der Tumor gehörte). In Bezug auf die Gewebemasse relativierten sich diese Mehranreicherungen, da der Tumor deutlich größer war als die Schilddrüse der Mäuse. Hierzu muss aber auch beachtet werden, dass der Anteil an vitalem Tumorgewebe bei den HT29 -Tumoren nicht der gesamten Tumormasse entspricht, da der schnell-proliferierende HT29 -Tumor nekrotisch-fibrotische Anteile hat (vgl. **Abb. 32**). Vergleicht man die GVO -Tumor tragenden Versuchstiere mit denen, die einen nativen HT29 -Tumor trugen, zeigte sich, dass bei etwa derselben injizierten Ausgangsradioaktivität der Anteil an Radioaktivität in z. B. der Schilddrüse bei den Nativen höher lag. Dies mag daran liegen, dass die HT29 hNIS -Tumoren einen Anteil der Radioaktivität „wegnahmen“, diese stark iodidaufnehmenden Gewebe also sozusagen um die Radioaktivität konkurrierten, da beide Zellarten einen funktionellen Transporter hatten. Vergleicht man ferner die Aufnahme

an Radioaktivität eines HT29 GVO -Tumors mit dem Schilddrüsengewebe einer einen nativen Tumor tragenden Maus, so zeigte sich, dass der hNIS -Tumor 56 % der Aktivität der „normalen“ Schilddrüse, 43 % der Aktivität des „normalen“ Magens sowie 146 % der Aktivität der „normalen“ Leber aufnahm (vgl. **Abb. 33** und **Tab. 8**). In Bezug auf die anderen Gewebe in der hNIS GVO -tumortragenden Maus, bei der der Tumor also u. a. mit der Schilddrüse um das Iod konkurrierte, zeigte sich etwa ein identischer Wert der Radioiodidaufnahme (s. **Tab. 7**). Dies spricht zum Einen für die angesprochene Konkurrenz der Organe um das vorhandene Iodid zum Anderen aber auch quantitativ für eine hohe funktionelle Expression des Transportproteins im Tumorgewebe.

In Einklang mit den Ergebnissen der Radionuklid Aufnahme steht auch die Szintigraphie der HT29 GVO hNIS -Tumormaus (**Abb. 36**). Am deutlichsten zu erkennen ist der Magen der Versuchstiere, da dieser insgesamt am größten ist und ferner auch relativ viel Radioaktivität aufnimmt. Zudem macht sich als Effekt bemerkbar, dass der Magen der Versuchstiere in Narkose träger ist, was im menschlichen Organismus nicht zu solch einer vermehrten Radioaktivitätsaufnahme führt (Klutz et al. 2011b). Schilddrüse und HT29 GVO -Tumor des Versuchstieres sind ebenfalls klar abzugrenzen. Die szintigraphisch dargestellten Ergebnisse der Radioaktivitätsverteilung (vgl. **Abb. 36**) decken sich mit den in der Literatur beschriebenen (Dwyer et al. 2006a; Klutz et al. 2011 a, b, c), die ebenfalls eine Traceranreicherung in Schilddrüse, Magen und Blase in der Szintigraphie zeigen. Nebenwirkungen der Radioaktivität auf die Blase können durch gesteigerte Diurese und Urinableitung vermieden werden (Spitzweg 2001a, Klutz et al. 2011b). Die relativ hohen Radioaktivitätsmesswerte der Leber (vgl. **Abb. 33** und **34**) liegen einerseits in der hohen Durchblutung des Organs sowie seiner relativ großen Masse begründet, könnten aber andererseits auch bereits ein Hinweis auf eine GVO-Metastase sein. Auch der relativ hohe Messwert der Lunge (**Abb. 33B**) könnte ggf. durch eine GVO-Metastase des Kolonkarzinoms begründet sein. Um dies zu belegen sind die Werte allerdings auch noch zu niedrig. Allerdings sind sowohl die Leber als auch die Lunge in der Literatur mit niedrigen Messwerten der Radioaktivitätsaufnahme beschrieben, was sich auch mit den Ergebnissen der *in vivo* Bildgebung (vgl. **Abb. 36** und **37**) dieser Arbeit deckt (Klutz et al. 2011 b, c).

In der Kleintier SPECT / CT -Aufnahme wird der eben angesprochene Effekt deutlich, dass zwar der hNIS -Tumor insgesamt viel Radioaktivität aufnimmt, diese aber auf den ganzen Tumor verteilt ist (**Abb. 37**). Anhand der Farbkodierung wird deutlich, dass z. B. die Schilddrüse konzentriert viel mehr Radioaktivität aufgenommen hat als der Tumor. Dies lässt sich u.

a. dadurch erklären, dass der mNIS der Mausschilddrüse effektiver arbeitet als der hNIS des Xenotransplantats, was Dayem et al. (2008) bereits beschreiben konnten. Ein anderer Grund dürfte der Ausstrom des Iodids aus dem Tumorgewebe versus der Speicherung im Schilddrüsengewebe sein.

In der Auswertung muss hier ferner mit eingegangen, dass der HT29 -Tumor nekrotische Anteile und damit nicht funktionell stoffwechselaktive hat. Dies führt dazu, dass die nekrotischen Anteile weniger bis gar keine Radioaktivität aufnehmen können, da hier untergegangenes bzw. stoffwechselinaktives Gewebe vorliegt, das auch weniger durchblutet ist. Dies führt im Tumorgewebe zu einer anteiligen Minderaufnahme an Radioaktivität im Vergleich zu vitalem Gewebe. Das hNIS-transfizierte Tumorxenograftmodell bietet die Möglichkeit einer Validierung der tumorspezifischen Traceraufnahme und kann mit weiteren Bildgebungsverfahren kombiniert werden. Brandt et al. (2012) untersuchten kürzlich die Radionuklidakkumulation (^{123}I) durch NIS mittels Kleintier- SPECTs im Vergleich von Mausschild- und speicheldrüse in Bezug auf die quantitative Radionuklid Aufnahme der „region-of-interest“ (ROI) und die Störung der Bildgebung durch unterschiedliche Variablen und experimentelle Designs. Sie kamen zu dem Schluss, dass das Kleintier- SPECT auch in der Lage ist, kleine Änderungen der Aktivitätsaufnahme und -akkumulation der Gewebe durch Pharmaka aufzulösen und darzustellen (Brandt et al. 2012), was angesichts der Größenverhältnisse in Bezug auf die Auflösung enorm erscheint.

Der Vorteil des SPECT / CTs im Vergleich zur γ -Kamera liegt u. a. auch in der Dreidimensionalität der Bilder (**Abb. 37** gibt jeweils nur zwei ausgewählte dargestellte Bilder der 360°-Bildsequenzen wieder). PET und SPECT geben quantitative und nicht-invasive Informationen über die NIS-Genexpression bzw. die Anzahl der NIS-exprimierenden Zellen wieder (Ahn 2012).

In der Immunhistochemie konnte die hNIS -Expression sowohl für die Zellpellets der MCF-7 hNIS post 2. sort GVO -Zellen als auch für den HT29 hNIS post 3. sort GVO -Tumor durch oberflächliche Anfärbung der jeweiligen Zellen nachgewiesen werden.

Dabei zeigte sich eine deutlich stärkere Anfärbung der Zellpellets, wobei ähnlich wie bei der Objektträgerfärbung die randständige Anfärbung, entsprechend der membranösen Expression des hNIS -Proteins, auffällig ist. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit den in der Literatur (Spitzweg et al. 1999b mit demselben Antikörper) beschriebenen Ergebnissen. Vayre et al. (1999) verwendeten einen anderen Antikörper zum NIS-Proteinnachweis. Eine weitere Ausarbeitung der Immunhistochemie ist in unserer Arbeitsgruppe geplant.

NIS kann sowohl als „Reporter-gen“ (zwecks Überwachung) als auch als therapeutisches Gen eingesetzt werden und der Gentransfer macht die Bildgebung, das Monitoring und die Behandlung mittels Radionukliden wie beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom auch bei anderen Tumorentitäten möglich (Ahn 2012). Ein weiterer Vorteil dieses Transportproteins ist, dass bereits eine Vielzahl an weit verbreiteten Radiopharmakons zur Verfügung steht (Ahn 2012).

Moon et al. (2001) konnten mittels RT-PCR und Szintigraphie zeigen, dass ein (Brustkrebs-) Tumor erst bei einer hohen NIS-Expressionsrate dargestellt werden kann.

Wichtig für eine erfolgreiche, möglicherweise klinische, Anwendung des NIS -Proteins in extrathyreoidalen Geweben ist folglich eine ausreichend hohe funktionelle Proteinexpression wie z. B. bei den für die *in vivo* Experimente verwendeten HT29 GVOs. Die extrathyreoidale hormonelle Regulation der NIS -Expression ist allerdings nur teilweise geklärt. In der Schilddrüse ist die NIS -Expression TSH-gesteuert, in anderen NIS-exprimierenden Geweben hat TSH allerdings keinen Einfluss auf die Expression (Carrasco 1993, Dohán et al. 2003). Im Brustgewebe erfolgt eine hormonelle Regulation durch Oxytocin mit einem verstärkenden Effekt der Hormone Prolaktin und Östrogen (Boelaert und Franklyn 2003, Welch und Mankoff 2000). Hieraus ergibt sich die Frage, wie man die extrathyreoidale funktionelle Proteinexpression, möglichst gezielt und nebenwirkungsarm, steigern kann.

Kogai et al. (2005) konnten für MCF-7 -Zellen zeigen, dass bei einer Kombination der tRA-Stimulation mit Dexamethason die Retinsäuredosierung für den gleichen Effekt reduziert werden konnte und die NIS-Induktion verlängert wurde, was auf eine höhere Effektivität einer Behandlung mit radioaktiven Nukliden schließen ließ. Dies ist ein interessanter Ansatz, der durch unsere Arbeitsgruppe weiter verfolgt werden wird. Ella und Short (2009) kamen zu der Ansicht, dass die Fähigkeit der Retinoide Zellen zu redifferenzieren selbst in der Schilddrüsentherapie noch nicht ausgereizt sei. In der Forschung werden auch mehrere synthetische Analoga ausprobiert, um u. a. die Toxizität zu senken und die Effektivität der NIS-Induktion und -Expression zu erhöhen (Ella und Short 2009).

Nachdem Unterholzner et al. (2006) an MCF-7 -Zellen in ähnlicher Weise wie Kogai et al. (2005) demonstrieren konnten, dass Dexamethason *in vitro* die durch tRA- induzierte NIS-Expression verstärkt, fanden Willhauck et al. (2008b) ein analoges Ergebnis (der erfolgreich induzierten NIS-Expression) bei *in vivo* Xenotransplantationsmausmodellen und i. p. - Injektion der Radioaktivität. Mittels *in vivo* γ -Kamera-Bildgebung waren lediglich tRA-stimulierte Tumoren nicht zu sehen, durch die Kombination mit Dexamethason hingegen

schon. Ex vivo γ -Kamera-Messungen wiesen allerdings lediglich eine 3,3-fache Iodidakkumulation im Vergleich zu Kontrolltumoren auf. Scholz et al. (2004) setzten Dexamethason in Kombination mit NIS erfolgreich bei Prostatazellen ein. Dies ist im Verhältnis ein relativ geringer Wert, weist aber dennoch Potential auf, da u. a. durch die Kombination einzelner Pharmaka die Dosis des einzelnen reduziert werden könnte, um somit eventuell eintretende Nebenwirkungen zu minimieren und ggf. trotzdem denselben gewünschten Effekt zu erzielen. Eine Kombination aus tRA-Stimulation und DIDS zur Hemmung des Iodidausstroms erscheint für die klinische Anwendung überlegenswert.

Simon et al. (2002) konnten zeigen, dass die klinische Anwendung von Retinsäure zu einem signifikanten (19/50 Patienten) Ansprechen von Schilddrüsentumorpatienten in einer Pilot-Studie führte. Folglich kann man davon ausgehen, dass auch ein klinischer Einsatz in der onkologischen Therapie anderer Tumorentitäten möglich sein müsste.

Ella und Short (2009) kamen zu dem Ergebnis, dass, auch wenn einige Studien eine Ansprechrate von 26-40 % bei der Therapie mit Retinoiden von entdifferenzierten Schilddrüsentumorarten zeigten, die klinische Forschung dies bislang nicht hinlänglich bestätigen konnte. Beispielsweise veröffentlichten Short et al. (2004) eine Phase II Studie, in der ausgesuchte Schilddrüsenkarzinompatienten mit Isoretinoin behandelt wurden. Von den 15 Patienten (neun mit metastasiertem papillärem, fünf mit metastasiertem follikulärem und zwei mit einem Hürthle-Zell-Karzinom) kam es nur bei einem Patienten zu einer Zunahme der Radioiodidaufnahme unter Behandlung. Ryan et al. (2011) wiesen daraufhin, dass Schilddrüsenhormone auch die NIS-Expression in Brustkrebs beeinflusst. Allerdings bleibt sowohl speziell in der Schilddrüse als auch in der NIS-Expressionstherapie im Allgemeinen die Rolle der Retinoide weiterhin Bestandteil der Forschung.

2007 konnten Provenzano et al. (2007) zeigen, dass die epigenetisch modifizierenden Pharmaka Butyrat und Decitabine (5-Aza-dC) zu einer acht- bzw. neunfach erhöhten Radioiodidaufnahme *in vitro* bei Schilddrüsenkarzinomzellen führte. Diese sind also eine weitere Option für *in vivo* Experimente. Vivaldi et al. (2009) kombinierten 5-Aza-2'-deoxycytidine und Retinsäure ebenfalls bei Schilddrüsenkarzinomzellen und konnten dadurch ein vermindertes Zellwachstum feststellen und eine vermehrte NIS mRNA nachweisen. Diese führte allerdings, möglicherweise wegen mangelnder membranöser Expression, nicht zu einer funktionellen NIS-Expression. Guo et al. (2010) setzten Butyrat bei Lungenadenokarzinomzellen ein und konnten eine Abhängigkeit der NIS-Expression von der eingesetzten Buty-

ratkonzentration nachweisen, sodass ggf. auch dieses Pharmakon als Alternative zu den Retinoiden oder auch zusätzlich eingesetzt werden könnte.

Ein NIS-Genstransfer mittels eines adenoviralen Vektors führte bei humanen Gliomzellen zur Iodakkumulation (Cho et al 2000). Weiterhin konnte sowohl mit adenoviralen und retroviralen Vektoren mit rNIS und Infektion von Krebszelllinien (Brust, Prostata, Zervix und Lunge) als auch durch lokale Injektion in Zervix- und Brustkrebs -Xenografttumoren bei Mäusen ein selektiver Zelluntergang durch ^{131}I erzielt werden (Boland et al. 2000, Mandell et al. 1999, Boelaert und Franklyn 2003), der allerdings *in vivo* nicht unbedingt signifikant war.

Haberkorn et al. (2010) geben zu bedenken, dass *in vivo* eingesetzte Radionuklide mit einer Aktivitätsmenge von 74 bzw. 111 MBq 11100 bzw. 16650 MBq/m² bei der Maus (Prostatakarzinomxenograftmodell) entsprechen und dass z. B. für die Eliminierung von Metastasen bei Schilddrüsenkarzinompatienten eine absorbierte Dosis von 80 Gy benötigt wird, um einen klinisch-therapeutischen Effekt zu erzielen. Die erstgenannten Zahlen zeigen, dass bei den präklinischen *in vivo* Versuchen bisher noch sehr hohe Strahlungsmengen benötigt werden, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen.

Aufgrund seiner höheren Energie und der kürzeren Halbwertszeit im Vergleich zu ^{131}I , ist die Anwendung von ^{188}Re von Vorteil, wenn man hohe Energien in kurzer Zeit applizieren möchte (Willhauck et al. 2007). ^{188}Re ist ein β -Strahler mit einer HWZ von 16,7 h, der klinisch z. B. bei Knochenmetastasen eingesetzt wird, und in Bezug auf die Tumorreduktion ^{131}I vor allem bei größerem Tumolvolumen überlegen.

Die NIS-basierte Gentherapie ist ein vielversprechendes, weites Feld aktueller Forschung, vor allem, wenn NIS synergistisch mit anderen Genen wie Canstatin (ein Angiogenesehemmer; Magnon et al 2007) oder mit viraler Therapie (Dingli et. 2004, Goel et al 2007) eingesetzt wird. NIS-Expression in Tumorzellen kann zum Einen zur Zellzerstörung durch Radioiodtherapie, zum Anderen aber auch für *in vivo* Bildgebung / zur Überwachung und bei der Entwicklung und Erforschung sicherer und effizienter Genstransfersysteme (Dayem et al. 2008) eingesetzt werden.

U. a. Chen et al. (2006) konnten mittels ^{131}I einen therapeutischen Effekt auf NIS-transfizierte Leberzellen (MH3924A) *in vitro* (86% der GVOs vs. 5% der nativen Zellen durch 3,7MBq / ml ^{131}I) und *in vivo* (i. p. -Injektion von ^{131}I) nachweisen. Sie fanden eine bis zu 240-fache höhere ^{125}I -Aufnahme der GVOs im Vergleich zu den Wildtypzellen und konnten eine Mehraufnahme durch den Einsatz von DIDS nachweisen (Chen et al. 2006).

Ein Vorteil der Radioiodtherapie mit ^{131}I ist, dass man das Isotop aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften sowohl zur Tumorzellzerstörung als auch für die Bildgebung nutzen kann (Silberstein 2012). Nach Aufnahme hat es strahlungsbedingt eine zytotoxische Wirkung, die sich ebenfalls auf die umliegenden Zellen auswirkt und erreicht damit ggf. auch nicht-NIS-exprimierende Tumorzellen in der Umgebung (bystander effect):

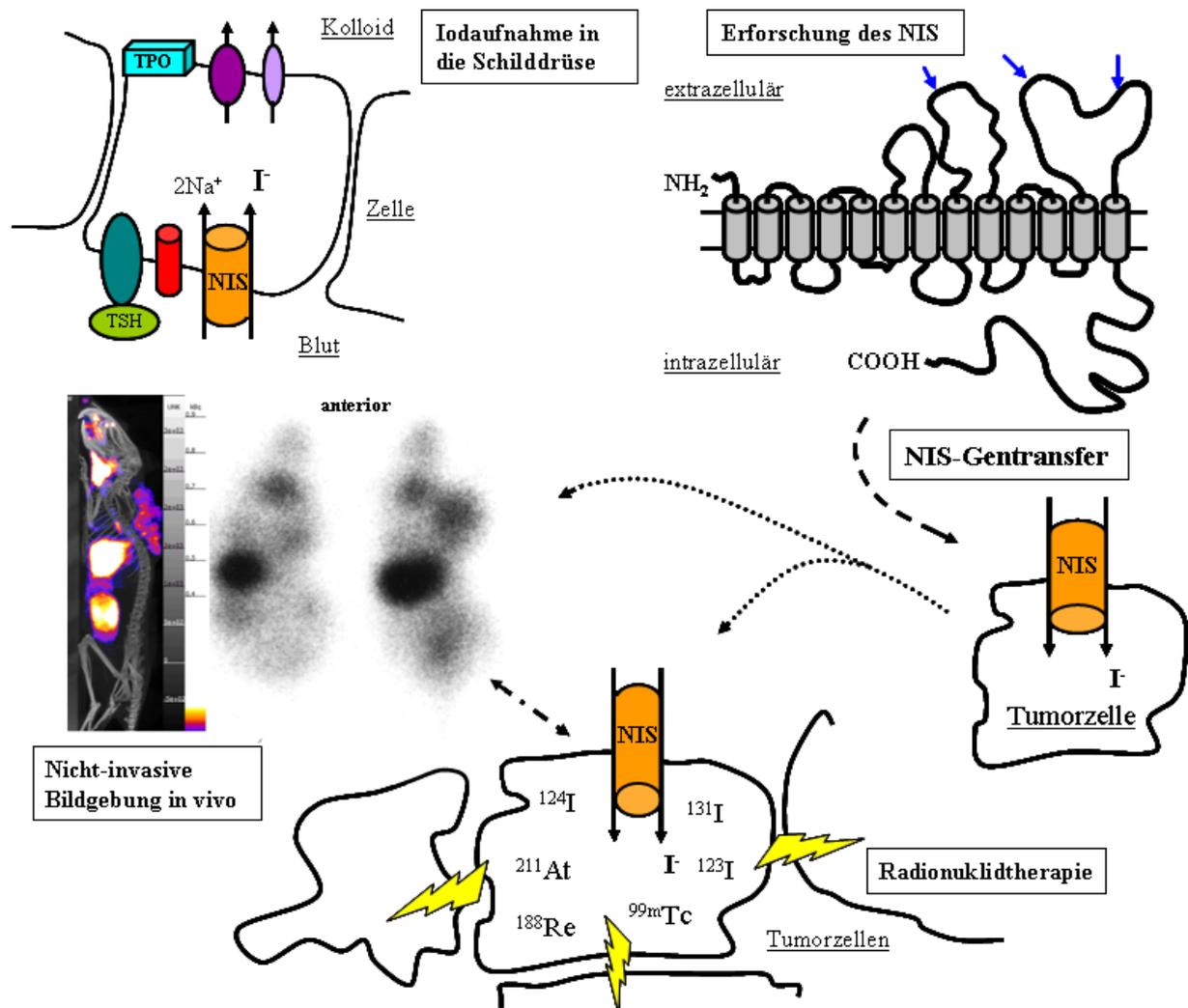


Abb. 42: Schematische Darstellung der NIS-Nutzung via Gentransfer. Links oben sieht man den NIS basal in der Zellmembran, wo er Iodid aus dem Interstitium in die Zelle transferiert. Rechts daneben ist eine schematische Abbildung der Aminosäurekette des NIS gezeigt. Die bisherige Forschung an diesem Transportprotein macht es möglich, es auch für die Erforschung anderer (Tumor-) Zellen, wie in dieser Arbeit geschehen, zu nutzen. Gelingt ein erfolgreicher Gentransfer in Zellen, die den NIS normalerweise nicht funktionell überexprimieren, kann man diesen analog zur aktuellen Diagnostik und Therapie bei der Schilddrüse für andere (Tumor-) Zellen verwenden. So gelingt beispielsweise eine *in vivo* Bildgebung eines hNIS-exprimieren HT29 GVO -Tumors (Abb. links unten). Denkbar und von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt, ist ebenfalls die therapeutische Nutzung von NIS via Radioiodtherapie in extrathyreoidalen Geweben. Die gelben Pfeile stellen den bystander effect dar. (Modifiziert nach Spitzweg und Morris 2004).

Magnon et al. (2007) konnten zeigen, dass die o. g. Kombination gezielter Radioiodidtherapie und Angiogenesehemmung die direkte Tumorzellapoptose verstärkt und damit schnell zu letalem Zelluntergang führt. Der Transfer des NIS in andere Gewebe ist ein neuer therapeutischer Fortschritt, den es gezielt und nebenwirkungsarm nutzbar zu machen gilt. Jedoch konnten z. B. Boland et al. (2000) durch die Infektion von Xenograftmaustumoren mit einem Adenovirus, das auch NIS trug, und anschließender ^{131}I -Therapie im klinischen Setting keine signifikante Tumorgrößenreduktion feststellen. Diese Arbeitsgruppe verwendete u. a. auch MCF-7- und HT29 -Zellen. Allerdings muss auch erwähnt werden, dass diese Arbeitsgruppe das Radionuklid i. p. injizierte, was ggf. die Aufnahme der Radionuklide in die Blutbahn und darüber in den Tumor verschlechterte (Boland et al. 2000).

Obwohl NIS bereits seit mehr als einem halben Jahrhundert in der Klinik diagnostisch und therapeutisch eingesetzt wird, versteht man von der Biologie des Proteins erst seit etwa zwei Jahrzehnten zunehmend etwas (Ahn 2012).

Ein wichtiger Punkt aktueller Tumorforschung ist es also, einen zielsicheren tumorspezifischen Gentransfer bei geringer Toxizität und hoher Sicherheit zu finden, um einen klinischen Einsatz zu ermöglichen (Spitzweg 2009). Hierbei scheinen replikationsselektive virale Vektoren und die modernen hocheffizienten nicht-viralen biologisch-abbaubaren Polymere, die also im Organismus abgebaut werden und momentan die vielversprechendsten Ansätze darzustellen. Erste klinische Studien laufen derzeit oder sind abgeschlossen (z. B. Phase I Studie für Prostatakarzinompatienten mit intraprostatischer Virusinjektion, Barton et al. 2008). U. U. könnte man diese noch mit o. g. Pharmaka kombinieren, um eine möglichst hohe funktionelle Proteinexpression und Iodidaufnahme zu generieren und ggf. die Einzeldosen der Pharmaka und damit deren Nebenwirkungen zu minimieren. Weitere Forschung ist notwendig, um das beste System zu finden.

Zusammenfassung

Der humane Natrium-Iodid-Symporter hat die einzigartige Funktion, Iodid gegen seinen Konzentrationsgradienten aus den Gefäßen in die Schilddrüse aufzunehmen, wo es schnell weitertransportiert und gespeichert wird. Damit bildet er die Grundlage für Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen, was man sich bereits seit etwa 200 Jahren zunutze macht.

Seit der Klonierung des Symportergens Mitte der 1990er Jahre wird versucht, das Transportprotein sowohl für weitere Schilddrüsenerkrankungen als auch für extrathyreoidale Tumoren nutzbar zu machen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass NIS auch in extrathyreoidalen Geweben exprimiert wird. Die Iodverweildauer ist hier allerdings deutlich geringer, da es nicht gespeichert wird und i. d. R. schnell wieder aus den Zellen gelangt. Einige Zellarten können auch durch verschiedene Pharmaka zur NIS-Expression stimuliert werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigen im Einklang mit der aktuellen Literatur, dass man MCF-7 -Brustkrebszellen mittels tRA zur hNIS-Expression stimulieren kann. Durch die Transfektion konnten die gleichen Brustkrebszellen sowie HT29 -Kolonkarzinomzellen zur funktionellen hNIS-Expression gebracht werden. Durch durchflusszytometrisch-gesteuerte Zellsortierung wurden die gentechnisch veränderten Zellen in Bezug auf ihre NIS-Expression angereichert. Um Radionuklide zur Therapie extrathyreoidaler Tumoren einsetzen zu können, muss eine erhöhte Nuklidakkumulation in diesen Zellen erreicht werden. Deshalb wurde *in vitro* DIDS als nicht-selektiver Anionenkanalblocker mit signifikantem Effekt eingesetzt. Weiterhin wurde der qualitative Unterschied in der Radioiodidaufnahme sowie im -ausstrom bei den beschriebenen Zellen verglichen und erste *in vivo* Versuche unternommen. Ein derartiger gleichzeitiger qualitativer Vergleich ist bislang noch nicht beschrieben worden.

Es zeigte sich, dass die oben beschriebenen erfolgreich gentechnisch veränderten und somit hNIS funktionell überexprimierende MCF-7 und HT29 -Zellen am meisten Radioiodid aufnahmen. Der Effekt von DIDS ist umso größer, je mehr Radioaktivität gepumpt wird. Die nach durchflusszytometrisch-gesteuerter Zellsortierung angereicherten hNIS überexprimierenden HT29 -Zellen wurden auch *in vivo* getestet und zeigten eine mit der Schilddrüse vergleichbare Iodidanreicherung. Auch erste bildgebende Verfahren spiegeln dies wider.

Es bleibt jedoch weitere Forschung notwendig, die Bildgebungsverfahren zu verbessern und ein klinisch sicheres, einsetzbares und effektives NIS-Transfersystem zu entwickeln.

Literaturverzeichnis

Ahn BC (2012) Sodium iodide symporter for nuclear molecular imaging and gene therapy: from bedside to bench and back. *Theranostics*. 2:392-402.

Amphoux-Fazekas T, Samih N, Hovsépian S, Aouani A, Beauwens R, Fayet G (1998) DIDS (4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonic acid) increases iodide trapping, inhibits thyroperoxidase and antagonizes the TSH-induced apical iodide efflux in porcine thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol*. 141:129-40.

ATCC [Online im Internet.] URL:

<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CRL-1687&Template=cellBiology> [Stand 22.08. 2013 14:32].

Barker HM (1936) The blood cyanates in the treatment of hypertension. *JAMA* 106:762–767.

Barton KN, Stricker H, Brown SL, Elshaikh M, Aref I, Lu M, Pegg J, Zhang Y, Karvelis KC, Siddiqui F, Kim JH, Freytag SO, Movsas B (2008) Phase I study of noninvasive imaging of adenovirus-mediated gene expression in the human prostate. *Mol Ther*. 16:1761-9.

Baumann E (1896) Über den Jodgehalt der Schilddrüsen von Menschen und Tieren. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 22:1–17.

Becker DV, Sawin CT (1996) Radioiodine and thyroid disease: the beginning. *Semin Nucl Med*. 26:155-64.

Beierwaltes WH (1979) The history of the use of radioactive iodine. *Semin Nucl Med*. 9:151-5.

Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U, Kurth BM (2010) Prävalenz von Krebserkrankungen in Deutschland. -. [Online im Internet.]

URL:http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Poster/praevalenz_dgepi2011.pdf?__blob=publicationFile [Stand 22.08.2013 15:32Uhr].

- Bizhanova A, Kopp P (2009) Minireview: The Sodium-Iodide Symporter NIS and Pendrin in Iodide Homeostasis of the Thyroid. *Endocrinology*, 150:1084–1090.
- Boelaert K, Franklyn JA (2003) Sodium iodide symporter: a novel strategy to target breast, prostate, and other cancers? *Lancet*. 361:796-7.
- Boland A, Ricard M, Opolon P, Bidart JM, Yeh P, Filetti S, Schlumberger M, Perricaudet M (2000) Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. *Cancer Res*. 60:3484-92.
- Bolliger TT, Witcofski RL, Whitley JE, Maynard CD (1965) The demonstration of extracranial neoplasms with ^{99m}Tc pertechnetate. *J Nucl Med*. 6:687-9.
- Brandt MP, Kloos RT, Shen DH, Zhang X, Liu YY, Jhiang S (2012) Micro-single-photon emission computed image acquisition and quantification of sodium-iodide symporter mediated radionuclide accumulation in mouse thyroid and salivary glands. *Thyroid*. 22:617-24.
- Cabantchik ZI, Greger R (1992) Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am J Physiol*. 262:C803-27.
- Calmels T, Parriche M, Durand H, Tiraby G (1991) High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr Genet*. 20:309-14.
- Carrasco N (1993) Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta*. 1154:65-82.
- Carratù MR, Marasco C, Mangialardi G, Vacca A (2012) Retinoids: novel immunomodulators and tumour-suppressive agents? *British Journal of Pharmacology* 167: 483-492.
- Carvalho DP, Ferreira AC (2007) The importance of sodium/iodide symporter (NIS) for thyroid cancer management. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 51:672-82.

Castro MR, Bergert ER, Beito TG, McIver B, Goellner JR, Morris JC (1999a) Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:2957-62.

Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Roche PC, Ziesmer SC, Jhiang SM, Goellner JR, Morris JC (1999b) Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer. *J Endocrinol.* 163:495-504.

Cengic N, Baker CH, Schütz M, Göke B, Morris JC, Spitzweg C (2005) A novel therapeutic strategy for medullary thyroid cancer based on radioiodine therapy following tissue-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 90:4457-64.

Chen L, Altmann A, Mier W, Eskerski H, Leotta K, Guo L, Zhu R, Haberkorn U (2006) Radioiodine therapy of hepatoma using targeted transfer of the human sodium/iodide symporter gene. *J Nucl Med.* 47:854-62.

Chen RF, Li ZH, Pan QH, Zhou JJ, Tang QB, Yu FY, Zhou QB, Wang J, Chen JS (2007) In vivo radioiodide imaging and treatment of pancreatic cancer xenografts after MUC1 promoter-driven expression of the human sodium-iodide symporter. *Pancreatology.* 7:505-13.

Cho JY, Xing S, Liu X, Buckwalter TL, Hwa L, Sferra TJ, Chiu IM, Jhiang SM (2000) Expression and activity of human Na⁺/I⁻ symporter in human glioma cells by adenovirus-mediated gene delivery. *Gene Ther.* 7:740-9.

Cho JY, Shen DH, Yang W, Williams B, Buckwalter TL, La Perle KM, Hinkle G, Pozderac R, Kloos R, Nagaraja HN, Barth RF, Jhiang SM (2002) In vivo imaging and radioiodine therapy following sodium iodide symporter gene transfer in animal model of intracerebral gliomas. *Gene Ther.* 9:1139-45.

CLS: [Online im Internet.] URL: http://www.cell-lines-service.de/content/e3969/e4490/e4526/index_ger.html [Stand 22.08.2013 16:34].

Dadachova E, Bouzahzah B, Zuckier LS, Pestell RG (2002) Rhenium-188 as an alternative to Iodine-131 for treatment of breast tumors expressing the sodium/iodide symporter (NIS). *Nucl Med Biol.* 29:13-8.

Dai G, Levy O, Carrasco N (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.*379:458-60.

Daniels GH, Haber DA (2000) Will radioiodine be useful in treatment of breast cancer? *Nat Med.* 6:859-60.

Dayem M, Basquin C, Navarro V, Carrier P, Marsault R, Chang P, Huc S, Darrouzet E, Lindenthal S, Pourcher T (2008) Comparison of expressed human and mouse sodium/iodide symporters reveals differences in transport properties and subcellular localization. *J Endocrinol.* 197:95-109.

De La Vieja A, Dohán O, Levy O, Carrasco N (2000) Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* 80:1083-105.

Dingli D, Diaz RM, Bergert ER, O'Connor MK, Morris JC, Russell SJ (2003) Genetically targeted radiotherapy for multiple myeloma. *Blood.* 102:489-96.

Dingli D, Peng KW, Harvey ME, Greipp PR, O'Connor MK, Cattaneo R, Morris JC, Russell SJ (2004) Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter. *Blood.* 103:1641-6.

Dohán O, Carrasco N (2003) Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol.* 213:59-70.

Dohán O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N (2003) The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev.* 24:48-77.

Drocourt D, Calmels T, Reynes JP, Baron M, Tiraby G (1990) Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res.* 18:4009.

DSMZ: [Online im Internet.] URL: <http://www.dsmz.de/de/kataloge/katalog-menschliche-und-tierische-zelllinien.html#searchResult> [Stand 22.08. 2013 16:42].

Dwyer RM, Bergert ER, O'connor MK, Gendler SJ, Morris JC (2005) In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide symporter. *Clin Cancer Res.* 11:1483-9.

Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC (2006a) Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide symporter permits in vivo radioiodide imaging and therapy of pancreatic tumors. *Hum Gene Ther.* 17:661-8.

Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC (2006b) Sodium iodide symporter-mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice. *Gene Ther.* 13:60-6.

Dwyer RM, Ryan J, Havelin RJ, Morris JC, Miller BW, Liu Z, Flavin R, O'Flatharta C, Foley MJ, Barrett HH, Murphy JM, Barry FP, O'Brien T, Kerin MJ (2011) Mesenchymal Stem Cell-mediated delivery of the sodium iodide symporter supports radionuclide imaging and treatment of breast cancer. *Stem Cells.* 29:1149-57.

Elisei R, Vivaldi A, Ciampi R, Faviana P, Basolo F, Santini F, Traino C, Pacini F, Pinchera A (2006) Treatment with drugs able to reduce iodine efflux significantly increases the intracellular retention time in thyroid cancer cells stably transfected with sodium iodide symporter complementary deoxyribonucleic acid. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:2389-95.

Ella W, Short S (2009) Using retinoids to increase radioiodine uptake in thyroid cancer: role as potential redifferentiation agents. In: *Comprehensive Handbook of Iodine. Nutritional, Biochemical, Pathological and Therapeutic Aspects.* 1. Auflage; Preedy VR, Burrow GN and Watson RR, Elsevier Inc., 991-999.

Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N (1997) Thyroid Na⁺/I symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem.* 272:27230-8.

Evans TRJ, Kaye SB (1999) Retinoids: present role and future potential. *British Journal of Cancer.* 80:1-8.

FACS Sorting Core Unit. [Online im Internet.] URL: http://www.uke.de/medizinische-fakultaet/core-facilities/index_ENG_75406.php?id=7_0_0&as_link=http%3A//www.uke.de/medizinische-fakultaet/core-facilities/index_ENG_75406.php&id_link=-1_-1_-1&as_breadcrumb=%20%20Core%20Facilities [Stand 22.08.2013 17:30 Uhr].

Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M (1999) Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol.* 141:443-57.

Fernandez-Ulloa M, Maxon HR, Mehta S, Sholiton LJ (1976) Iodine 131 uptake by primary lung adenocarcinoma. Misinterpretation of 131I scan. *JAMA.* 236:857-8.

Gärtner R, Reincke M (2006) Schilddrüse. In: *Klinische Pathophysiologie.* Siegenthaler W, Blum HE (Hrsg) Georg Thieme Verlag KG, 270-279.

Gärtner FC (2009) Untersuchungen über die endogene Expression und Regulation des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) in extrathyreoidalen Tumoren in vitro und in vivo. *Med. Dissertation.* Ludwig-Maximilian-Universität München.

Gatignol A, Baron M, Tiraby G (1987) Phleomycin resistance encoded by the ble gene from transposon Tn 5 as a dominant selectable marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 207:342-8.

Goel A, Carlson SK, Classic KL, Greiner S, Naik S, Power AT, Bell JC, Russell SJ (2007) Radioiodide imaging and radiovirotherapy of multiple myeloma using VSV(Delta51)-NIS, an

attenuated vesicular stomatitis virus encoding the sodium iodide symporter gene. *Blood*. 110:2342-50.

Grünwald GK, Klutz K, Willhauck MJ, Schwenk N, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, Zach C, Göke B, Holm PS, Spitzweg C (2012) Sodium iodide symporter (NIS)-mediated radiovirotherapy of hepatocellular cancer using a conditionally replicating adenovirus. *Gene Ther*. 20:625-33.

Guo R, Zhang Y, Liang S, Xu H, Zhang M, Li B (2010) Sodium butyrate enhances the expression of baculovirus-mediated sodium/iodide symporter gene in A549 lung adenocarcinoma cells. *Nucl Med Commun*. 31:916-21.

Haberkorn U (2001) Gene therapy with sodium/iodide symporter in hepatocarcinoma. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 109:60-2.

Haberkorn U, Askoxylakis V, Markert A, Altmann A (2010) Gentechnisch modulierte Iodidanreicherung in malignen Tumoren. *Nuklearmedizin*. 49 Suppl 1:S21-5.

Haberland J, Bertz J, Wolf U, Ziese T, Kurth BM (2010): German cancer statistics 2004. *BMC Cancer* 10:52-75.

Haddad D, Chen NG, Zhang Q, Chen CH, Yu YA, Gonzalez L, Carpenter SG, Carson J, Au J, Mitra A, Gonen M, Zanzonico PB, Fong Y, Szalay AA (2011) Insertion of the human sodium iodide symporter to facilitate deep tissue imaging does not alter oncolytic or replication capability of a novel vaccinia virus. *J Transl Med*. 9:36.

Haddad D, Chen CH, Carlin S, Silberhumer G, Chen NG, Zhang Q, Longo V, Carpenter SG, Mitra A, Carson J, Au J, Gonen M, Zanzonico PB, Szalay AA, Fong Y (2012) Imaging characteristics, tissue distribution, and spread of a novel oncolytic vaccinia virus carrying the human sodium iodide symporter. *PLoS One*. 7:e41647.

Heltemes LM, Hagan CR, Mitrofanova EE, Panchal RG, Guo J, Link CJ (2003) The rat sodium iodide Symporter gene permits more effective radioisotope concentration than the

human sodium iodide Symporter gene in human and rodent cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 10:14-22.

Heine M, Nollau P, Masslo C, Nielsen P, Freund B, Bruns OT, Reimer R, Hohenberg H, Peldschus K, Ittrich H, Schumacher U (2011) Investigations on the usefulness of CEACAMs as potential imaging targets for molecular imaging purposes. *PLoS One*. 6:e28030.

Hervé J, Cunha AS, Liu B, Valogne Y, Longuet M, Boisgard R, Brégerie O, Roux J, Guettier C, Calès P, Tavitian B, Samuel D, Clerc J, Bréchet C, Faivre J (2008) Internal radiotherapy of liver cancer with rat hepatocarcinoma-intestine-pancreas gene as a liver tumor-specific promoter. *Hum Gene Ther*. 19:915-26.

Hutzen B, Pierson CR, Russell SJ, Galanis E, Raffel C, Studebaker AW (2012) Treatment of medulloblastoma using an oncolytic measles virus encoding the thyroïdal sodium iodide symporter shows enhanced efficacy with radioiodine. *BMC Cancer*. 12:508.

Jessen F, Sjøholm C, Hoffmann EK (1986) Identification of the anion exchange protein of Ehrlich cells: a kinetic analysis of the inhibitory effects of 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid (DIDS) and labeling of membrane proteins with 3H-DIDS. *J Membr Biol*. 92:195-205.

Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, McGaughy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL (1998) An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology*. 139:4416-9.

Kadish AS, Tansey FA, Yu GS, Doyle AT, Bloom BR (1980) Interferon as a mediator of human lymphocyte suppression. *J Exp Med*. 151:637-50.

Kakinuma H, Bergert ER, Spitzweg C, Chevillie JC, Lieber MM, Morris JC (2003) Probasin promoter (ARR(2)PB)-driven, prostate-specific expression of the human sodium iodide symporter (h-NIS) for targeted radioiodine therapy of prostate cancer. *Cancer Res*. 63:7840-4.

Kalinina T, Güngör C, Thieltges S, Möller-Krull M, Penas EM, Wicklein D, Streichert T, Schumacher U, Kalinin V, Simon R, Otto B, Dierlamm J, Schwarzenbach H, Effenberger KE, Bockhorn M, Izbicki JR, Yekebas EF (2010) Establishment and characterization of a new human pancreatic adenocarcinoma cell line with high metastatic potential to the lung. *BMC Cancer*. 10:295.

Kilbane MT, Ajjan RA, Weetman AP, Dwyer R, McDermott EW, O'Higgins NJ, Smyth PP (2000) Tissue iodine content and serum-mediated ¹²⁵I uptake-blocking activity in breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 85:1245-50.

Klutz K, Russ V, Willhauck MJ, Wunderlich N, Zach C, Gildehaus FJ, Göke B, Wagner E, Ogris M, Spitzweg C (2009) Targeted radioiodine therapy of neuroblastoma tumors following systemic nonviral delivery of the sodium iodide symporter gene. *Clin Cancer Res*. 15:6079-86.

Klutz K, Schaffert D, Willhauck MJ, Grünwald GK, Haase R, Wunderlich N, Zach C, Gildehaus FJ, Senekowitsch-Schmidtke R, Göke B, Wagner E, Ogris M, Spitzweg C (2011a) Epidermal growth factor receptor-targeted (¹³¹I)-therapy of liver cancer following systemic delivery of the sodium iodide symporter gene. *Mol Ther*. 19:676-85.

Klutz K, Willhauck MJ, Wunderlich N, Zach C, Anton M, Senekowitsch-Schmidtke R, Göke B, Spitzweg C (2011b) Sodium Iodide Symporter (NIS)-Mediated Radionuclide (¹³¹I, ¹⁸⁸Re) Therapy of Liver Cancer After Transcriptionally Targeted Intratumoral in Vivo NIS Gene Delivery. *Human Gene Therapy* 22:1403–1412.

Klutz K, Willhauck MJ, Dohmen C, Wunderlich N, Knoop K, Zach C, Senekowitsch-Schmidtke R, Gildehaus F-J, Ziegler S, Fürst S, Göke B, Wagner E, Ogris M, Spitzweg C (2011c) Image-Guided Tumor-Selective Radioiodine Therapy of Liver Cancer After Systemic Nonviral Delivery of the Sodium Iodide Symporter Gene. *Human Gene Therapy* 22:1563–1574.

Knoop K, Kolokythas M, Klutz K, Willhauck MJ, Wunderlich N, Draganovici D, Zach C, Gildehaus FJ, Böning G, Göke B, Wagner E, Nelson PJ, Spitzweg C (2011) Image-guided,

tumor stroma-targeted ^{131}I therapy of hepatocellular cancer after systemic mesenchymal stem cell-mediated NIS gene delivery. *Mol Ther.* 19:1704-13.

Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T (1997) Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology.* 138:2227-32.

Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, Huang M, Brent GA (2000) Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:8519-24.

Kogai T, Kanamoto Y, Che LH, Taki K, Moatamed F, Schultz JJ, Brent GA (2004). Systemic Retinoic Acid Treatment Induces Sodium/Iodide Symporter Expression and Radioiodide Uptake in Mouse Breast Cancer Models. *CANCER RESEARCH* 64:415-422.

Kogai T, Kanamoto Y, Li AI, Che LH, Ohashi E, Taki K, Chandraratna RA, Saito T, Brent GA (2005). Differential regulation of sodium/iodide symporter (NIS) gene expression by nuclear receptor ligands in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146:3059–3069.

Kogai T, Taki K, Brent GA (2006) Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 13:797-826.

Kraywinkel K, Barnes B, Bertz J, Haberland J, Wolf U (2012) Aktuelle Krebssterblichkeit in der Europäischen Union - Unterschiede, Trends und Determinanten -. [Online im Internet.] URL:http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Poster/eu_krebssterblichkeit_dgepi2012.pdf?__blob=publicationFile [Stand 22.08. 2013 15:30].

Lacroix L, Pourcher T, Magnon C, Bellon N, Talbot M, Intaraphairot T, Caillou B, Schlumberger M, Bidart JM (2004) Expression of the apical iodide transporter in human thyroid tissues: a comparison study with other iodide transporters. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:1423-8.

- Lecat-Guillet N, Ambroise Y (2009) Synthesis and evaluation of imidazo[2,1-b]thiazoles as iodide efflux inhibitors in thyrocytes. *ChemMedChem*. 4:1819-30.
- Lee WW, Lee B, Kim SJ, Jin J, Moon DH, Lee H (2003) Kinetics of iodide uptake and efflux in various human thyroid cancer cells by expressing sodium iodide symporter gene via a recombinant adenovirus. *Oncol Rep*. 10:845-9.
- Lepke S, Fasold H, Pring M, Passow H (1976) A study of the relationship between inhibition of anion exchange and binding to the red cell membrane of 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS) and its dihydro derivative (H2DIDS). *J. Membr. Biol*. 29:147-177.
- Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N (1997) Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:5568-73.
- Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N (1998) N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem*. 273:22657-63.
- Li W, Tan J, Wang P, Wu P (2011) Cotransfected sodium iodide symporter and human tyroperoxidase genes following human telomerase reverse transcriptase promoter for targeted radioiodine therapy of malignant glioma cells. *Cancer Biother Radiopharm*. 26:443-51.
- Lim SJ, Paeng JC, Kim SJ, Kim SY, Lee H, Moon DH (2007) Enhanced expression of adenovirus-mediated sodium iodide symporter gene in MCF-7 breast cancer cells with retinoic acid treatment. *J Nucl Med*. 48:398-404.
- Lindencrona U, Forssell-Aronsson E, Nilsson M (2007) Transport of free ²¹¹At and ¹²⁵I- in thyroid epithelial cells: effects of anion channel blocker 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid on apical efflux and cellular retention. *Nucl Med Biol*. 34:523-30.

Lindenthal S, Lecat-Guillet N, Ondo-Mendez A, Ambroise Y, Rousseau B, Pourcher T (2009) Characterization of small-molecule inhibitors of the sodium iodide symporter. *J Endocrinol.* 200:357-65.

Löfling J, Diswall M, Eriksson S, Borén T, Breimer ME, Holgersson J (2008) Studies of Lewis antigens and *H. pylori* adhesion in CHO cell lines engineered to express Lewis b determinants. *Glycobiology.* 18:494-501.

Magnon C, Opolon P, Ricard M, Connault E, Ardouin P, Galaup A, Métivier D, Bidart JM, Germain S, Perricaudet M, Schlumberger M (2007) Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1alpha-mediated tumor apoptotic switch. *J Clin Invest.* 117:1844-55.

Mandell RB, Mandell LZ, Link CJ Jr. (1999) Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res.* 59:661-8.

Manley SW, Li H, Mortimer RH (2005) The BeWo choriocarcinoma cell line as a model of iodide transport by placenta. *Placenta.* 26:380-6.

Marine D, Feiss H (1915) The absorption of potassium iodide by perfused thyroid glands and some of the factors modifying it. *J Pharmacol Exp Ther* 7:557-576.

Mitrofanova EE, Unfer R, Vanhanian N, Link CJ (2006) Rat sodium iodide Symporter allows using lower dose of ¹³¹I for cancer therapy. *Gene Therapy* 13:1052-1056.

Moon DH, Lee SJ, Park KY, Park KK, Ahn SH, Pai MS, Chang H, Lee HK, Ahn IM (2001) Correlation between ^{99m}Tc-pertechnetate uptakes and expressions of human sodium iodide symporter gene in breast tumor tissues. *Nucl Med Biol.* 28:829-34.

Mulsant P, Gatignol A, Dalens M, Tiraby G (1988) Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO cells. *Somat Cell Mol Genet.* 14:243-52.

- Nakamoto Y, Saga T, Misaki T, Kobayashi H, Sato N, Ishimori T, Kosugi S, Sakahara H, Konishi J (2000) Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na⁺/I⁻ symporters for radioiodide concentrator gene therapy. *J Nucl Med.* 41:1898-904.
- Neumaier M, Fenger U, Wagener C (1985) Monoclonal antibodies for carcinoembryonic antigen (CEA) as a model system: identification of two novel CEA-related antigens in meconium and colorectal carcinoma tissue by Western blots and differential immunoaffinity chromatography. *J Immunol.* 135:3604-9.
- Neumann S, Schuchardt K, Reske A, Reske A, Emmrich P, Paschke R (2004) Lack of correlation for sodium iodide symporter mRNA and protein expression and analysis of sodium iodide symporter promoter methylation in benign cold thyroid nodules. *Thyroid.* 14:99-111.
- Ohno M, Zannini M, Levy O, Carrasco N, di Lauro R (1999) The paired-domain transcription factor Pax8 binds to the upstream enhancer of the rat sodium/iodide symporter gene and participates in both thyroid-specific and cyclic-AMP-dependent transcription. *Mol Cell Biol.* 19:2051-60.
- Oneal MJ, Trujillo MA, Davydova J, McDonough S, Yamamoto M, Morris JC 3rd (2012) Characterization of infectivity-enhanced conditionally replicating adenovectors for prostate cancer radiovirotherapy. *Hum Gene Ther.* 23:951-9.
- Penheiter AR, Wegman TR, Classic KL, Dingli D, Bender CE, Russell SJ, Carlson SK (2010) Sodium Iodide symporter (NIS)- mediated radiovirotherapy for pancreatic cancer. *Nuclear medicine and molecular imaging.* *AJR* 195:341-349.
- Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T (2001) Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J Endocrinol.* 170:185-96.
- Peyrottes I, Navarro V, Ondo-Mendez A, Marcellin D, Bellanger L, Marsault R, Lindenthal S, Ettore F, Darcourt J, Pourcher T (2009) Immunoanalysis indicates that the sodium iodide

symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers. Eur J Endocrinol. 160:215-25.

Pinke LA, Dean DS, Bergert ER, Spitzweg C, Dutton CM, Morris JC (2001) Cloning of the mouse sodium iodide symporter. Thyroid. 11:935-9.

Pohlenz J, Duprez L, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S, Costagliola S (2000) Failure of membrane targeting causes the functional defect of two mutant sodium iodide symporters. J Clin Endocrinol Metab. 85:2366-9.

Provenzano MJ, Fitzgerald MP, Krager K, Domann FE (2007) Increased iodine uptake in thyroid carcinoma after treatment with sodium butyrate and decitabine (5-Aza-dC). Otolaryngol Head Neck Surg. 137:722-8.

Rajecki M, Sarparanta M, Hakkarainen T, Tenhunen M, Diaconu I, Kuhmonen V, Kairemo K, Kanerva A, Airaksinen AJ, Hemminki A (2012) SPECT/CT imaging of hNIS-expression after intravenous delivery of an oncolytic adenovirus and ¹³¹I. PLoS One. 7:e32871.

Rao VP, Miyagi N, Ricci D, Carlson SK, Morris JC 3rd, Federspiel MJ, Bailey KR, Russell SJ, McGregor CG (2007) Sodium iodide symporter (hNIS) permits molecular imaging of gene transduction in cardiac transplantation. Transplantation. 84:1662-6.

Reizer J, Reizer A, Saier MH Jr. (1994) A functional superfamily of sodium/solute symporters. Biochimica et Biophysica Acta 1197:133-66.

Ricci D, Mennander AA, Pham LD, Rao VP, Miyagi N, Byrne GW, Russell SJ, McGregor CG (2008) Non-invasive radioiodine imaging for accurate quantitation of NIS reporter gene expression in transplanted hearts. Eur J Cardiothorac Surg. 33:32-9.

Riesco-Eizaguirre G, Santisteban P (2006) A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. Eur J Endocrinol. 155:495-512.

Riesco-Eizaguirre G, De la Vieja A, Rodríguez I, Miranda S, Martín-Duque P, Vassaux G, Santisteban P (2011) Telomerase-driven expression of the sodium iodide symporter (NIS) for in vivo radioiodide treatment of cancer: a new broad-spectrum NIS-mediated antitumor approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 96:E1435-43.

Rillema JA, Hill MA (2003) Prolactin regulation of the pendrin-iodide transporter in the mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284:E25–28.

Rodriguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart JM, Pourcher T (2002) Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 87:3500–3503.

Royaux IE, Suzuki K, Mori A, Katoh R, Everett LA, Kohn LD, Green ED (2000) Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology.* 141:839-45.

Ryan J, Curran CE, Hennessy E, Newell J, Morris JC, Kerin MJ, Dwyer RM (2011) The sodium iodide symporter (NIS) and potential regulators in normal, benign and malignant human breast tissue. *PLoS One.* 6:e16023.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T (1997) Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:3331-6.

Sander B, Andersson J, Andersson U (1991) Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev.* 119:65-93.

Sawin CT, Becker DV (1997) Radioiodine and the treatment of hyperthyroidism: the early history. *7:163-76.*

Scheinberg DA (1995) Adult leukaemia in 1995: New directions. *Lancet.* 346:455-6.

Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J, Köhrle J (1997) Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 240:832-8.

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

Schmutzler C (2001) Regulation of the sodium/iodide Symporter by retinoids – a review. *Exp ClinEndocrinol Diabetes.* 109:41-44.

Schmutzler C, Schmitt TL, Glaser F, Loos U, Köhrle J (2002) The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol.* 189:145-55.

Scholz IV, Cengic N, Göke B, Morris JC, Spitzweg C (2004) Dexamethasone enhances the cytotoxic effect of radioiodine therapy in prostate cancer cells expressing the sodium iodide symporter. *J Clin Endocrinol Metab.* 89:1108-16.

Scholz IV, Cengic N, Baker CH, Harrington KJ, Maletz K, Bergert ER, Vile R, Göke B, Morris JC, Spitzweg C (2005). Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer. *Gene Therapy.* 12:272-280.

Shennan DB (2001) Iodide transport in lactating rat mammary tissue via a pathway independent from the Na⁺/I⁻ cotransporter: evidence for sulfate/iodide exchange. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:1359-63.

Short SC, Suovuori A, Cook G, Vivian G, Harmer C (2004) A phase II study using retinoids as redifferentiation agents to increase iodine uptake in metastatic thyroid cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 16:569-74.

Sigmaaldrich [Online im Internet.] URL:

www.sigmaaldrich.com/catalog/sigma/r2625?lang=de®ion=DE [Stand: 22.08.2013 16:29Uhr].

Silberstein EB (2012) Radioiodine: the classic theranostic agent. *Semin Nucl Med.* 42:164-70.

Simon, D., Koehrlé, J., Reiners, C., Boerner, A.R., Schmutzler, C., Mainz, K. (1998) Redifferentiation therapy with retinoids: therapeutic option for advanced follicular and papillary carcinoma. *World Journal of Surgery.* 22:569–574.

Simon D, Körber C, Krausch M, Segering J, Groth P, Görges R, Grünwald F, Müller-Gärtner HW, Schmutzler C, Köhrlé J, Röher HD, Reiners C (2002) Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 29:775-82.

Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T, Schirner M, Wolf GL, Alitalo K, Detmar M (2001) Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol.* 159:893-903.

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM (1996) Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 22:339-45.

Soeth E, Wirth T, List HJ, Kumbhani S, Petersen A, Neumaier M, Czubayko F, Juhl H (2001) Controlled ribozyme targeting demonstrates an antiapoptotic effect of carcinoembryonic antigen in HT29 colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 7:2022-30.

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 51:1409-16.

Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE (1998) Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 83:1746-51.

Spitzweg C, Zhang S, Bergert ER, Castro MR, McIver B, Heufelder AE, Tindall DJ, Young CY, Morris JC (1999a) Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 59:2136-41.

Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE (1999b) Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:4178-84.

Spitzweg C, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Morris JC (2000) Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Res.* 60:6526-30.

Spitzweg C, Dutton CM, Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Heufelder AE, Morris JC (2001a) Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. *Kidney Int.* 59:1013-23.

Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Morris JC (2001b) In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Ther.* 8:1524-31.

Spitzweg C, Morris JC (2002) The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin Endocrinol (Oxf).* 57:559-74.

Spitzweg C, Scholz IV, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Göke B, Morris JC (2003) Retinoic acid-induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer cells. *Endocrinology.* 144:3423-32.

Spitzweg C, Morris JC (2004) Gene therapy for thyroid cancer: current status and future prospects. *Thyroid.* 14:424-34.

Spitzweg C, Baker CH, Bergert ER, O'Connor MK, Morris JC (2007) Image-guided radioiodide therapy of medullary thyroid cancer after carcinoembryonic antigen promoter-targeted sodium iodide symporter gene expression. *Hum Gene Ther.* 18:916-24.

Spitzweg C (2009) Gene therapy in thyroid cancer. *Horm Metab Res.* 41:500-9.

Taki K, Kogai T, Kanamoto Y, Hershman JM, Brent GA (2002) A thyroid-specific far-upstream enhancer in the human sodium/iodide symporter gene requires Pax-8 binding and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element-like sequence binding proteins for full activity and is differentially regulated in normal and thyroid cancer cells. *Mol Endocrinol.* 16:2266-82.

Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, Pickren JW, Berjian R, Douglass HO, Chu TM (1986). Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer investigation.* 4:15-23.

Tanosaki S, Ikezoe T, Heaney A, Said JW, Dan K, Akashi M, Koeffler HP (2003) Effect of ligands of nuclear hormone receptors on sodium/iodide symporter expression and activity in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 79:335-45.

Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohán O, Zuckier LS, Zhao QH, Deng HF, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N (2000) The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med.* 6:871-8.

Trouttet-Masson S, Selmi-Ruby S, Bernier-Valentin F, Porra V, Berger-Dutrieux N, Decaussin M, Peix JL, Perrin A, Bournaud C, Orgiazzi J, Borson-Chazot F, Franc B, Rousset B (2004) Evidence for transcriptional and posttranscriptional alterations of the sodium/iodide symporter expression in hypofunctioning benign and malignant thyroid tumors. *Am J Pathol.* 165:25-34.

Unterholzner S, Willhauck MJ, Cengic N, Schütz M, Göke B, Morris JC, Spitzweg C (2006) Dexamethasone stimulation of retinoic Acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of ¹³¹I in breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 91:69-78.

Vadysirisack DD, Chen ES, Zhang Z, Tsai MD, Chang GD, Jhiang SM (2007) Identification of in vivo phosphorylation sites and their functional significance in the sodium iodide symporter. *J Biol Chem.* 282:36820-8.

Vainio H, Rautalahti M (1999) An international evaluation of the cancer preventive potential of vitamin A. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8:107-9.

Van Sande J, Massart C, Beauwens R, Schoutens A, Costagliola S, Dumont JE, Wolff J (2003) Anion selectivity by the sodium iodide symporter. *Endocrinology.* 144:247-52.

Vayre L, Sabourin JC, Caillou B, Ducreux M, Schlumberger M, Bidart JM (1999) Immunohistochemical analysis of Na⁺/I⁻ symporter distribution in human extra-thyroidal tissues. *Eur J Endocrinol.* 141:382-6.

Venkataraman GM, Yatin M, Marcinek R, Ain KB (1999) Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I⁻-symporter gene methylation status. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:2449-57.

Vivaldi A, Miasaki FY, Ciampi R, Agate L, Collecchi P, Capodanno A, Pinchera A, Elisei R (2009) Re-differentiation of thyroid carcinoma cell lines treated with 5-Aza-2'-deoxycytidine and retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol.* 307:142-8.

Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, Greco RS, Dohán O, Carrasco N (2003) Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab.* 88:1880-8.

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

Welsh PL, Mankoff DA (2000) Taking up iodide in breast tissue. *Nature.* 406:688-9.

Werner SC, Quimby EH, Schmidt C (1949) Radioactive Iodine, I-131, in the treatment of hyperthyroidism. *American journal of medicine.* 7:731-40.

Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Gildehaus FJ, Wolf I, Senekowitsch-Schmidtke R, Stark HJ, Göke B, Morris JC, Spitzweg C (2007) Application of ^{188}Re as an alternative radionuclide for treatment of prostate cancer after tumor-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab.* 92:4451-8.

Willhauck MJ, Samani BR, Wolf I, Senekowitsch-Schmidtke R, Stark HJ, Meyer GJ, Knapp WH, Göke B, Morris JC, Spitzweg C (2008a) The potential of ^{211}At for NIS-mediated radionuclide therapy in prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 35:1272-81.

Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Senekowitsch-Schmidtke R, Wunderlich N, Göke B, Morris JC, Spitzweg C (2008b) Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. *Breast Cancer Res Treat.* 109:263-72.

Willhauck MJ, O Kane DJ, Wunderlich N, Göke B, Spitzweg C (2011) Stimulation of retinoic acid-induced functional sodium iodide symporter (NIS) expression and cytotoxicity of ^{131}I by carbamazepine in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 125:377-86.

Wolff J (1964) Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. *Physiol Rev* 44:45–90.

Wolff J (1998) Perchlorate and the thyroid gland. *Pharmacol. Rev.* 50:89–105.

Wolf U, Barnes B, Bertz J, Haberland J, Laudi A, Stöcker M, Schönfeld I, Kraywinkel K, Kurth BM (2011): Das Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD) im Robert Koch-Institut (RKI) in Berlin. *Bundesgesundheitsbl. Gesundheitsforsch. Gesundheitsschutz* 54: 1229–1234.

Yeom CJ, Chung JK, Kang JH, Jeon YH, Kim KI, Jin YN, Lee YM, Jeong JM, Lee DS (2008) Visualization of hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activation in C6 glioma using luciferase and sodium iodide symporter genes. *J Nucl Med.* 49:1489-97.

Yoshida A, Taniguchi S, Hisatome I, Royaux IE, Green ED, Kohn LD, Suzuki K (2002) Pendrin is an iodide-specific apical porter responsible for iodide efflux from thyroid cells. J Clin Endocrinol Metab. 87:3356-61.

Zentrums für Krebsregisterdaten (ZfKD) des Robert Koch Instituts (RKI) [Online im Internet.] URL: http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Home/homepage_node.html [Stand 22.08.2013 15:34Uhr].

Zhang Z, Liu YY, Jhiang SM (2005) Cell surface targeting accounts for the difference in iodide uptake activity between Na⁺/I⁻ symporter. Journal of clinical endocrinology and metabolism. 90:6131-6140.

Danksagung

Als Allererstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. U.

Schumacher für die Überlassung des Themas, die Arbeits- und Rahmenbedingungen sowie seine stetige Präsenz, um mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen sowie für die Unterstützung in vielerlei Hinsicht bedanken.

Mein weiterer herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Mester (Klinik für Nuklearmedizin) sowie Herrn Prof. Dr. med. G. Adam (Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie) für Ihre Unterstützung sowie die Zurverfügungstellung von Arbeits- und Rahmenbedingungen. Ein weiterer besonderer Dank gilt Frau Ph. D. S. Costagliola (ULB, Brüssel) und Herrn Dr. P. Nollau (Inst. für Klin. Chemie, UKE), die uns dankenswerterweise den VJ1-Antikörper bzw. den T84.1-Antikörper zur Verfügung gestellt haben sowie den Mitarbeitern des Zentrums für präklinische Bildgebung (Berlin Charité (SAIC: Small Animal Imaging Center), Institut für Nuklearmedizin) für die Durchführung der Kleintier- SPECT / CT -Aufnahmen. Des Weiteren möchte ich mich insbesondere bei Frau Dr. sc. hum. E. J. Koziolk (Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie) für ihre Unterstützung und die Betreuung der Arbeit, bei Herrn Dr. rer. nat. D. Wicklein (Inst. für Anatomie und Experimentelle Morphologie) für die anfängliche Betreuung sowie die Hilfe bei den FACS-Analysen, bei Frau Dipl.-Biochem. D. Nelson (Isotopenlabor Facility (ILF), HEXT Core Facility Projekt, UKE) für die Zurverfügungstellung der BxPc3 -Zellen sowie für die zahlreiche Unterstützung u. a. im Isotopenlabor, bei Frau Dipl. Ing. R. Thiele und Frau Lachmann (FACS Core unit, UKE) für die Sortierung der Zellen und bei Herrn PD Dr. med. J. Spermhake (Institut für Rechtsmedizin des UKEs) für die Zurverfügungstellung der histologischen Schnittpräparate bedanken. Ferner gilt mein Dank vielen anderen im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie, insbesondere Herrn K. Siebert für die Einarbeitung in die Zellkultur, Frau R. Gehrcke u. a. für die Unterstützung beim Mykoplasmenausschluss, Frau T. Cölln und Frau Ch. Knies bei der Unterstützung in der Immunhistochemie, Herrn Dr. M. Heine (Inst. für Biochemie und Molekulare Zellbiologie) für seine Unterstützung mit Rat und Tat, Frau Dr. K. Stübke und Frau S. Feldhaus. Weiterhin möchte ich Frau Elisabeth Schöne für die unterhaltsame Zeit im Isotopenlabor, Frau L. H. Schulte, Frau V. Wischnewski, Herrn Dr. med. univ. A. Frings und Frau Dr. med. univ. V. Herbert für ihre Unterstützung danken.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinem erweiterten Familienkreis für ihre Unterstützung bedanken.

Curriculum vitae

- Name : Randi Marisa Pose
- Seit 02/2013 : Assistenzärztin in der Urologie des Klinikums Itzehoe, CA Dr. med. W. Höppner
- Herbst - 12/2012 : Staatsexamen Humanmedizin und Erteilung der Approbation
- 08/2011 - 07/2012 : Praktisches Jahr
Innere Medizin Albertinen-Krankenhaus, CA Prof. Dr. med. G. Lock
Plastische Chirurgie Agaplesion DKH Hamburg, CA Dr. med. K. Wittig
Chirurgie Regio Klinikum Elmshorn, CA PD Dr. med. E. Thies
- 09/2007 - 09/2011 : Zusatzqualifikation
„In den Grundlagen der Molekularen und Experimentellen Medizin“
mit durchweg guten bis sehr guten Teilleistungen; UKE
- 2009 - 2011 : Famulaturen
Sonographie, Innere UKE, OÄ Dr. med. A. Guthoff
Urologie, UKE, CÄ Prof. Dr. med. M. Fisch
Herzchirurgie, Albertinen-KH, CA Prof. Dr. med. F.-C. Rieß
Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Unfallchirurgie, Regio Klinikum Elmshorn, CA PD Dr. med. E. Thies
- 04/2010 - 12/2010 : Erfolgreiche Teilnahme am „Interdisziplinären Curriculum Schmerz am UKE“, Prof. Dr. med. A. May
- 01/2010 - 04/2010 : Klinisches Wahlfach: Experimentelle Medizin
- Seit 10/2009 : Cand. med. im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie bei Prof. Dr. med. U. Schumacher
- 08/2008 : Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2007 - 2008 : Pflegepraktika im KH Elmshorn
- 2007 : Vorklinisches Wahlfach: Orofaziales System
- Seit 10/2006 : Studium Humanmedizin UKE Hamburg
- 10/2005 - 09/2006 : Dipl.-studiengang Physik, Ludwig-Maximilians-Universität München
- 1996 - 2005 : Gymnasium Bismarckschule Elmshorn
- 10/2004 : Stipendiatin der Walter-Stich-Stiftung und damit zweiwöchiges Praktikum am Max-Planck-Institut für Quantenoptik in Garching

Wissenschaftliches Arbeiten (Auszüge dieser Arbeit wurden bereits vorab veröffentlicht)

Eva J. Koziolk, Randi Pose, Agnieszka Tarkowska, Ivayla Apostolova, Winfried Brenner, Udo Schumacher, Gerhard Adam, Michael G. Kaul. Evaluation of preclinical, multimodal therapy monitoring including multiparametric MR using a hNIS-expressing tumour xenograft mouse model. 2012 World Molecular Imaging Congress; 05.-08.09.2012; Dublin [Poster]

Koziolk EJ, Apostolova I, Pose RM, Tarkowska A, Brenner W, Schumacher U, Adam G, Kaul MG. Etablierung von hNIS-exprimierenden Xenograftmausmodellen zur Evaluierung eines multimodalen präklinischen Therapiemonitorings. 93. Deutscher Röntgenkongress; 16.-19.05.2012, CCH- Congress Center Hamburg [Poster]

Koziolk EJ, Pose RM, Apostolova I, Brenner W, Adam G, Kaul MG. hNIS-exprimierende Xenograftmausmodelle zur Evaluierung eines multimodalen präklinischen Therapiemonitorings mittels multiparametrischer MR. 93. Deutscher Röntgenkongress; 16.-19.05.2012, CCH- Congress Center Hamburg, in: RöFo- Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren; Ausgabe S01, 2012; 184 – VO104_3 [Abstract]

Koziolk EJ, Pose RM, Niedzielska D, Adam G, Schumacher U. All-trans-Retinsäure induzierte Natrium-Iodid-Symporter Expression kombiniert mit einem Anionenkanalblocker in der nicht-invasiven Bildgebung und Therapie von extrathyreoidalen Tumoren. 92. Deutscher Röntgenkongress; 01.-04.06.2011, CCH- Congress Center Hamburg [Poster-Präsentation]

Koziolk EJ, Pose RM, Niedzielska D, Adam G, Schumacher U. All-trans-Retinsäure induzierte Natrium-Iodid-Symporter Expression kombiniert mit einem Anionenkanalblocker in der nicht-invasiven Bildgebung und Therapie von extrathyreoidalen Tumoren. 92. Deutscher Röntgenkongress; 01.-04.06.2011, CCH- Congress Center Hamburg, in: RöFo- Fortschritte auf dem Gebiet der Röntgenstrahlen und der bildgebenden Verfahren; Ausgabe S01, 2011; 183 - WI_PO46. [Abstract]

Koziolk EJ, Pose RM, Niedzielska D, Klutmann S, Adam G, Schumacher U. All-trans-Retinolsäure induzierte Natrium-Iodid-Symporter Expression in Kombination mit einem Anionenkanalblocker – ein vielversprechender Ansatz in der nicht-invasiven Bildgebung und Therapie von extrathyreoidalen Tumoren. Dreiländertagung in Bregenz; 13.-16.04.2011 [Poster]

Koziolk EJ, Pose RM, Niedzielska D, Adam G, Klutmann S, Schumacher U. Trans-Retinolsäure induzierte Natrium-Iodid-Symporter Expression in Kombination mit einem Anionenkanalblocker erweist sich als vielversprechend in der nicht-invasiven Bildgebung und Therapie von extrathyreoidalen Tumoren. Nuklearmedizin2011-Dreiländertagung in Bregenz. In: Nuklearmedizin, Abstracts Nuklearmedizin2011- Dreiländertagung in Bregenz, Vol.50: Heft 2 2011 (49-92), S. A92, P28. [Abstract]

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: