

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. U. Schumacher

Untersuchung zur Effektivität der Radioiodtherapie *in vivo* nach Stimulation der Expression des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) in humanen extrathyreoidalen Tumorzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Agnieszka Losch

aus Gorzów Wielkopolski, Polen

Hamburg 2020

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 03.02.2021

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Susanne Klutmann

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. Udo Schumacher

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1. Arbeitshypothese und Fragestellung	10
2. Einleitung	12
2.1 Grundlagen der Radioiodtherapie	12
2.2 Natrium-Iodid-Symporter.....	12
2.3 Struktur und molekulare Charakterisierung von NIS	15
2.4 NIS und Mammakarzinom	16
2.5 Regulation von NIS.....	18
2.5.1 Stimulation von NIS	18
2.5.2 Inhibition von NIS.....	20
2.6 DIDS.....	22
3. Materialien und Methoden.....	24
3.1 Verwendete Materialien	24
3.1.1 Puffer.....	24
3.1.2 Medien	25
3.1.3 Antikörper	25
3.1.4 Chemikalien	26
3.1.5 Radionuklide.....	28
3.1.6 Materialien.....	28
3.2 Verwendete Geräte	29
3.3 Zellkultur	31
3.3.1 Verwendete Zelllinien	31
3.3.2 Zellkulturbedingungen.....	31
3.3.3 Zellzahlbestimmung	32
3.3.4 Kryokonservierung.....	32
3.3.5 Auftauen von Zellen	32
3.3.6 Mycoplasmentest.....	33
3.3.7 Vorbereitung der Zelllinien für die Tumor-Xenograftmodelle	33
3.4 Fluoreszenzmikroskopie	34
3.5 Iodidaufnahme <i>in vitro</i>	35
3.6 Iodid-Efflux-Assay	35

3.7	Etablierung des Maus-Xenograftmodells	36
3.7.1	Haltungsbedingungen	36
3.7.2	Tumorvermessung mittels MRT	36
3.7.3	Radioiodtherapie der Tiere	37
3.7.4	SEPCT-CT-Untersuchung.....	37
3.7.5	Anästhesie und Euthanasie.....	37
3.8.1	Konventionelle Immunhistochemie	39
3.8.2	CSA-Methode	40
3.9	Statistik.....	41
4.	Ergebnisse	42
4.1	Immunhistochemie.....	42
4.2	Immunfluoreszenz.....	44
4.3	Radioiod-Assay <i>in vitro</i>	48
4.3.1	Selektion NIS-exprimierender Klone.....	48
4.3.2	NIS-Stimulation durch atRA/DEXA.....	51
4.3.3	Iodid-Efflux	53
4.4	Ergebnisse <i>in vivo</i>	55
4.4.1	Immunhistochemische Untersuchung der Tumorproben.....	55
5.	Diskussion.....	59
5.1	Darstellung und Funktion von NIS.....	59
5.2.	Stimulation der NIS-Expression mit atRA	62
5.3	Stimulation der NIS-Expression mit DEXA.....	67
5.4	Iodid-Efflux	68
5.5	Immunhistologie.....	71
6.	Zusammenfassung	73
7.	Abstract	74
8.	Abbildungsverzeichnis.....	75
9.	Tabellenverzeichnis.....	76
10.	Literaturverzeichnis.....	76
11.	Danksagung	91

12.	Lebenslauf	92
13.	Eidesstattliche Versicherung.....	93

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
atRA	all-trans-Retinolsäure
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
²¹¹ At	²¹¹ Astat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
cpm	counts per minute
CSA	Catalysed Signal Amplification
CT	Computertomographie
DEXA	Dexamethason
DIDS	4,4'- Diisothiocyano- 2,2'-stilbenedisulfonic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et. al.	lat: et aliter (und weitere)
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal calf serum)
FRTL5	Ratten- Schilddrüsenzelllinie
g	Gramm
h	Stunde (Hour)

^{123}I	^{123}Iod
^{124}I	^{124}Iod
^{125}I	^{125}Iod
^{131}I	^{131}Iod
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
in vitro	im Reagenzglas (lat. vitrum, i, n: das Glas)
in vivo	im Lebenden (lat. vivum, i, n: das Lebendige)
i. p.	Intraperitoneal
i. v.	Intravenös
kb	Kilobasen
KClO ₄	Kaliumperchlorat
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
m	Milli
M	Molar
MCF7	Mammakarzinom-Zelllinie, entstammt aus einem malignen Pleuraerguss eines primär infiltrierenden duktales Karzinoms
min.	Minute
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Nano
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NIS	Natrium- Iodid- Symporter

μ	Mikro
^{32}P	$^{32}\text{Phosphor}$
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen- Emissions- Tomographie
pH	Potentia hydrogenii
^{188}Re	$^{188}\text{Rhenium}$
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic acid)
rpm	Umdrehung pro Minute (rounds per minute)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 Kulturmedium
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
s. c.	subkutan
SAIC	Small Animal Imaging Center
SPECT	Einzelphotonen-Emissionscomputertomographie (single photon emission computed tomography)
^{89}Sr	$^{89}\text{Strontium}$
T3	Triiodthyronin
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	$^{99\text{m}}\text{Technetium}$
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
Tg	Thyreoglobulin
TGF- β	transforming growth factor- β
TPO	Thyreoperoxidase
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

TSH	Thyroidea- stimulierendes Hormon
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) ist ein körpereigenes, nicht-toxisches und nicht-immunogenes Protein, dessen physiologische Funktion bereits seit 60 Jahren mit großem Erfolg bei der Bildgebung sowie der therapeutischen Anwendung der Radioiodtherapie zur Darstellung und Behandlung benignen und malignen Thyreopathien genutzt wird.

Die Doppelfunktion von NIS als diagnostisches und therapeutisches Gen eröffnet aussichtsreiche Perspektiven für eine klinische Anwendung des NIS-Gentherapie-Konzeptes. Die Grundlage für die Therapieanwendung, bei der eine gezielte Expression von funktionell aktivem NIS in extrathyreoidalem Gewebe erzielt wird, bildet dessen Klonierung und präzise molekulare Charakterisierung. Durch das Einbringen des NIS-Gens in extrathyreoidale Tumore erlangen diese die Fähigkeit zur Iodid-Aufnahme und -Akkumulation und sind somit einer Radioiodtherapie zugänglich. Gleichzeitig kann das Tumorgewebe gezielt in der Bildgebung dargestellt werden.

Die Fragestellung des Promotionsvorhabens und dessen wissenschaftlicher Ansatz bestehen in der simultanen Anwendung von NIS als Reporter- und therapeutisches Gen.

- Wird mit dem Einbringen von NIS in humane, extrathyreoidale Tumorzellen MCF-7 die Iodid-Aufnahme in diesen Tumorgeweben ermöglicht?
- Kann durch die Iodid-Aufnahme NIS-positives Gewebe mit Hilfe der bildgebenden Verfahren wie SPECT und PET *in vivo* dargestellt und gleichzeitig an diesen Geweben eine Radioiodtherapie durchgeführt werden?
- Kann die Iodid-Retentionszeit in den NIS-positiven Zellen durch eine Kombinationstherapie aus Radioiod und dem Anionkanalblocker DIDS *in vivo* im etablierten Maus-Xenograftmodell verlängert und damit der mögliche Therapieerfolg gesteigert werden?

Des Weiteren soll die Effektivität der Kombinationstherapie auch in Modellen getestet werden, bei denen die NIS-Expression nicht über die Gentherapie, sondern mittels einer all-trans-Retinolsäure (atRA)-Behandlung induziert wurde.

- Kann bei Mammakarzinomen, die einer atRA-stimulierbaren NIS-Expression unterliegen, durch orale Gabe von Vitamin A die Radioiodtherapie möglich gemacht und mittels DIDS ein therapeutischer Effekt erzielt werden? Entfällt damit die

Notwendigkeit des externen Einbringens des NIS-Gens in den stimulierbaren Gewebetypen?

Mit Hilfe der zwei oben beschriebenen Versuche wird analysiert, wie sich der therapeutische Effekt bei stabilen NIS-transfizierten und atRA-NIS-stimulierten Tumoren in Kombination mit DIDS verhält. Der Effekt der DIDS-Anwendung und das daraus resultierende Ansprechen des Gewebes auf die Radioiodtherapie wird mit Hilfe von MRT-Aufnahmen und dem bildgebenden Verfahren SPECT untersucht.

- Können durch die SPECT-Aufnahmen in Kombination mit den MRT-Aufnahmen frühzeitige Prognosen des Therapieerfolges gestellt werden?

Um die gewonnenen Erkenntnisse in einem weiteren Verfahren zu bestätigen, soll eine detaillierte histologische Untersuchung der aus den Versuchstieren entnommenen Proben nach der Radioiodtherapie erfolgen. Hier sollen auch die morphologischen Gewebeveränderungen im Tumor, die die Therapie mit sich bringt, untersucht werden.

2. Einleitung

2.1 Grundlagen der Radioiodtherapie

Während die Iodid-Anreicherung in der Schilddrüse ein bereits seit 1915 bekannter Vorgang ist, wurde die aus dieser Erkenntnis abgeleitete Radioiodtherapie hingegen erst in den vierziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts etabliert und weltweit als erfolgreiche Methode der Behandlung unterschiedlicher Thyreopathien anerkannt (1-9). Heutzutage werden alleine in Deutschland in über 130 Therapieeinrichtungen jährlich ca. 40.000 Patienten mit Radioiod behandelt (10, 11). Dieses nebenwirkungsarme Verfahren gehört zu den erfolgreichsten therapeutischen Anwendungen in der Nuklearmedizin (12, 13). Das Prinzip der Radioiodtherapie basiert auf der Aufnahme von radioaktivem Iod-Isotop ^{131}I und dessen Akkumulation im Schilddrüsengewebe (14). Dem Patienten wird dafür eine vorher individuell berechnete Menge an Radioiod verabreicht (15). Das Isotop sendet als Betastrahler Elektronen mit einer Reichweite von 0,5 bis 2 mm in den Körper und ermöglicht damit eine gezielte Wirkung im Gewebe (16, 17). Etwa 10% der gesamten radioaktiven Strahlung besteht in der Gammastrahlung (18). Diese Strahlungsmenge reicht aus, um über die bildgebenden Verfahren wie die Szintigraphie die Verteilung des Tracers im gesamten Körper darzustellen, so dass hier das Radioiod sowohl als Therapie- als auch als bildgebendes Nuklid eingesetzt werden kann (19, 20).

2.2 Natrium-Iodid-Symporter

Der Erfolg der Radioiodtherapie basiert auf der Funktion des NIS, eines transmembranalen Glykoproteins, das normalerweise in dem Schilddrüsenepithel exprimiert wird und eine entscheidende Rolle bei der Synthese der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin und Thyroxin spielt (21). Bei intakter Funktion des NIS-Proteins wird Iodid aus dem Blutkreislauf in die Thyreozyten aufgenommen, gegenüber der Konzentration im Blutplasma um den Faktor 20-40 konzentriert und für die Schilddrüsenhormonsynthese bereitgestellt (22, 23). Die treibende Kraft für die Aufnahme von Natrium und Iodid in die Zellen ist die hohe extrazelluläre Na^+ -Konzentration, die von dem Enzym Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird (22, 24, 25). Mit dem steigenden extrazellulären Konzentrationsgradienten werden die Na^+ -Moleküle über Diffusion wieder zurück in die Zellen gedrängt. Die Moleküle bewegen sich entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zellen und transportieren dabei Iodidmoleküle über den sekundär-aktiven Transport mit sich (25). In der Schilddrüse wird dann die Synthese der Hormone über die Iodid-Akkumulation in den Thyreozyten initiiert (9).

Das Iodid wird hierfür in den Thyreozyten oxidiert und an die Tyrosinreste des von den Follikel epithelzellen synthetisierten Thyreoglobulins (Tg) gebunden (22). Diese katalytische Reaktion wird mit Hilfe des Enzyms Thyreoperoxidase (TPO) durchgeführt (26). Das Enzym ist schilddrüsenspezifisch und steuert die Iodid-Organifikation im Schilddrüsengewebe (27).

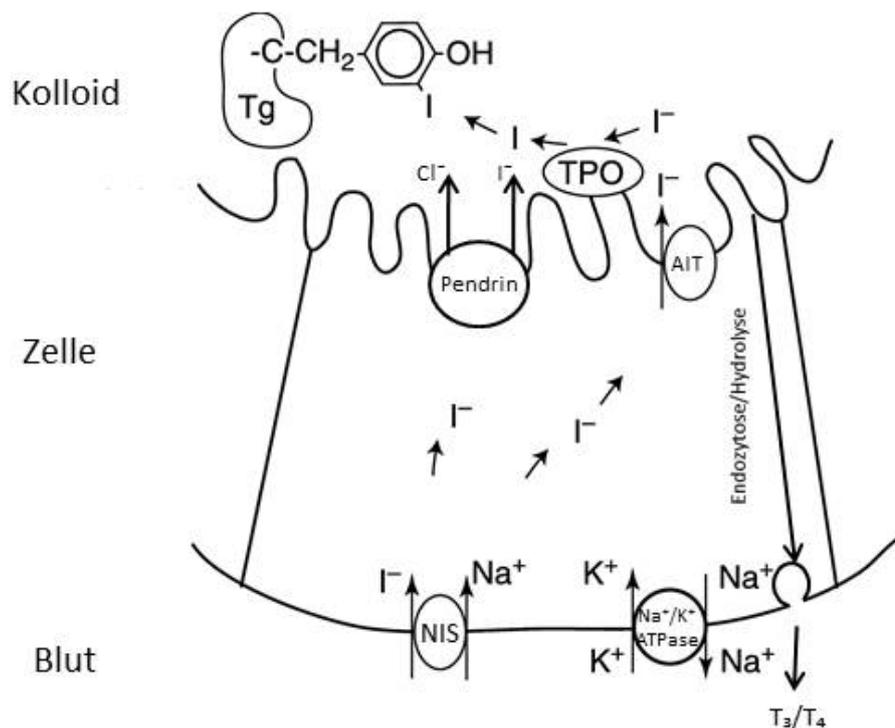


Abbildung 1: Sekundär-aktive Aufnahme von Iodid in die Schilddrüsenzellen (modifiziert nach (24)).

Der hohe extrazelluläre Na^+ -Gradient wird durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten, das Iodid wird im Cotransport mit Na^+ -Ionen über den NIS aktiv aus dem Blutkreislauf aufgenommen. Intrazelluläre Oxidation erfolgt über TPO an der apikalen Zellmembran. Der Transport ins Kolloid erfolgt über Pendrin (Na^+ -unabhängiger Cl^-/I^- Cotransporter) und den apikalen Iodidtransporter (AIT). Die Bindung an Tg mit anschließender Hormonsynthese findet im Kolloid statt. Das so gespeicherte Iodid wird bei Bedarf als Bestandteil der Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 über Endozytose und Hydrolyse wieder an den Blutkreislauf abgegeben.

Der Mechanismus der Iodid-Aufnahme und –Speicherung führt im Rahmen der Radioiodtherapie zu einer Iodid-Akkumulation in den Schilddrüsenzellen und somit zu einer verlängerten Retentionszeit des Radiopharmakons (22, 24, 28-30). In dieser Zeit zerfällt das Isotop und zerstrahlt das Schilddrüsengewebe (24). Das nicht von der Schilddrüse aufgenommene Iodid wird über die Nieren ausgeschieden und kann in keinen weiteren Organen gespeichert werden.

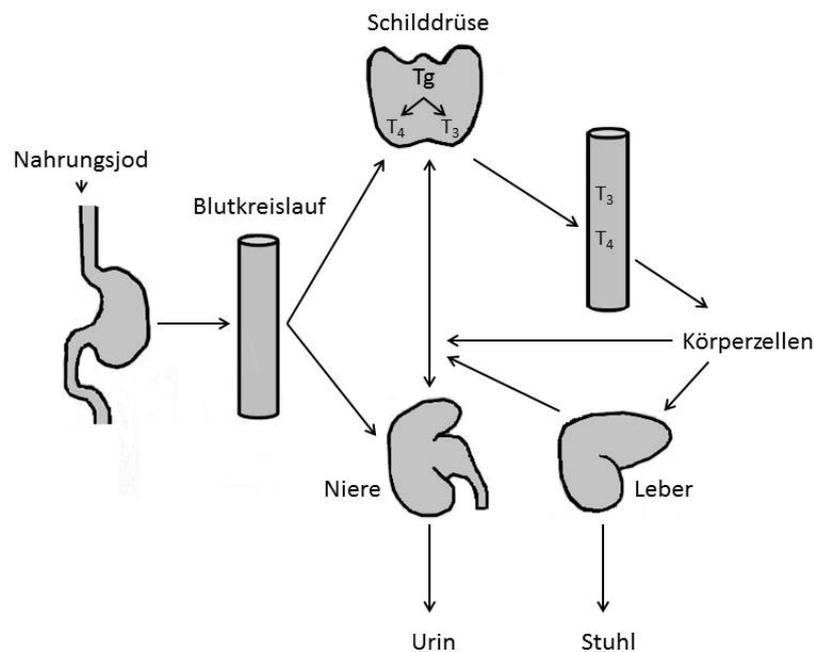


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Iodid-Stoffwechsels im menschlichen Körper (modifiziert nach (14)).

Das Iod wird über die Nahrung in den Blutkreislauf und nachfolgend in die Thyreozyten aufgenommen. Das nicht von der Schilddrüse aufgenommene Iod wird über die Niere ausgeschieden. Nach der Hormonsynthese werden Iodbestandteile wieder von den peripheren Körperzellen über den Blutkreislauf in die Leber und Niere transportiert und ausgeschieden. Die gleichen Stoffwechselfvorgänge gelten für das im Rahmen einer Radioiodtherapie intravenös verabreichte Radioiod.

2.3 Struktur und molekulare Charakterisierung von NIS

Die groben Umrisse des Prinzips thyreoidaler Iodid-Aufnahme- und Anreicherung wurden bereits 1915 beschrieben (31). Jedoch gelang es erst in den 90er Jahren die cDNA des NIS der Ratte zu klonieren (21). Der Klonierung des Maus- und des humanen NIS-Gens folgte die molekulare Charakterisierung (8, 9). Hierbei stellte sich heraus, dass obwohl der NIS der Ratte und der Maus aus lediglich 618 Aminosäuren besteht, eine große Homologie zum humanen Protein nachgewiesen werden konnte (8, 21, 32). Der Genlocus des Symporters befindet sich auf dem Chromosom 19p13. Das Gen besteht aus 15 Exons, unterbrochen von 14 Introns und kodiert eine 3.9 kb mRNA (33). Das Glykoprotein besteht aus insgesamt 643 Aminosäuren, die in 13 transmembranäre und 14 extramembranäre Domänen eingeteilt sind. Der N-Terminus liegt extra- und der C-Terminus intrazellulär, wobei der carboxyterminale Bereich eine Reihe von potentiellen regulatorischen Sequenzen wie Phosphorylierungsstellen aufweist (21, 34, 35). Das NIS-Protein besitzt insgesamt drei N-glykosidische Bindungsstellen. Eine davon befindet sich im siebten, während die zwei anderen innerhalb des dreizehnten Loops lokalisiert sind (36). Die Molekülmasse beträgt je nach Glykosylierungsgrad etwa 70-90 kDa (37).

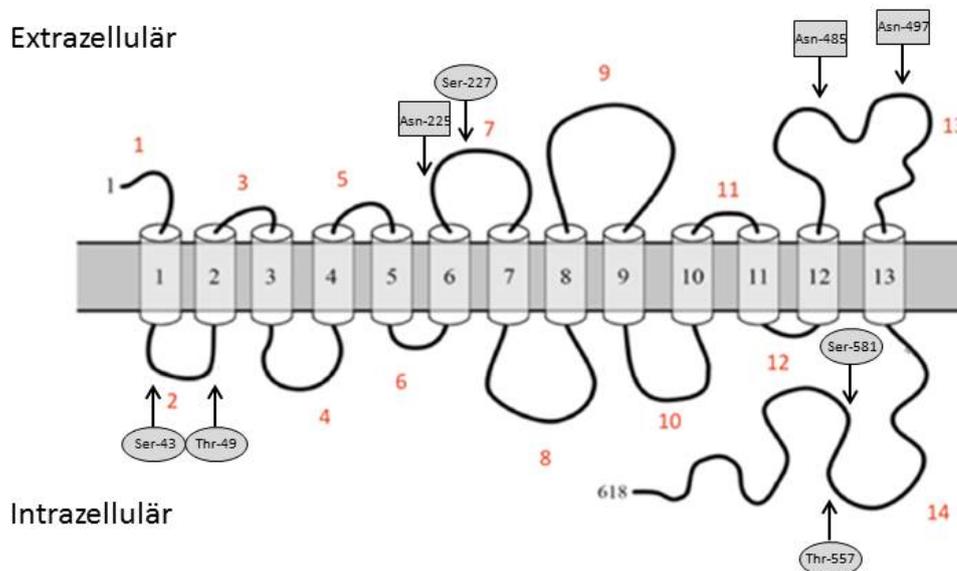


Abbildung 3: Die Sekundärstruktur des NIS (modifiziert nach (36)).

Die 13 Transmembrandomänen sind in schwarzen, die extramembranäre Domänen mit roten Zahlen dargestellt. Die Glykosylierungsstellen sind als Rechtecke, Phosphorylierungsstellen als Ellipsen eingezeichnet.

2.4 NIS und Mammakarzinom

Neben der Schilddrüse wird der NIS auch in einigen extrathyreoidalen Geweben exprimiert. Diese Erkenntnis wurde durch die Entwicklung spezifischer NIS-Antikörper sowie durch die über die NIS-Klonierung gewonnenen Protein-Strukturmerkmale bestätigt. In manchen Gewebstypen, wie in der Brustdrüse, wird der Symporter erst unter bestimmten Bedingungen induziert. So wird das Neugeborene mit Iod versorgt, das über den NIS-Transporter in die Milch gelangt (38, 39). Der Transporter wird durch das Hormon Prolaktin in dem Milchdrüsenepithel überexprimiert (36, 40, 41). Dadurch wird dem Neugeborenen das für die Entwicklung vieler Organe notwendige Iodid bereitgestellt (22). Die extrathyreoidale NIS-Expression konnte nicht nur in der laktierenden Brustdrüse, sondern auch beim überwiegenden Teil der Mammakarzinome nachgewiesen werden (39, 42, 43). Präklinisch konnte gezeigt werden, dass die Zellen der Mammakarzinome transgener Mäuse in der Lage waren, Iodid aus dem Blutstrom aufzunehmen (39). Immunhistochemisch wurde dann der Symporter in über 80% der untersuchten humanen Mammakarzinomproben nachgewiesen, wobei der Symporter in diesen Geweben seine basolaterale Lokalisation verloren zu haben schien (40, 43). Diese Beobachtung wurde bei 45 von 50 Mammakarzinom-Gewebsproben bestätigt (44).

Laut der 2012 veröffentlichten Statistiken des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch Instituts ist das Mammakarzinom mit rund 70.000 Neuerkrankungen jährlich die mit Abstand häufigste Karzinomentität bei Frauen in Deutschland. Jede achte bis zehnte Frau leidet im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, die Hälfte der betroffenen Frauen erkrankt vor dem 65., jede zehnte sogar noch vor dem 45. Lebensalter. Die Prognose bei einer Mammakarzinom-Diagnose bleibt trotz vielfältiger Therapiemöglichkeiten wie der Mastektomie, Lumpektomie, Bestrahlung, antihormoneller Therapie und Chemotherapie relativ schlecht. Im Jahr 2010 betrug die 5-Jahres-Überlebensrate 79,6%, 2012 waren es 84%. Obwohl die Überlebensrate steigt, macht die immense Anzahl an Neuerkrankungen sowie die weiterhin schlechte Prognose bei einer metastasierenden Erkrankung die Notwendigkeit der Entwicklung neuer Therapieansätze deutlich (45-47).

Die Signifikanz des NIS als Reporter- und therapeutisches Gen im Rahmen der Radioiodtherapie unterschiedlicher Thyreopathien wurde in zahlreichen Studien belegt. Der Symporter ermöglicht dabei sowohl die Darstellung der Traceraufnahme und -akkumulation durch bildgebende Verfahren, als auch simultan die Zerstörung der Tumorzellen durch das Radiopharmakon. Der Nachweis NIS-exprimierender Zellen im Mammakarzinomgewebe regte die Diskussion über die Möglichkeit einer Radioiodtherapie bei dieser Tumorentität an. Könnte

man folglich die Funktion des NIS in den Zellen des Mammakarzinoms nutzen oder die Expression des Symporters sogar stimulieren, wäre eine Radioiodtherapie dieser Karzinomentität denkbar. Allerdings stellt nicht nur die Expression des funktionellen NIS eine Bedingung für den Erfolg einer Radioiodtherapie dar. Ein therapeutischer Effekt des Radiopharmakons kann weiterhin nur erzielt werden, wenn das Radioiod eine gewisse Zeit intrazellulär verweilt, um dort die gewünschte DNA-Schädigung hervorzurufen. Bis heute konnte die für die Iodid-Akkumulation verantwortliche TPO-Expression nicht in extrathyreoidalen Tumorgeweben induziert werden (8, 33). Eine solche Expression könnte über die konventionelle Radioiodtherapie eine vielversprechende Therapiealternative zahlreicher maligner extrathyreoidaler Karzinome ermöglichen.

2.5 Regulation von NIS

2.5.1 Stimulation von NIS

Die Stimulation der Iodid-Aufnahme über den NIS in der Schilddrüse wird durch den hypothalamisch-hypophysären Regelkreis gesteuert (48, 49). In der Adenohypophyse wird das thyroidea-stimulierende Hormon (TSH), welches am Rezeptor der basolateralen Membran der Thyreozyten bindet, synthetisiert. Dadurch wird der Adenylatcyklase-cAMP-Weg aktiviert, was schließlich zu vermehrter Expression des Symporters und damit zu erhöhter Iodaufnahme führt (22, 50-53). *In vitro*-Untersuchungen an Schilddrüsenzellen FRTL5 haben gezeigt, dass nach der Behandlung dieser Zellen mit TSH, cAMP oder Forskolin als direkten Stimulator des Enzyms Adenylatcyclase, die NIS-Expression und damit der Iodid-Transport stimuliert werden konnte (52).

Zeitgleich wurden Untersuchungen an Patienten mit Morbus Basedow durchgeführt. Bei dieser Autoimmunerkrankung binden die vom Körper gegen das Schilddrüsengewebe gebildeten Autoantikörper an den TSH-Rezeptor (54). Damit wird die Schilddrüse dauerhaft zur Hormonproduktion stimuliert. Im Vergleich zum normalen Schilddrüsengewebe wurde bei diesen Patienten aufgrund der Dauerstimulation des TSH-Rezeptors eine 3- bis 4-fach erhöhte NIS-Expression nachgewiesen, was die Ergebnisse der *in vitro*-Untersuchungen *in vivo* bestätigt (55). Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass das TSH für die posttranskriptionelle Modifikation des NIS-Proteins und damit seine Membranständigkeit und Funktion verantwortlich ist. Bei TSH-Entzug verlieren die Schilddrüsenzellen ihre Fähigkeit zur Iodaufnahme, da das Protein nicht in die Zellmembran eingebaut wird. Bei Abwesenheit des Hormons verkürzt sich außerdem die Halbwertszeit des NIS von ca. 5 auf 3 Tage (28, 56). Neben TSH ist das extrazelluläre Adenosin ebenfalls in der Lage, die Expression des Symporters in Thyreozyten zu steigern (57).

Die bereits beschriebene Fähigkeit der Iodid-Aufnahme der laktierenden Brustdrüse ist ein Beispiel extrathyreoidaler NIS-Expression. Diese wird in diesem Fall durch Prolaktin stimuliert, was einen wesentlichen Regulationsmechanismus für die Iodid-Anreicherung der Muttermilch während des Stillprozesses nach der Geburt darstellt (36, 40, 41, 58). *In vivo*-Untersuchungen an Ratten zeigen, dass die NIS-Expression in der laktierenden Mamma ebenfalls durch das Hormon Oxytocin, das während des Saugens freigesetzt wird, stimuliert werden kann (59).

Die Retinolsäure, auch Tretinoin genannt, ist die Säure des Vitamins A und spielt im menschlichen Körper eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Zelldifferenzierung und der Hemmung der Zellproliferation. In vielen Tumorzelllinien konnte ihre Wirkung als Inhibitor des Zellwachstums nachgewiesen werden, weshalb sie bei vielen Karzinomentitäten (u.a. beim Mammakarzinom) therapeutisch eingesetzt wird (61-68).

Neben der Hemmung des Tumorwachstums konnte während der therapeutischen Anwendung des Tretinoins bei den östrogenrezeptor-sensitiven Mammakarzinomzellen MCF-7 gleichzeitig eine Steigerung der NIS-Expression in diesen Zellen nachgewiesen werden (69). Die Ergebnisse der atRA-Untersuchungen konnten *in vivo* in einem Maus-Xenograft-Modell durch eine gesteigerte Iodid-Akkumulation in den Tumoren bestätigt werden (60). atRA führt über die Stimulierung der Expression von PI3-Kinasen in den MCF-7-Zellen zur NIS-Synthese und ermöglicht damit eine vermehrte Iodid-Aufnahme in die Zellen (61). Bei dem therapeutischen Einsatz der Retinolsäure beim östrogen-sensitiven Mammakarzinom kann damit sowohl das Wachstum des Tumors inhibiert, als auch die Zellen zur NIS-Expression angeregt werden, was eine verstärkte Iodid-Aufnahme in die Zellen und damit eine effizientere Radioiodtherapie bedeuten könnte. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass durch die gleichzeitige Gabe von Dexamethason (9-Fluor-16-alpha-methylprednisolon), einem Glucocorticoid, das u.a. bei der Chemotherapie von Mammakarzinomen angewendet wird, die Wirkung des Tretinoins verstärkt werden konnte (62, 63). Dexamethason ist ein lange wirkendes, künstliches Glucocorticoid mit einer über das 20-Fache stärkeren Wirkung als die körpereigenen, das Immunsystem schwächenden Glucocorticoide. Es hemmt Entzündungsvorgänge und lindert Allergiesymptome bei überschießenden Reaktionen des Körpers auf Allergene (64).

Bereits 1975 konnten die Glucocorticoid-Rezeptoren in den MCF-7-Zellen nachgewiesen werden (65). Ein Jahr später wurde die wachstumshemmende Wirkung des künstlichen Glucocorticoids Dexamethason in den Mammakarzinomzellen beobachtet (75). Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass das Dexamethason und die all-trans Retinolsäure in den Myelom- und MCF-7-Zelllinien ihre Wirkung gegenseitig vervielfältigen (66). In einer weiteren *in vitro* Untersuchung mit der MCF-7-Zelllinie konnte die Steigerung der NIS-Expression bei gleichzeitiger Gabe von Dexamethason und Retinolsäure, sowie die daraus resultierende erhöhte therapeutische Effizienz einer Radioiodtherapie mit I^{131} von 17% auf 80% nachgewiesen werden (67). Die Iodid-Akkumulation stieg um das drei- bis vier-Fache in den Zellen an, wobei gleichzeitig das Herausströmen des radioaktiven Isotops reduziert wurde (67).

2.5.2 Inhibition von NIS

Bereits im Jahr 1923 hat Plummer die hohe Konzentration an Iod im Plasma als Ursache für die gehemmte Schilddrüsenfunktion erkannt. Erst 25 Jahre später gelang Wolff und Chaikoff der experimentelle Beweis der Blockade der Iod-Organifizierung im *in vivo*-Versuch an Ratten (23). Sie bewiesen, dass ein erhöhter Iodid-Plasmaspiegel beim Erreichen eines gewissen Grenzwertes eine verminderte Iodid-Aufnahme in die Schilddrüsenfollikel und die damit verbundene Suppression der Hormonsynthese induziert. Der nach den beiden Wissenschaftlern benannte Wolff-Chaikoff-Effekt ist nicht vom TSH-Spiegel abhängig, er unterliegt vielmehr einer Iodid-abhängigen Autoregulation und ist damit ein Kompensationsmechanismus der gesunden Schilddrüse zum Schutz vor einer hyperthyreotischen Stoffwechsellage. Die beiden Wissenschaftler konnten des Weiteren zeigen, dass dieser Effekt transient ist, die Schilddrüse nach einer Latenz von ca. 25 bis 50 Stunden eine Adaptation an die vorherrschenden Verhältnisse aufweist und damit eine normale Schilddrüsenhormonsynthese fortgesetzt werden kann (68). Um die Funktionsweise dieser Schilddrüsenautoregulation zu vervollständigen, wurde zeitnah von Raben et al. nicht die Blut-, sondern die intrathyreoidale Iodid-Konzentration als der entscheidende Faktor für die Inhibition der Iodid-Organifizierung erkannt. Die bereits durchgeführten *in vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen an FRTL5 Schilddrüsenzelllinien der Ratte (69) und an hypothyreoten Hunden (70) bestätigen die These von Wolff und Chaikoff und zeigen, dass die externe Applikation von Iod zu einer deutlichen Verminderung der NIS-Expression und damit zu einer erniedrigten Iodid-Akkumulation in der Schilddrüse führt. Zudem wurde die inhibierende Wirkung verschiedener Zytokine (Interleukine IL-1 α , IL-1 β und IL-6, Tumornekrosefaktor- α , Interferon- γ , transformierender Wachstumsfaktor- β 1) auf die Funktion des Symporters untersucht (71). Neben den Zytokinen wurde eine Reihe weiterer NIS-Inhibitoren, wie das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin, Thyreoglobulin und Estradiol untersucht (72).

Stimulatoren der NIS-Expression	Inhibitoren der NIS- Expression
cAMP	Iod
Adenosin	Il-1 α , -1 β , -6
Forskolin	TNF- α
TSH	IFN- γ
Prolaktin	TGF- β 1
Oxytocin	T3
Retinolsäure	Tg
Dexamethason	Estradiol

Tabelle 1: Regulation von NIS.

In der linken Spalte sind die Stimulatoren, in der rechten die Inhibitoren der NIS-Expression dargestellt (68-72).

2.6 DIDS

Der Erfolg der Radioiodtherapie bei einem Schilddrüsenkarzinom hängt stark von der NIS-Expression in den Tumorzellen ab. Bei einem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom, wie dem anaplastischen Typ, der ca. 5–10 % aller Schilddrüsenkarzinomen darstellt, ist die Anwendung einer Radioiodtherapie aufgrund des fehlendes Iodid-Stoffwechsels nicht anwendbar.

Während bei einem differenzierten Schilddrüsenkarzinom des papillären oder follikulären Typs die Therapiechancen mit Radioiod vielversprechend sind, bekommen bei fortgeschrittenen Tumoren rund 30% der Patienten metastasierende Rezidive (73). Diese Tumorzidive können oft nur schlecht behandelt werden, da sie durch die Radioiodtherapie der ursprünglichen Tumore über einen Dedifferenzierungsprozess die Fähigkeit zur NIS-Synthese und damit zur Iodaufnahme verlieren (74). Das Protein konnte zwar über die molekulare Charakterisierung und Klonierung des NIS-Gens (9, 21) erfolgreich in die Rezidivzellen transfiziert und eine Radioiodtherapie durchgeführt werden (75), der Therapieeffekt war jedoch durch den Iodid-Efflux, der gemeinsam mit der NIS-Expression seine physiologische Funktion verloren zu haben scheint, unzureichend, um eine Heilung zu verursachen (76).

Um eine erfolgreiche Radioiodtherapie auch dieser Karzinomzellen erzielen zu können, musste neben der Durchführung des NIS-Gentransfers auch der Iodid-Transporter, der für den Efflux des Iods zuständig ist, blockiert werden.

Bereits im Jahr 1998 konnte Amphoux-Fazekas et al. die Wirkung des Anionkanalblockers 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) auf die Schilddrüsenzellen des Schweins und die damit verbundene Verlängerung der Iodid-Retentionszeit nachweisen (95). Im Jahr 2006 wurde bestätigt, dass die Wirkung von DIDS in den anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen, die bis dahin nicht mit einer Radioiodtherapie behandelt werden konnten, beobachtet werden konnte (94). Das erfolgreiche Inhibieren des Iodid-Effluxes während einer Radioiodtherapie an diesen Geweben könnte demnach eine vielversprechende Therapiealternative darstellen, um die Prognose dieser Erkrankungen deutlich zu verbessern.

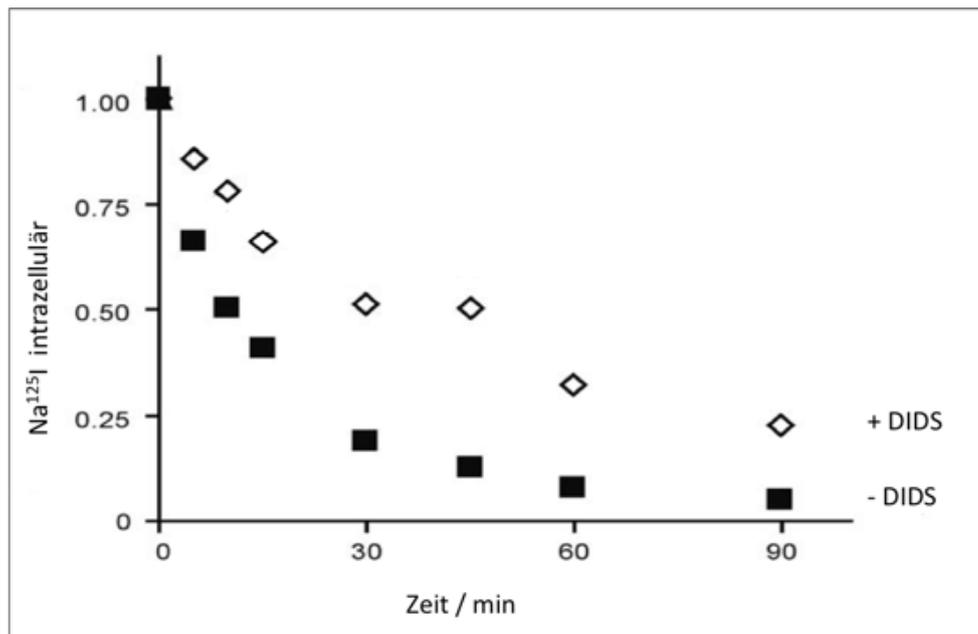


Abbildung 4: Inhibition des Iodid-Effluxes an Ratten-Schilddrüsenzellen FRTL5 durch den Anionkanalblocker DIDS (mod. nach (77)).

Inkubation der Zellen mit Na^{125}I für 90 min (0.2 mCi pro well). Messungen der Zerfallsrate erfolgten nach 30, 60 und 90 Minuten. Die Ergebnisse wurden normiert. Schwarze Rechtecke stellen die Zellgruppe ohne DIDS-Zusatz dar. Weiße Rhomben stellen die Zerfallsrate der Zellen mit DIDS-Zusatz (1mM) dar. Während nach 90 min in den nativen Zellen ca. 5 % der ursprünglichen Zerfallsrate des Iods nachgewiesen wurde, befand sich in den Zellen mit DIDS-Zusatz (1mM) noch ca. 25% des Iods.

3. Materialien und Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Puffer

enzymfreier Zell-

Dissoziations- Puffer: Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO

DAKO Diluent: Antibody Diluent with Background Reducing Components S3022, DAKO, Glostrup, DK

HBSS- Radioaktivpuffer: 0,5M HEPES in Aqua dest.

0,5% BSA

pH 7,3

PBS: Dulbeccos Phosphat Buffer Saline, Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO

Radioaktiv-Effluxassay-

Lysepuffer: 11 H₂O+ 0,1M NaOH+0,1%SDS+2%Na₂CO₃

TBS: Tris- buffered saline:

50 mM Tris Base, Sigma, St. Louis, USA

150 mM NaCl, ; J. T. Baker, Deventer, NL

2 N HCl, Merck, Darmstadt, DE

pH 7.6

TBST: Tris- buffered saline with 0,1% Tween- 20, Sigma, St. Louis, USA

Trypsin- EDTA: 0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA; Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO

3.1.2 Medien

FCS:	Fetales Kälberserum; Gibco® Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA
Gefriermedium:	für 100ml: 50 ml RPMI 1640 Medium 42,5 ml FCS 7,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid); Life Technologies Ltd., Pasley, SCO
PEN/STREP:	Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/mL; Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO
RPMI 1640:	Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SCO

3.1.3 Antikörper

A11013:	Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Human IgG, Invitrogen Corporation/ Carlsbad, CA, USA
E 0433:	Polyclonal Goat Anti- Mouse Immunoglobulins/Biotinylated; E 0433; Dako, Glostrup, DK
E 0464:	Polyclonal Rabbit Anti- Mouse Immunoglobulins/Biotinylated; E 0464; Dako, Glostrup, DK
hNIS:	Human Sodium Iodide Symporter (hNIS) Ab-1 Clone FP5A; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
X 0931:	Negative Control Mouse IgG1; X 0931; Dako, Glostrup, DK

3.1.4 Chemikalien

ABC- AP:	Vectastain Universal ABC- AP Kit AK- 5000, Vector Laboratories LTD., Peterborough, UK
Aceton:	J. T. Baker, Deventer, NL
Augensalbe:	Bayer AG, Leverkusen, DE
Blockierlösung:	Rabbit Serum X0902, Dako, Glostrup, DK
BSA:	Bovine Serum Albumin, PAA- the Cell Culture Company, Pasching, AT
Casy- Puffer:	CASY® ton Schärfe System, Reutlingen, DE
Dako Target Retrieval Solution:	1699 Dako, Glostrup, DK
Dexamethason:	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DIDS:	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DMSO:	Dimethylsulfoxid, Life Technologies Ltd., Pasley, SCO
Eukitt- Eindeckmedium:	Eukitt O. Kindler GmbH, Freiburg, DE
Ethanol:	Walter CMP GmbH &Co., Kiel, DE
Hämatoxylin:	Mayer's Häkalaun (1 zu 2 in Aqua dest.), Merck KGaA, Darmstadt, DE
HCL:	2M HCl; Merck, Darmstadt, DE
Isofluran:	VisualSonics Inc., Toronto, CA
Ketamin:	Gräub AG, Bern, CH
L- Thyroxin:	L-Thyroxin Henning inject, Sanofi-Aventis, Berlin, DE

Matrigel: BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix, BD Biosciences, San Jose, USA

Methanol: J. T. Baker, Deventer, NL

Mounting Medium

with DAPI: Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

Mycoplasmen- Detection- Kit: Minerva BioLabs, Berlin, DE

NaCl: J. T. Baker, Deventer, NL

0,9 % NaCl- Lösung: Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Narkoselösung: (1 µl/g KG)

Ketamin (100mg/ml), Gräub AG, Bern, CH

Rompun (20mg/ml Xylazine), Bayer AG, Leverkusen, DE

0,9% NaCl- Lsg., Braun Melsungen AG, Melsungen, DE

Östrogellets: Innovative Research of America, Florida, USA

Permanent Red: Dako Liquid Permanent Red, K0640, Dako, Glostrup, DK

Retinolsäure: Retinoic Acid, ≥98% (HPLC), powder, Sigma- Aldrich, St. Louis, USA

Rompun: Bayer AG, Leverkusen, DE

Tris: Sigma, St. Louis, USA

Tween- 20: Sigma, St. Louis, USA

Xylol: Merk, Darmstadt, DE

Zeocin: Zeocin™ Selection Reagent, Gibco® Life Technologies Ltd., Pasley, SC

3.1.5 Radionuklide

^{125}I :	Hartmann Analytic, Braunschweig, DE
^{131}I :	Hartmann Analytic, Braunschweig, DE
$^{99\text{m}}\text{Tc}$:	Isotopenlabor der Nuklearmedizin UKE, Hamburg, DE

3.1.6 Materialien

Chamber-Slides:	LabTek, Chamber-Slide, 2/9/12/24-Well-Paramox-Slide, Langensfeld, DE
Deckgläser:	Marienfeld GmbH Lauda- Königshofen, DE
Einmalspritzen:	Omnifix Insulinspritzen 1ml, Braun AG, Melsungen, DE
Einstreu:	Lignocel S8/15, Ssniff, Soest
Gefrier Röhrchen:	Nunc Cryo Tube Vials, Nalge Nunc, Roskilde, DK
Gewebekulturplatten:	Tissue Culture Plates, 12/24/96- Well, Sarstedt Inc., Newton, USA
Injektionskanülen:	Braun AG, Melsungen, DE
Jodarmes Tierfutter:	Harlan, Indianapolis, USA
Klingen:	C35 Type Microtome Blades, Feather Safty Razorm Osaka, JP
Käfige mit Zu- und Abluft:	Individual Ventilized Cages (IVC)- Rack, Tecniplast, DE
Objektträger:	Histo- Bond® Objektträger, 75x25x1 mm, Marienfeld GmbH Lauda- Königshofen, DE
Pipetten:	Labsystems Thermo Fischer, San Diego, USA
Pipettenspitzen:	TipOne, StarLab GmbH, Ahrensburg, DE

Pipetten für den Pipettus:	Falcon®, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Tierfutter:	NM Futter, 10 mm Pellets, Ssniff, Soest, DE
Tubes:	1,5 ml Eppendorf- Tubes, Eppendorf AG, Hamburg, DE
Universalröhrchen:	5ml + 30 ml Weißkappenröhrchen, Greiner Bio-one, Kremsmünster, AT
Zählkammer:	Neubauer- Zählkammer (Marienfeld GmbH Lauda-Königshofen, DE
Zellkulturflaschen:	Filterdeckel, 75 cm ² bzw. 175 cm ² Bodenfläche, Sarstedt AG & Co Nümbrecht, DE

3.2 Verwendete Geräte

Absauganlage:	Vascusafe comfort, INTEGRA Biosciences AG / Chur, CH
Anästhesie System:	1– 1,5% Isofluran/CO ₂ - Gemisch, VisualSonics Inc., Toronto, CA
Brutschrank:	Heraeus Instruments GMBH, Hanau, DE
CASY:	CASY® Schärfe System, Reutlingen, DE
Computerprogramm:	Axiovision Release 4.6.3 SP1 (11-2007)
Digitalkamera:	Axiovision MRc5, Zeiss, DE
Drucktopf:	DakoCytomation Pascal Pressure Cooker/Sterilizer, Carpintera, CA
Fluor. Mikroskop:	Axio Invert, Zeiss, DE
Gammacounter:	Wallac Victor 1420 Multilabel Counter, Perkin Elmer, Waltham, USA
Kühlschrank:	Liebherr Glass Line, Bulle, CH

Labor Rollmischer:	RM5 Assistant 348, Karl Hecht GmbH & Co. KG, Rhön, DE
Mikroskop:	Axiovert 35, Carl Zeiss AG, DE
Mikrotom:	Mikrom HM430, Thermo Scientific Inc., Waltham, USA
Objektträger-Färbegerät:	Shandon Varistain 24-4, Thermo Electron Corporation, Ohio, USA
Paraffinstreckbad:	Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, DE
pH-Elektrode:	Hanna® Instruments; Kehl am Rhein, DE
Pipettus:	Hirschmann®, Eberstadt, DE
Schüttler:	IKA Vibrax VXR basic, IKA- Werke GmbH &Co., Staufen, DE
Sicherheitsbank:	Steril Gard Class II Type A/B3, The Baker Company, Sanford, Maine, USA
Streck- und Trockentisch:	Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, DE
Trockenschrank:	MELAG Medizintechnik oHG, Berlin, DE
Universalzentrifuge:	Hettrich Zentrifugen GmbH & Co. KG, Tuttlingen, DE
Vortexer:	Scientific Industries, New York, USA
Waage:	Sartorius AG, Göttingen, DE
Wasserbad:	GFL, Burgwedel, DE
Zellkulturschrank:	Hera Cell, Heraeus Instruments GMBH, Hanau, DE
Zentrifuge:	Labofuge A mit 4- fach- Rotor (2143), Heraeus Sepatech, Hanau, DE

3.3 Zellkultur

3.3.1 Verwendete Zelllinien

Bei den in den Versuchen verwendeten Zelllinien handelte es sich um NIS-transfizierte und native, adhärent wachsende humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Die Zelllinien wurden in Vorversuchen stabil mit NIS transfiziert und zeigten kontinuierlich eine hohe Expressionsrate des Proteins. Das für die Zellkulturarbeiten verwendete RPMI 1640 Medium wurde mit 10% fötalem Kälberserum und 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin supplementiert. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolk (Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

3.3.2 Zellkulturbedingungen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer Steril Gard Class II Type A/B3 Sicherheitsbank durchgeführt. Die Zellkulturen wurden in beschichteten Kulturflaschen mit Filterdeckel und 75 cm² bzw. 175 cm² Bodenfläche mit 12 ml bzw. 25 ml RPMI Medium im Hera Cell Zellkulturschrank bei Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% relativer Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Alle Medien und Lösungen, die für die Behandlung der Zellen nötig waren, wurden vor dem Gebrauch auf 37°C in einem Wasserbad erwärmt und desinfiziert. Dem Medium der stabil transfizierten MCF-7/hNIS-Klone wurde zusätzlich das Selektivantibiotikum Zeocin in einer Konzentration von 250µg/ml (MCF-7) beigelegt.

Das Medium in den Zellkulturflaschen wurde jeden 2.- 3. Tag gewechselt oder die Zellen bei mehr als 70 % Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Medium vollständig mit einer sterilen Pipette abgesaugt, die Zellen mit 10 ml einer auf 37°C vorgewärmten PBS-Pufferlösung gespült und mit 5 ml Trypsin-EDTA Medium bei 37°C für ca. 5 Minuten inkubiert, bis sich die Zellen vollständig vom Flaschenboden abgelöst haben. Die Zellsuspension wurde zur Inaktivierung des Trypsins mit dem gleichen Volumen des entsprechenden FKS-haltigen Mediums vermischt, resuspendiert, mit 5 bis 6 ml in eine neue Zellkulturflasche umgesetzt und je nach Flaschengröße mit 12 bzw. 25 ml Medium aufgefüllt. Die Konfluenz der Zellen wurde kontinuierlich unter Axiovert 35 Mikroskop überprüft.

3.3.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer. Dazu wurden 10 µl der resuspendierten Trypsin-Medium-Zellsuspension auf den Objektträger pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden vier Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten und 0,1 µl Volumen nach der Formel ausgezählt:

$$\text{Gesamtzellzahl in 4 Großquadraten} / 4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{Zellen/ml}$$

Anschließend wurde die Zellsuspension pelletiert und die benötigte Zellzahl pro Volumen durch das Verdünnen oder Konzentrieren der Stammlösung eingestellt.

3.3.4 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese trypsinisiert, zentrifugiert und in 1 ml der Gefrierlösung resuspendiert und in Polypropylenröhrchen aliquotiert. Die stufenweise Abkühlung der Aliquots erfolgte über die ersten 12 Stunden bei -20 °C, über weitere 48 Stunden bei -80 °C. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -196 °C im flüssigen Stickstoff.

3.3.5 Auftauen von Zellen

Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden die Zellaliquots im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Sobald sich die Lösung verflüssigte, wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, resuspendiert und bei 800 Umdrehungen/min herunterzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellpellet in 10 ml frischen Medium resuspendiert und in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche umgesetzt. Vor dem Einsatz der Zellen in Versuchen wurden sie mindestens einmal passagiert.

3.3.6 Mycoplasmentest

Bei der Mycoplasmenbestimmung wurde eine DNA-Präparation der zu untersuchenden Zellen mit anschließender Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit dem Mycoplasmen-Detection-Kit durchgeführt. Die Proben wurden auf ein 1,8%iges Agarose-Gel aufgetragen und bei 120V 20 min auf dem Gel gelassen. Durch den anschließenden Vergleich der Banden auf dem Gel konnte eine Mycoplasmenkontamination bestätigt bzw. ausgeschlossen werden.

Alle Zellen wurden während des Versuchs kontinuierlich mit der spezifischen PCR-Methode auf das Vorkommen von Mycoplasmen untersucht. Die Ergebnisse waren stets Mycoplasmen-negativ.

3.3.7 Vorbereitung der Zelllinien für die Tumor-Xenograftmodelle

Aufgrund der Östrogen-Sensitivität der Zellen wurden den Versuchstieren 2 Tage vor der Zellinjektion Östrogenpellets, die über 90 Tage kontinuierlich das Hormon an die Umgebung abgaben s. c. über dem Nacken appliziert. Um eine diffuse Verteilung der Zellen zu verhindern und eine bessere Proliferation zu gewährleisten, wurden den Tieren 2×10^6 Zellen in 200 μ l pro Tier in einem 1:2 Gemisch aus zusatzfreiem RPMI 1640-Medium und Matrigel injiziert. Diese Gruppe bestand aus nativen Kontrollen, nativen Zellen für die atRA/DEXA-Stimulation, NIS-transfizierten MCF-7-Zellen und mit atRA/DEXA vorbehandelten MCF-7-NIS-Zellen. Sobald die Tumore eine Größe von ca. 80 mm³ erreicht haben, wurden die nicht für die Kontrolle vorgesehenen nativen MCF-7-Tiere, sowie die mit MCF-7-NIS-Zellen injizierten Tiere mit der atRA/DEXA-Behandlung zur NIS-Synthese angeregt. Entweder wurden atRA-Pellets s.c. in der Nackengegend implantiert und gleichzeitig 0,7 mg/Tag DEXA s. c. injiziert oder ein Gemisch aus beiden täglich s. c. bis zu 7 Tagen appliziert.

7 Tage vor der Radioiodbehandlung wurde allen Tieren L-Thyroxin s. c. injiziert, um die Sättigung der Schilddrüse zu erzielen. Ebenfalls 7 Tage vor der Behandlung wurde den atRA/DEXA-stimulierten Mäusen iodarmes Futter gegeben, um eine möglichst hohe Iodaufnahme nach der Behandlung im Tumorgewebe zu ermöglichen.

3.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bei der im Versuch angewendeten Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurden diese durch einen mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörper auf die NIS-Expression bei gleichzeitiger Darstellung lebender Zellen hin untersucht. Zur Durchführung der Färbung wurden die Zellen auf Chamber Slides-Objektträgern, auf denen sie über 48 Stunden anwachsen sollten, ausgesät. Nach der Inkubationszeit und bei 60-70% Konfluenz konnten die Zellen weiterverwendet werden. Zuerst wurde die Zellen mit 0,5 ml einer 80%igen Methanolösung bei 4 °C über 5 min und anschließend mit 0,5 ml des -20 °C kalten Acetons für 2 min fixiert. Um die Zellen zu rehydrieren, wurden sie 2-fach mit 0,5 ml des PBS- Puffers pro well gespült und anschließend mit 12% BSA in PBS über 15 min geblockt. Der Primärantikörper Human Sodium Iodide Symporter (hNIS) Ab-1 wurde mit einer Konzentration von 1:2000 in der S3022 DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components gelöst und 0,5 ml der Lösung auf die Zellen pipettiert. Parallel wurde bei gleichen Proben die IgG-Kontrolle (IgG1-Anti-Mouse 1:10 000 in 4% BSA in TBS) durchgeführt, um eine unspezifische Färbung auszuschließen. Die Zellen wurden in einer sterilen feuchten Kammer bei 4 °C über Nacht inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen 3-fach mit einer in TBS gelösten, 4%igen BSA-Lösung gespült. Ein biotinylierter Sekundärantikörper Polyclonal Goat-Anti-Mouse wurde in einer Konzentration von 1:200 in einer 4%igen BSA in TBS- Lösung 0,5 ml pro well für 30 min in der feuchten Kammer bei 4 °C stehen gelassen. Anschließend wurden die Objektträger wiederum 3-fach mit der 4%igen BSA in TBS- Lösung gespült und mit dem Streptavidin-markierten Antikörper Alexa Fluor goat-anti-mouse (1:100 in 4 % BSA in TBS) für 30 min in der feuchten Kammer bei 4 °C im Dunkeln stehen gelassen. Danach wurden die Kammern 2-fach mit ca. 1 ml der 4%igen BSA in TBS-Lösung gespült und mit einem Tropfen des Mounting Medium with DAPI pro Kammer versehen und eingedeckelt.

Um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu verhindern wurden die Kammern bis zum Mikroskopieren im Dunkeln gehalten.

3.5 Iodidaufnahme *in vitro*

NIS-transfizierten MCF-7-Zellen wurden im Radioaktivversuch nach Weiss et al. untersucht (78). Es wurden $4,5 \times 10^5$ Zellen/ml in 12-well-Platten ausgesät und die Konfluenz des Monolayer nach 24 Stunden überprüft. Zu Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium aus den wells abgesaugt und die Zellen wurden mit 1 ml HBSS-Medium durch vorsichtiges Schwenken gewaschen. Das Waschmedium wurde abgesaugt und je 0,5 ml des NaI^{125} -haltigen Mediums ($0,2 \mu\text{Ci NaI}^{125}$ pro ml im HBSS- Puffer) auf die Zellen pipettiert. Um die NIS-spezifische Iodaufnahme zu verifizieren wurde zu den Kontrollen $100 \mu\text{M KClO}_4$ -Lösung hinzugefügt.

Die Zellen wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und danach in einem zeitkritischen Schritt, bei dem das Iod aus den Zellen hinausdiffundiert, 2-fach rasch mit 0,5 ml HBSS-Puffer gewaschen, um nicht aufgenommenes Iod zu entfernen. Anschließend wurde 0,5 ml Lysepuffer pro well auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 30 min wurde das Lysat in Messröhrchen überführt, das well mit weiteren 0,5 ml Puffer ausgespült und ebenfalls in das jeweilige Messröhrchen pipettiert, um möglichst viele Zellen für die Messung zu erfassen. Die Messung erfolgte im γ -Counter.

Bei der atRA/DEXA-Stimulation der MCF-7-Zellen wurden diese 72 Stunden vor dem Versuch ausgesät ($1,5 \times 10^5$ Zellen pro well). Zu dem Medium wurde 24 und 48 Stunden später ein atRA/DEXA-Zusatz (beide Lösungen 10^{-6}M) hinzugefügt. So sollten die nativen und transfizierten MCF-7-Zellen zur NIS-Synthese stimuliert und miteinander in Vergleich gesetzt werden.

3.6 Iodid-Efflux-Assay

Bei dem Iodid-Efflux-Assay wurde das Herausströmen des Iodids aus den Zellen gemessen. Die Durchführung des Assays entspricht in den ersten Schritten dem Radioaktivversuch nach Weiss et al. (78). Nach dem 2-fachen raschen Waschen mit 0,5 ml HBSS- Puffer wurden hierbei jedoch die Zellen für 0, 2, 5, 10, 20, 30 und 45 min im nichtradioaktivhaltigem Puffer inkubiert und anschließend lysiert. Das Lysat wurde in Messröhrchen überführt und im γ -Counter gemessen.

3.7 Etablierung des Maus-Xenograftmodells

Den immundefizienten Versuchstieren wurden menschliche Tumorzellen transplantiert. Bei dem im Versuch verwendeten Mausstamm SCID, der weder T- noch B-Lymphozyten besitzt, war somit keine Abstoßungsreaktion zu erwarten. Die Xenograftmodelle wurden unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Zellmorphologie sowie des unterschiedlichen Wachstums etabliert.

3.7.1 Haltungsbedingungen

Der für die nachfolgend beschriebenen Tierversuche benötigte Antrag wurde gemäß des §8 des Tierschutzgesetzes im Universitätsklinikum Hamburg- Eppendorf eingereicht und genehmigt. Um eine Immunreaktion auf die Fremdzellen zu verhindern, wurden weibliche, 10 Wochen alte SCID (Severe combined immunodeficient)-Mäuse aus der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg- Eppendorf verwendet. Die Tiere wurden in kleinen Gruppen (maximal 4 Mäuse) in Käfigen mit Zu- und Abluft bei standardisierten Bedingungen (23 °C RT, ca. 50% relativer Luftfeuchtigkeit, Tag-Nacht-Rhythmus im 12-Stunden-Wechsel durch Kunstlicht) mit sterilem Wasser und während des Versuchs mit iodarmen Futter ad libitum versorgt. Während der Versuchszeit wurden die Mäuse täglich auf pathologische Veränderungen sowohl ihres Habitus, als auch des äußeren Erscheinungsbildes untersucht und wöchentlich gewogen.

3.7.2 Tumorvermessung mittels MRT

Noch vor der Therapie der Tiere mit Radioiod wurde eine Tumorgrößenbestimmung, sowie eine Tumorgewebecharakterisierung mit Hilfe des 7-Tesla Kleintier-MR-Tomographen durchgeführt. Die Tumorgrößenbestimmung und das daraus resultierende Tumorwachstum wurde über die 2D-Aufnahmen errechnet und dankenswerterweise von Frau Dr. Eva Koziolk (Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

3.7.3 Radioiodtherapie der Tiere

Ab einer Tumorgroße von ca. 80-100 mm³ wurde an den Versuchsmäusen die Radioiodtherapie durchgeführt. Dabei wurden ca. 60 MBq ¹³¹I pro Versuchstier i.p. injiziert. Nach der Radioiodtherapie wurden die Tiere täglich auf Auffälligkeiten ihres Verhaltens hin untersucht, sowie wöchentlich gewogen.

Die Tumorentnahme erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Radiojodtherapie, um das NIS-vermittelte Tumorverhalten zu untersuchen. Dabei wurden Abbruchkriterien wie eine rasche Gewichtsabnahme, Veränderungen des Fells, Ulzeration des Tumors, Schnappatmung etc. stets berücksichtigt.

Zu der Kontrollgruppe gehörten Mäuse, denen native Zellen injiziert worden sind, um die Iodidaufnahme NIS-spezifisch zu definieren, sowie Tiere, denen NIS-transfizierte Zellen mit PBS-Puffer-Zusatz appliziert worden sind, um die NIS-stimulierende Wirkung des Puffers auszuschließen.

3.7.4 SEPCT-CT-Untersuchung

Über eine bestehende Kollaboration mit dem Small Animal Imaging Center (SAIC) an der Charité in Berlin wurde bei den Versuchsmäusen das bildgebende Verfahren SPECT durchgeführt. Das SPECT-Imaging sollte zunächst die Iodaufnahme ins Tumorgewebe verifizieren und anschließend die Traceraufnahme (^{99m}Tc) und -verteilung widerspiegeln und damit die Verteilung der NIS-exprimierenden Tumorzellen im Gesamttumorgewebe darstellen.

Die SPECT-Aufnahmen wurden mit einem nanoSPECT/CT plus-Gerät durchgeführt. Das Datenmaterial wurde mit Hilfe der "In Vivo Scope"-Software analysiert und freundlicherweise von Frau Dr. Eva Koziolk (Klinik und Poliklinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) zur Verfügung gestellt.

3.7.5 Anästhesie und Euthanasie

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte unter Isofluran (1-2%). Die Vitalfunktionen wurden bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

Die Euthanasie der Tiere erfolgte durch die zervikale Dislokation.

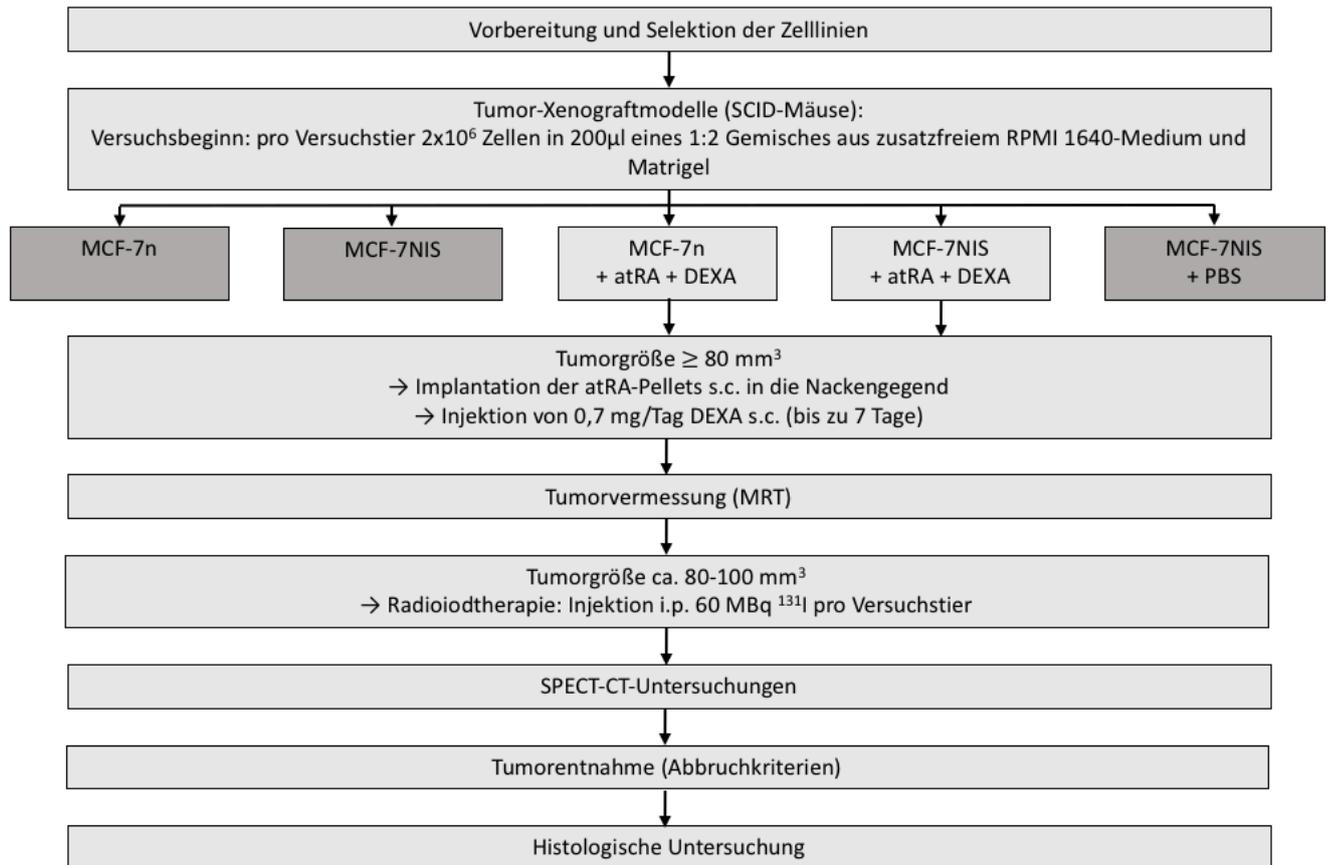


Abbildung 5: Etablierung des Maus-Xenograftmodells

3.8 Immunhistochemie

Bei der Etablierung der spezifischen immunhistochemischen NIS-Färbung wurden sowohl positive (Schilddrüsengewebe, NIS-transfizierte Karzinomzellen als Zellpellet) als auch negative (native Mammakarzinomzellen als Zellpellet) Kontrollen ausgewählt. Die Zellen wurden in ein Agarose-Gel überführt, anschließend mit einer Dicke von 4 Mikrometern geschnitten und auf Objektträger übertragen. Nach ausreichender Inkubationszeit über 24 Stunden im Trockenschrank bei 37 °C wurden die Schnitte NIS-spezifisch immunhistochemisch gefärbt.

3.8.1 Konventionelle Immunhistochemie

Die Färbung wurde an zwei Tagen durchgeführt.

Tag 1:

Zuerst wurden die Schnitte entparaffiniert und anschließend rehydriert. Die darauffolgende Vorbehandlung der Proben im Drucktopf bei 1 bar über 10 min bei 121 °C in der 1:10 verdünnten Dako Target Retrieval Solution 1699 dient der Epitop-Demaskierung. Der Plastikbehälter mit den in der Demaskierlösung getauchten Proben wurde vor der Entnahme aus dem Drucktopf auf ca. 60 °C abgekühlt und anschließend für 10 min gegen Aqua dest. ausgetauscht. Danach erfolgte der Spülvorgang zweimal über jeweils 5 min mit TBST und anschließend einmal mit dem TBS-Puffer. Die Schnitte wurden aus dem Puffer entnommen, in eine feuchte Kammer gelegt und mit 100 µl pro Probe mit der Blockierlösung Rabbit Serum 1:10 in TBS gelöst, bedeckt. Die so vorbereiteten Proben wurden in der feuchten Kammer bei RT für 30 min inkubiert. Danach wurden sie in die für die NIS-Färbung- und die für die ISO-Kontrolle-Gruppen unterteilt.

Auf die Hälfte der Schnitte wurde der erste Antikörper Human Sodium Iodide Symporter (hNIS) Ab-1 (Clone FP5A) 1:150 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components verdünnt mit jeweils 100 µl pro Probe aufgetragen. Auf die bei der Isotypenkontrolle verwendeten Schnitte wurden ebenfalls jeweils 100 µl der 1:75 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components gelösten Negative Control Mouse IgG1 aufgetragen. Die Schnitte wurden in der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert.

Tag 2:

Am zweiten Tag wurden die Schnitte zweimal mit TBST und einmal mit TBS über jeweils 5 min gespült. Anschließend wurde der Sekundär-Antikörper Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/Biotinylated 1:200 in TBS verdünnt mit jeweils 100 µl auf alle Proben aufgetragen. Die so vorbereiteten Schnitte wurden für 30 min RT in der feuchten Kammer inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Alkalische Phosphatase-Lösung (2,5ml TBS + ein Tropfen des hochgereinigten Avidins (A) + ein Tropfen der biotinylierter Alkalischer Phosphatase (B)) vorbereitet und für 30 min rotiert. Die Proben wurden mit TBST bzw. TBS gespült, die ABC-AP-Lösung wurde aufgetragen und für weitere 30 min auf den Schnitten in der feuchten Kammer belassen. Danach wurden die Proben wieder gespült und anschließend mit Dako Liquid Permanent Red - Lösung entwickelt. Die Entwicklungslösung, bestehend aus

3 ml des Permanent Red-Puffers und einem Tropfen des Chromogens, wurde für 15 min auf den Proben aufgetragen und in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 5 min unter fließendem Wasser und anschließend für 3 min in Aqua dest. gestellt. Die Kerngegenfärbung erfolgte über 10 sec. mit Hämatoxylin (1:2 in Aqua dest.), anschließend wurden die Schnitte wiederum für 5 min unter fließendes Wasser und für 2 min ins Aqua dest. gestellt. Daraufhin wurden die Proben in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, mit Eukitt-Medium eingedeckelt und über Nacht zum Trocknen unter dem Abzug liegen gelassen.

3.8.2 CSA-Methode

Die hochsensitive CSA-Methode wurde zum NIS-Nachweis bei Tumorproben etabliert, bei denen die Antigenkonzentration häufig unterhalb der Nachweisschwelle konventioneller Immunhistochemie liegt. Im Gegensatz zu der in der konventionellen Immunhistochemie verwendeten ABC-Methode wird bei der CSA-Färbung ein zusätzliches Amplifikationsreagenz (Biotinyl-Tyramid) hinzugefügt, was zu einer vermehrten Ablagerung von Enzymmolekülen und damit zu einer deutlich höheren Sensitivität führt.

Die Gewebeproben wurden wie bei der konventionellen Immunhistochemie vorbereitet und gelagert. Die CSA-Färbung fand an einem Tag statt. Die Schnitte wurden entparaffiniert, anschließend rehydriert und wie bei der konventionellen Immunhistochemie vorbehandelt (Drucktopf bei 1 bar über 10 min bei 121°C in der 1:10 verdünnten Dako Target Retrieval Solution 1699). Nach dem Abkühlen der Proben wurden sie zweimal über jeweils 5 min mit TBST und anschließend einmal mit dem TBS-Puffer gewaschen. Die Schnitte wurden aus dem Puffer entnommen, in eine feuchte Kammer gelegt, mit 100 µl pro Probe mit dem Avidin-Block bedeckt und in der feuchten Kammer bei RT für 15 min inkubiert. Nach anschließendem Spülen mit TBST bzw. TBS wurde auf die Proben 100 µl des Biotin-Block für 15 min pipettiert und danach wieder gespült. 100 µl des Protein-Block wurde auf die Proben pipettiert und wiederum für 15 min bei RT auf den Schnitten belassen. Danach wurden sie in die für die NIS - Färbung und die für die ISO-Kontrolle-Gruppen unterteilt. Auf eine Hälfte der Schnitte wurde der erste Antikörper Human Sodium Iodide Symporter (hNIS) Ab-1 (Clone FP5A) 1:2000 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components verdünnt mit jeweils 100 µl pro Probe aufgetragen. Auf die bei der Isotypenkontrolle verwendeten Proben wurden ebenfalls jeweils 100 µl der 1: 2190 in Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components gelösten Negative Control Mouse IgG1 aufgetragen. Nach 1 Stunde Inkubation bei RT wurden die Proben separat voneinander gespült. Während des Spülvorgangs wurde der Streptavidin-

Biotin-Komplex angesetzt. 100 µl des Biotinylated Link wurde für weitere 15 min auf die Proben pipettiert und bei RT belassen. Anschließend wurden die Schnitte wieder gespült und für 15 min mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex in der feuchten Kammer bedeckt. Während der Inkubationszeit wurde die TNB-Mischung (1 ml TBS + 5 µl Proteinblock) angesetzt. Nach anschließendem Spülgang wurde von der TNM-Amplifikationslösung (9:1 TNM-Mischung zum Amplifikationsreagenz) 100 µl pro Probe pipettiert und für weitere 15 min RT belassen. Die Schnitte wurden gespült und mit 100 µl der alkalischen Phosphatase-Lösung (1:200 in TBS) für 15 min RT bedeckt und anschließend wieder gespült. Der Entwicklungsvorgang, die Gegenfärbung, das Entwässern und das Eindecken der Präparate entsprachen denen der konventionellen Immunhistochemie.

3.9 Statistik

Zur Analyse statistisch signifikanter Unterschiede wurde der t-Test herangezogen. Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet. Die statistische Analyse wurde mit der kommerziellen Software (Microsoft, Excel) durchgeführt. Die entsprechenden Grafiken im Ergebnisteil zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen an.

4. Ergebnisse

4.1 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung der MCF-7-Zellen (nativ und NIS-transfiziert) mit einem NIS-spezifischen Antikörper ergab den Nachweis NIS-exprimierender Zellen bei den transfizierten MCF-7-Zellen. Die Expression des Proteins bei diesen Zellen betrug ca. 10% und wurde durch membranassoziierte Färbung sichtbar (siehe Abb. 6). Im Gegensatz hierzu war bei den nativen MCF-7-Kontrollzellen erwartungsgemäß keine NIS-spezifische Färbung nachweisbar.

Die Isotypenkontrollen beider Zelllinien zeigen keine Färbung der Zellen. Damit kann eine unspezifische Färbung ausgeschlossen werden.

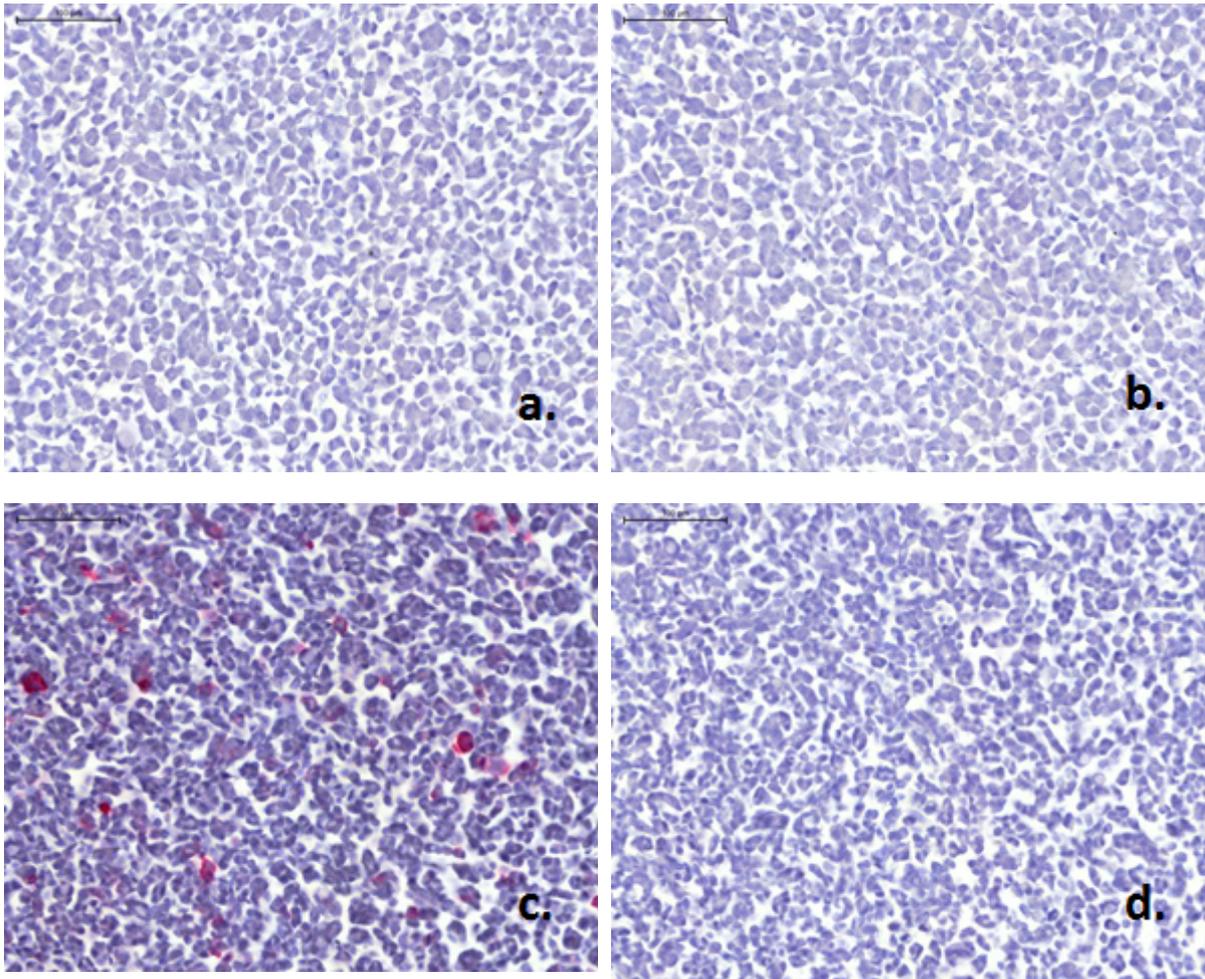


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung der MCF-7-Zellen

a) native MCF-7-Zellen mit dem NIS-Antikörper (1:150) gefärbt. Die Zellen zeigen keine NIS-Expression. b) native MCF-7-Zellen mit dem Isotypenkontrollantikörper IgG1 (1:75) gefärbt. c) NIS-transfizierte MCF-7-Zellen mit dem NIS-Antikörper (1:150) gefärbt. Hier sind einzelne NIS-exprimierende Zellen deutlich dargestellt. d) NIS-transfizierte MCF-7-Zellen mit dem Isotypenkontrollantikörper IgG1 (1:75) gefärbt. Die Isotypenkontrolle zeigt keine NIS-exprimierenden Zellen. Die eingezeichneten Maßstabsbalken entsprechen 100 μm .

4.2 Immunfluoreszenz

Die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 wurde mit der bereits in Kapitel 2.4 beschriebenen Methode auf die Expression von NIS *in vitro* mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Identifizierung der Zellen im Gewebe durch die Fluoreszenzfärbung wurde sowohl mit nativen, transfizierten, als auch mit transfizierten und atRA/DEXA behandelten MCF-7-Zellen durchgeführt.

Bei den NIS-transfizierten Zellen war eine deutliche Grünfärbung zu sehen, wobei hier der Einbau des Proteins in die Zellmembran und die damit verbundene Membranfärbung der Zellen von besonderer Bedeutung waren. Bei der Spezifität der Immunfluoreszenzfärbung betrug die Expressionsrate der transfizierten Zellen im Gegensatz zu nativen MCF-7-Zellen, die kein NIS exprimieren und dementsprechend nicht gefärbt wurden, ca. 20%. Bei den Isotypenkontrollen beider Zelllinien wurden die Zellen nicht gefärbt. Damit konnte eine unspezifische Bindung des NIS-Antikörpers ausgeschlossen werden.

Bei der Behandlung der Zellen mit atRA/DEXA wurden diese 24 Stunden vor dem eigentlichen Versuchsbeginn ausgesät und am darauffolgenden Tag in einem atRA- und DEXA-haltigen Medium über weitere 48 Stunden kultiviert. Hierbei betrug die NIS-Expression ca. 30%, eine höhere Expressionsrate als bei den transfizierten MCF-7-Zellen. Erwartungsgemäß konnte keine NIS-spezifische Färbung der Isotypenkontrollen beobachtet werden. Das Ergebnis der Immunfluoreszenzfärbung bestätigte die erhöhte Expressionsrate von NIS bei bereits transfizierten MCF-7-Zellen nach einer atRA/DEXA-Behandlung, wobei die veränderte Zellmorphologie (vergrößertes Zellvolumen), sowie das Zellverhalten (verlangsamte Zellteilungsrate) zu beobachten waren.

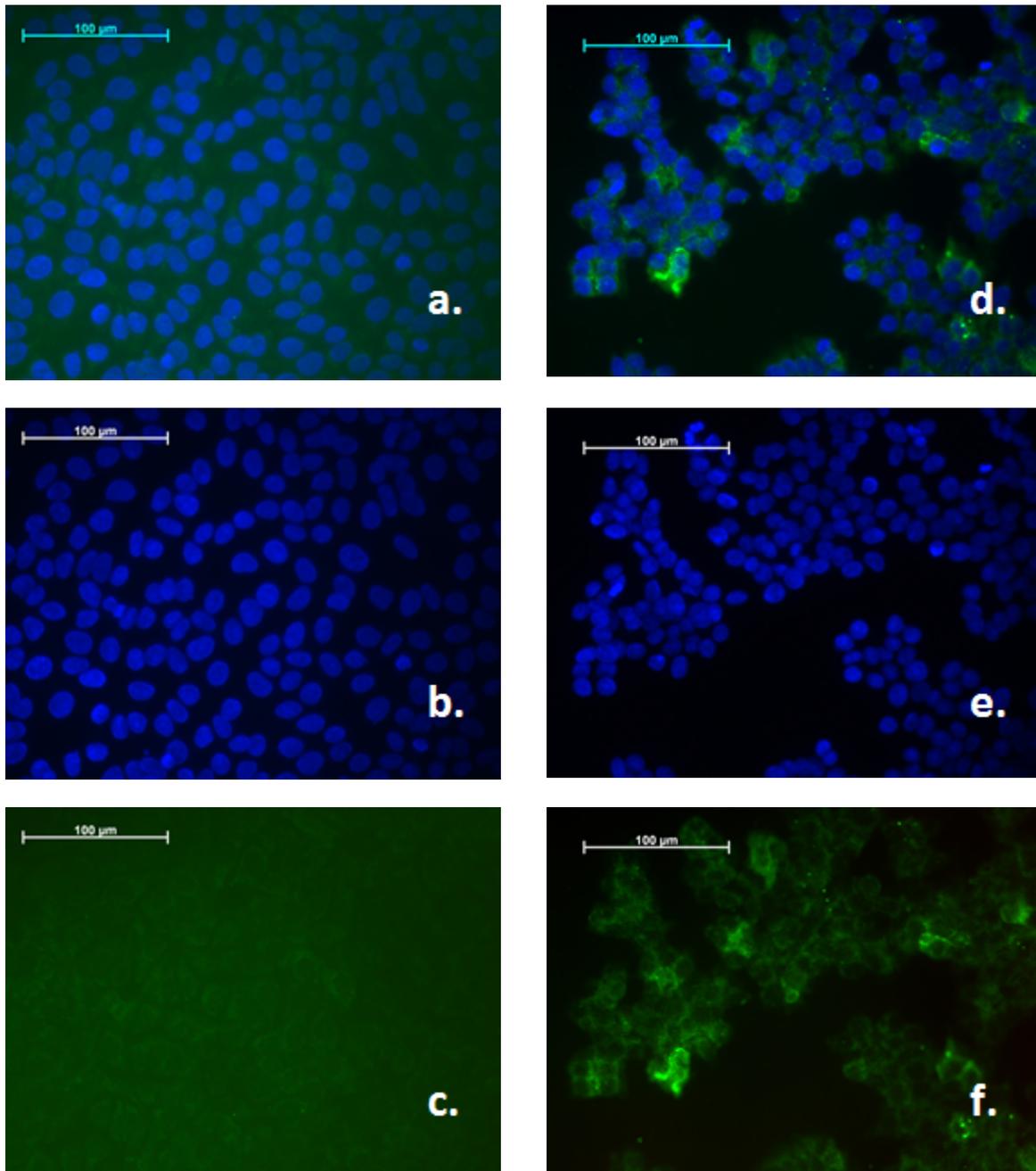


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis NIS-exprimierender Zellen

a)-c) Darstellung nativer MCF-7-Zellen, d)-f) Darstellung NIS-transfizierter MCF-7-Zellen. a)+d) Bildfusion DAPI- und FITC-Kanal, Zelllinien wurden mit dem NIS-Antikörper (1:2000 in 4% BSA in PBS) gefärbt. Die nativen Zellen in a) zeigen keine NIS-Expression. In d) sind die NIS-exprimierenden Zellen deutlich dargestellt. Die gefärbten Proteine kommen grün zur Darstellung (FITC-Kanal). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt und blau dargestellt (DAPI-Kanal). Die eingezeichneten Maßstabsbalken entsprechen 100 µm. b)+e) Darstellung der Zellkerne beider Zelllinien mit dem DAPI-Kanal. c)+f) Darstellung NIS-exprimierender Zellen mit dem FITC-Kanal.

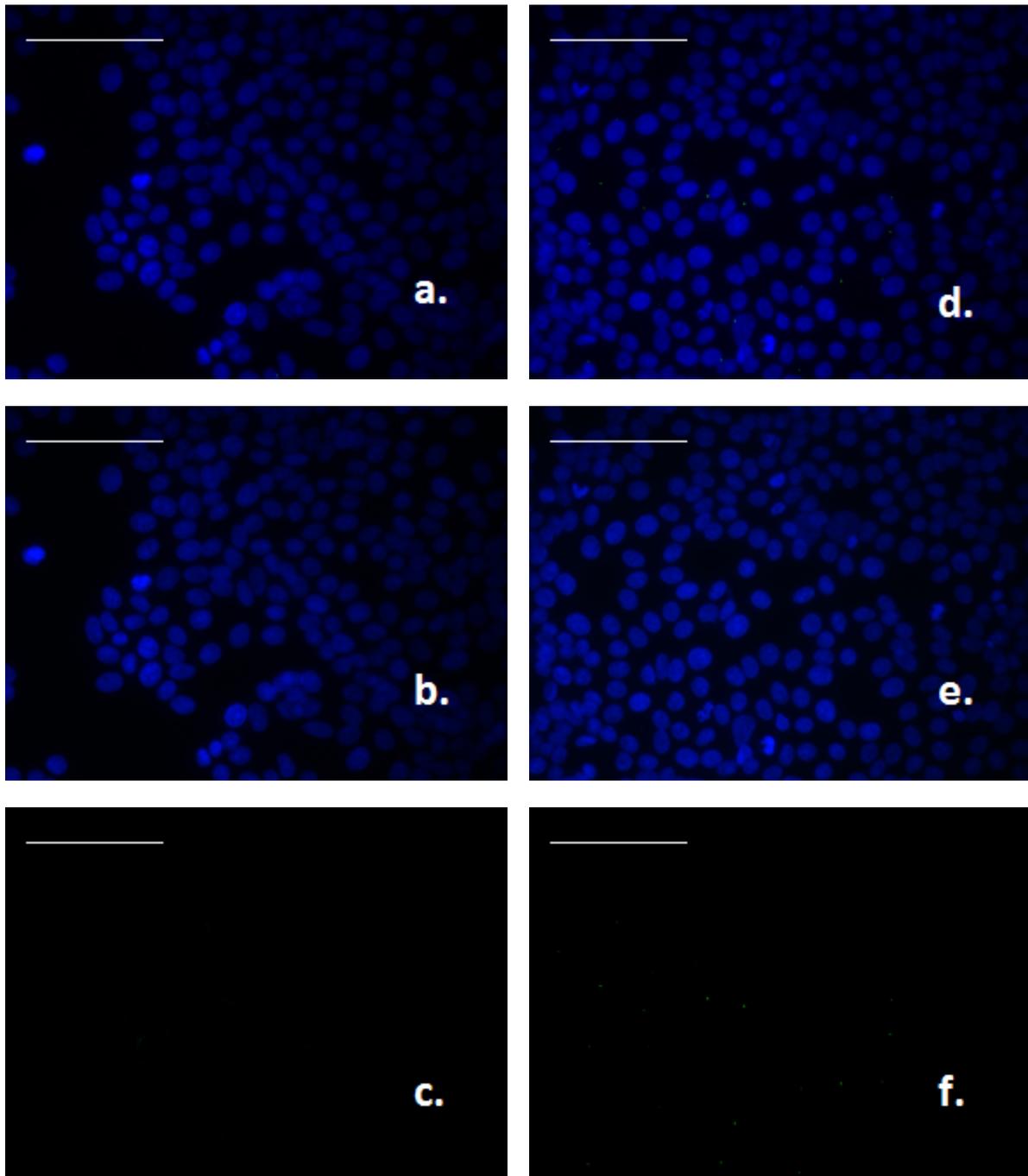


Abbildung 8: Isotypenkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Färbung

a)-c) native MCF-7-Zellen mit IgG1-Antikörper (1:10000 in 4% BSA in PBS) gefärbt. d)-f) NIS-transfizierte MCF-7-Zellen mit IgG1- Antikörper (1:10000 in 4% BSA in PBS) gefärbt. a)+d) Bildfusion DAPI- und FITC-Kanal. Sowohl die nativen als auch die NIS-transfizierten MCF-7-Zellen zeigen keine unspezifische Färbung. Die Zellkerne beider Zelllinien sind mit dem DAPI-Kanal blau dargestellt. b)+e) Darstellung der Zellkerne beider Zelllinien mit dem DAPI-Kanal. c)+f) fehlende Darstellung NIS-exprimierender Zellen mit dem FITC-Kanal. Die eingezeichneten Maßstabsbalken entsprechen 100 µm.

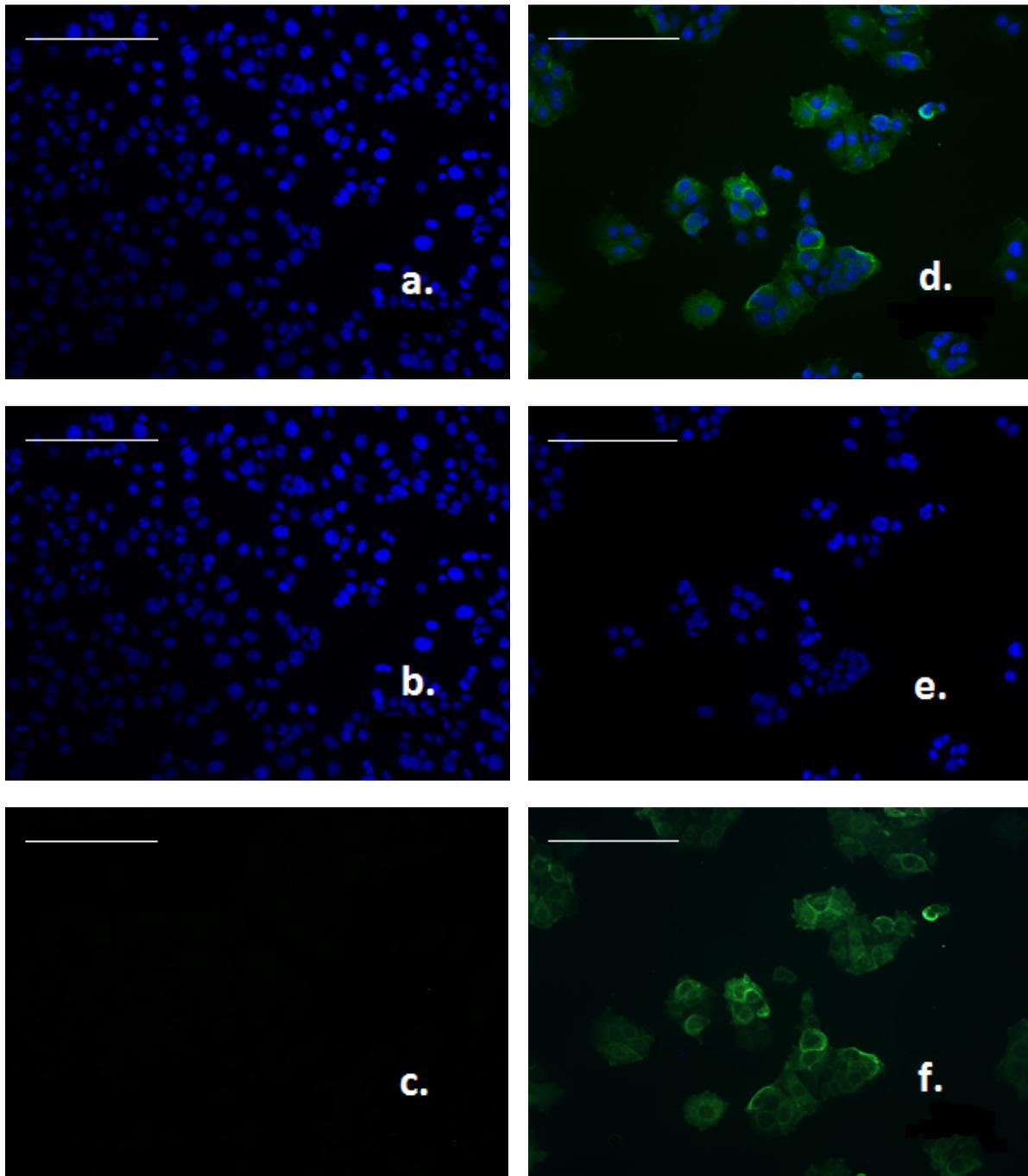


Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie der mit atRA/DEXA vorbehandelten, NIS-transfizierten MCF-7-Zellen zum Nachweis NIS-exprimierender Zellen

a)-c) vorbehandelte MCF-7-Zellen mit IgG1- Antikörper (1:10000 in 4%BSA in PBS) gefärbt. d)-f) Zellen mit NIS-Antikörper (1:2000 in 4%BSA in PBS) gefärbt. a)+d) Bildfusion DAPI- und FITC-Kanal. Die Isotypenkontrolle in a) zeigt keine unspezifische Färbung. In d) kommen die NIS-exprimierenden Zellen grün zur Darstellung (FITC-Kanal). b)+e) Darstellung der Zellkerne mit dem DAPI-Kanal. c)+f) Darstellung NIS-exprimierender Zellen mit dem FITC-Kanal. Die eingezeichneten Maßstabsbalken entsprechen 200 μm .

4.3 Radioiod-Assay *in vitro*

Native und NIS-transfizierte MCF-7-Zellen wurden nach der bereits im Kapitel 2.6 beschriebenen Methode nach Weiss et al. auf die NIS-vermittelte Iodaufnahme untersucht (78). Alle Zellen wurden während des Versuchs mit dem gleichen HBSS-Puffer behandelt, dem keine NIS-induzierende Zusätze beigemischt worden sind. Um die Spezifität der NIS-vermittelten Iodidaufnahme zu überprüfen, wurde den Kontrollen der kompetitive NIS-Inhibitor Kaliumperchlorat (KClO_4) hinzugefügt. Die Iodidaufnahme mit hinzugefügtem KClO_4 entspricht einer nicht NIS-vermittelten Iodaufnahme.

4.3.1 Selektion NIS-exprimierender Klone

Zwei unterschiedliche, NIS-exprimierende MCF-7-Klone (MCF-7 hNIS #1, MCF-7 hNIS #2) wurden nativen MCF-7-Zellen (MCF-7n) bezüglich der maximal möglichen Iodidaufnahme gegenübergestellt, um die funktionelle Expression des NIS zu bestätigen. Die Negativkontrollen wurden mit KClO_4 oder dem HBSS-Puffer behandelt.

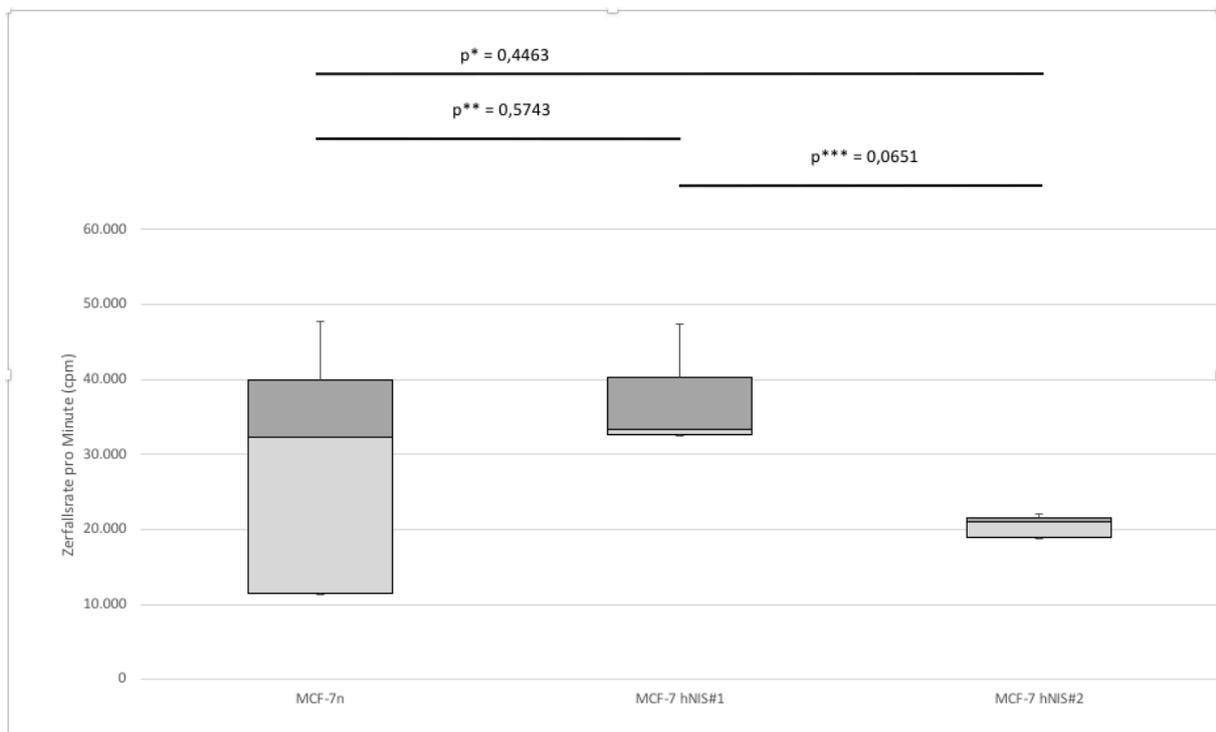


Abbildung 10: In vitro Iodidaufnahme von nativen und NIS-transfizierten Tumorzellen MCF-7 bei gleichzeitiger Behandlung mit KClO_4 .

Darstellung der Iodidaufnahme von NIS-transfizierten MCF-7-Zellen (MCF-7 #1 und MCF-7 #2) gegenüber nativer MCF-7-Zellen (MCF-7n) während der Messung der Proben im Gammacounter. Die Spezifität der NIS-vermittelten Iodidaufnahme ist durch die

vergleichsweise geringe Aufnahme des Radiopharmakons bei den mit $KClO_4$ -vorbehandelten Kontrollzellen bestätigt. $p^*=0,4463$; $p^{**}=0,5743$; $p^{***}=0,0651$.

Abbildung 10 zeigt die vergleichsweise geringe Aufnahme des Radioiodids in die Zellen (MCF-7n, MCF-7 hNIS #1, MCF-7 hNIS #2) bei gleichzeitiger Gabe des NIS-Inhibitors $KClO_4$. Hierbei konnte kein signifikanter Unterschied bez. der Iodidaufnahme zwischen den Negativkontrollen beobachtet und damit eine unspezifische, nicht NIS-vermittelte Iodidaufnahme ausgeschlossen werden.

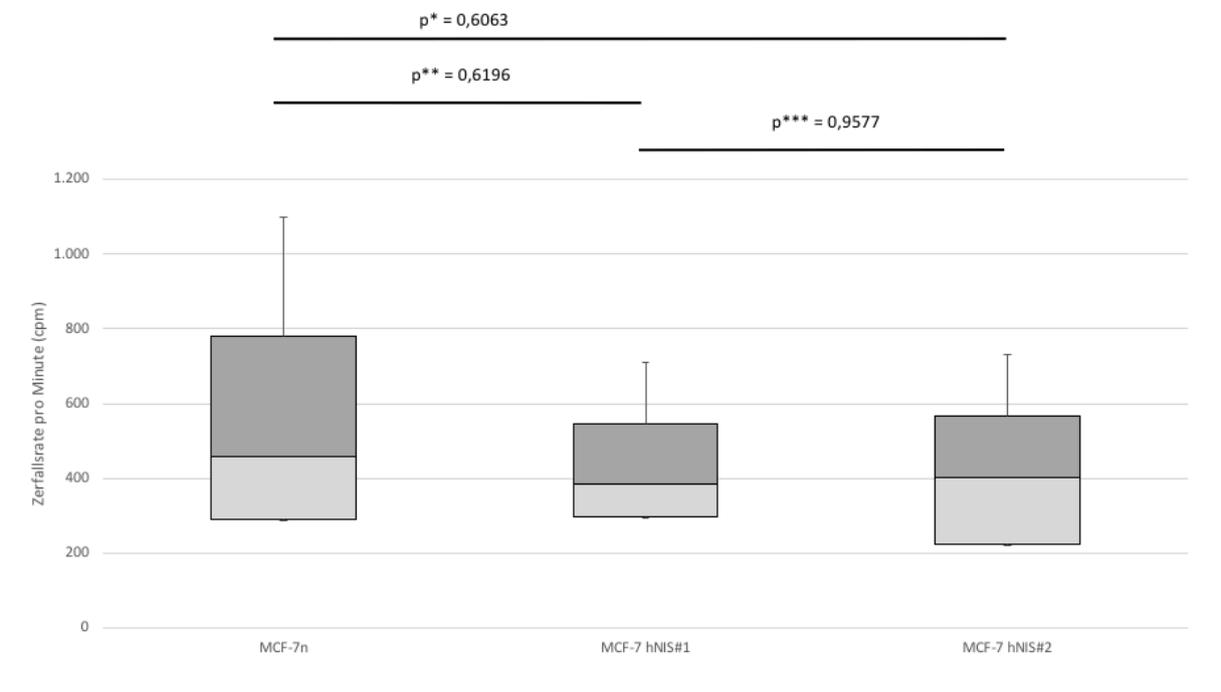


Abbildung 11: In vitro Iodidaufnahme von nativen und NIS-transfizierten Tumorzellen MCF-7 bei gleichzeitiger Behandlung mit dem HBSS-Puffer.

Darstellung der Iodidaufnahme von NIS-transfizierten MCF-7-Zellen (MCF-7 #1 und MCF-7 #2) gegenüber nativer MCF-7-Zellen (MCF-7n) während der Messung der Proben im Gammacounter. Die NIS-stimulierende Wirkung des HBSS-Puffers kann durch die vergleichsweise geringe Iodidaufnahme der Kontrollzellen ausgeschlossen werden. $p^*=0,6063$; $p^{**}=0,6196$; $p^{***}=0,9577$.

Abbildung 11 zeigt die vergleichsweise geringe Aufnahme des Radioiodids in die Zellen (MCF-7n, MCF-7 hNIS #1, MCF-7 hNIS #2) bei gleichzeitiger Gabe des HBSS-Puffers. Hierbei konnte in gleicher Weise wie bei dem KClO_4 -Zusatz kein signifikanter Unterschied bez. der Iodidaufnahme zwischen den Negativkontrollen beobachtet werden. Eine NIS-stimulierende Wirkung des Puffers konnte demnach ausgeschlossen werden.

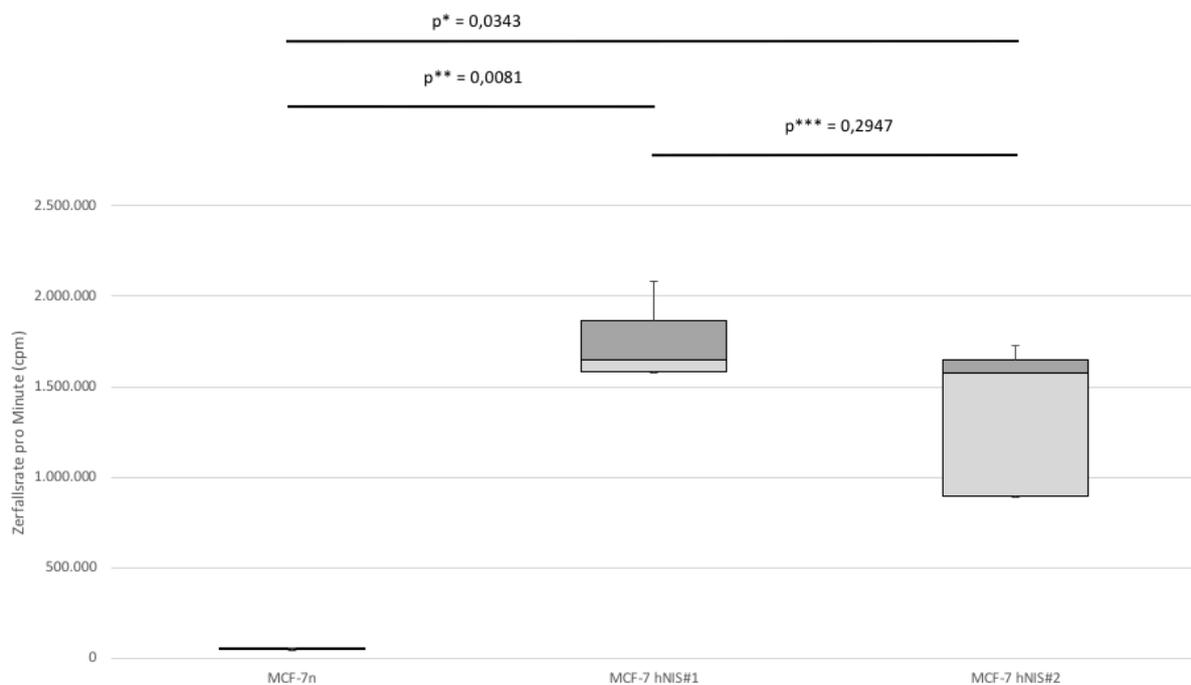


Abbildung 12: In vitro Iodidaufnahme von nativen und NIS-transfizierten Tumorzellen MCF-7. Darstellung der maximal möglichen Iodidaufnahme von NIS-transfizierten MCF-7-Zellen (MCF-7 #1 und MCF-7 #2) gegenüber nativer MCF-7-Zellen (MCF-7n) während der Messung der Proben im Gammacounter. $p^*=0,0343$; $p^{**}=0,0081$; $p^{***}=0,2947$.

Abbildung 12 zeigt die maximal mögliche Iodidaufnahme der nativen und NIS-transfizierten MCF-7-Zellen. Sowohl Klon MCF-7 hNIS #1 als auch MCF-7 hNIS #2 zeigen dabei eine signifikant höhere Iodidaufnahme gegenüber der nativen MCF-7-Zellen ($p^{**}=0,0081$ bzw. $p^*=0,0343$). Klon-1 Zellen, die gegenüber nativer MCF-7-Zellen eine ca. 34-fach höhere Iodidaufnahme aufwiesen, wurden für die weiteren Versuche verwendet und kontinuierlich auf den NIS-Gehalt über den Radioaktiv-Assay geprüft.

4.3.2 NIS-Stimulation durch atRA/DEXA

Bei der Stimulation der NIS-Expression nativer Mammakarzinomzellen konnte weder durch eine alleinige atRA-Behandlung ($p_{n^*}=0,9936$) noch durch eine Kombinationsbehandlung aus atRA und DEXA ($p_{n^{**}}=0,7720$) eine signifikant erhöhte Iodidaufnahme beobachtet werden.

Die alleinige atRA-Behandlung NIS-transfizierter MCF-7-Zellen ergab gegenüber unbehandelter NIS-transfizierter MCF-7-Zellen eine 1,12-fach erhöhte Iodidaufnahme. Gegenüber nativen MCF-7-Zellen konnte die Iodidaufnahme der atRA-stimulierten, NIS-transfizierten Zellen um das 18,41-Fache erhöht werden.

Nach der atRA/DEXA-Behandlung von nativen MCF-7-Zellen konnte gegenüber unbehandelten, nativen Karzinomzellen keine signifikant erhöhte Iodidaufnahme beobachtet werden ($p_{n^{***}}=0,8608$). Die Kombinationsbehandlung aus atRA und DEXA zeigte hingegen bei der NIS-transfizierten MCF-7 Zelllinie die statistisch signifikante, maximal mögliche Iodidaufnahme ($p_{NIS^{***}}=0,0459$).

Bei den NIS-transfizierten MCF-7-Zellen konnte die Iodidaufnahme durch die Vorbehandlung mit atRA/DEXA gegenüber unbehandelten, transfizierten MCF-7-Zellen um das 1,57-fache erhöht werden ($p_{NIS^{***}}=0,0459$). Gegenüber atRA-vorbehandelten, NIS-transfizierten MCF-7-Zellen konnte die Iodidaufnahme um das 1,4-fache erhöht werden ($p_{NIS^{**}}=0,0705$). Die Kombinationsbehandlung mit atRA/DEXA war an NIS-transfizierten MCF-7-Zellen am effektivsten. Gegenüber atRA/DEXA-vorbehandelten, nativen MCF-7-Zellen konnte sogar eine 27,34-fach erhöhte, statistisch signifikante Iodidaufnahme erreicht werden ($p=0,0091$).

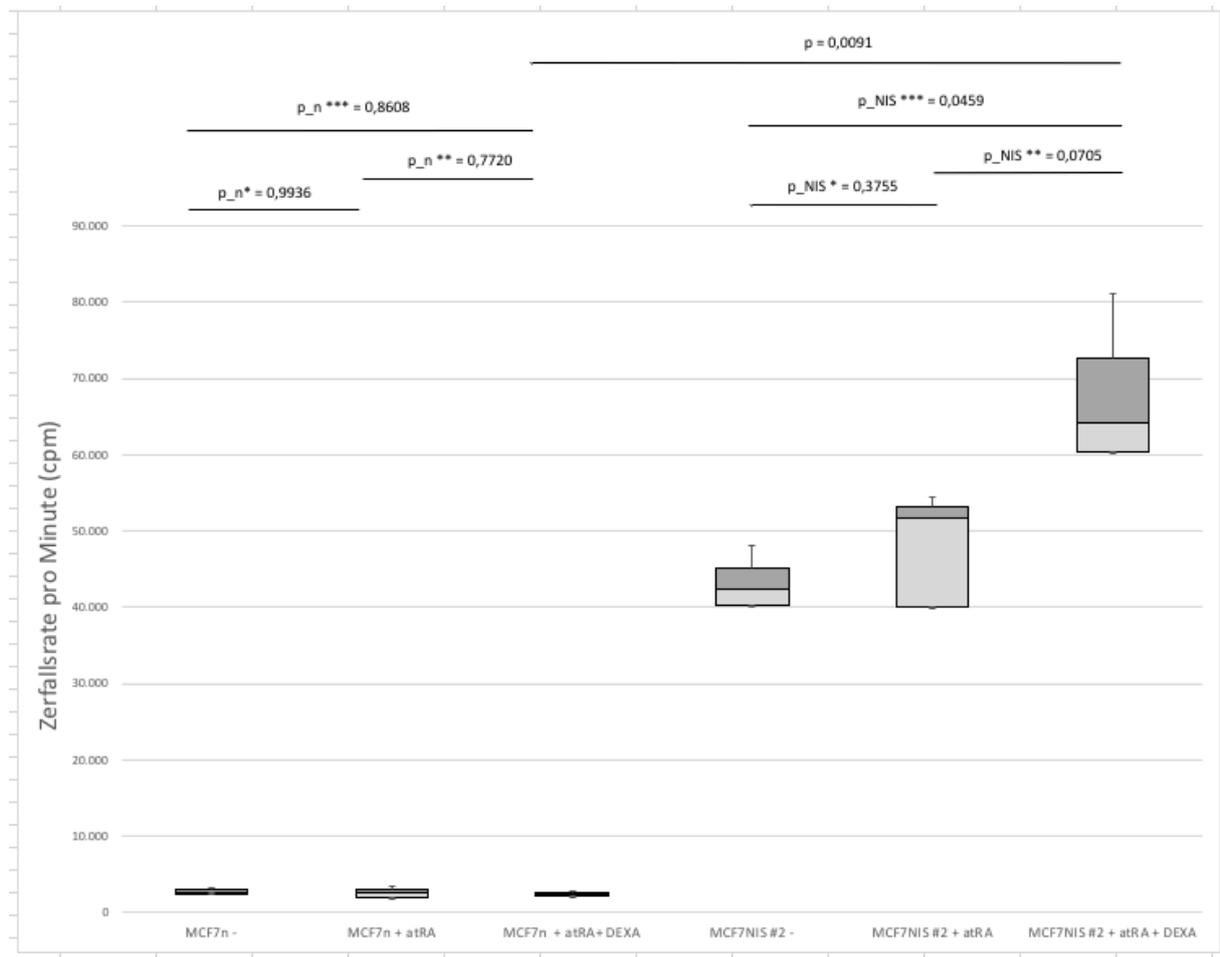


Abbildung 13: Stimulation der Iodid-Aufnahme in vitro durch Behandlung nativer und NIS-transfizierter MCF-7-Zellen mit atRA und der Kombination aus atRA/DEXA.

Darstellung der Iodidaufnahme von nativen und NIS-transfizierten MCF-7-Zellen während der Messung der Proben im Gammacounter. Durch eine Kombinationsbehandlung aus atRA und DEXA der NIS-transfizierten MCF-7-Zellen ist gegenüber der unbehandelten und atRA-vorbehandelten, NIS-transfizierten Zellen die maximal mögliche Iodid-Aufnahme möglich ($p_{NIS}^{***}=0,0459$ bzw. $p_{NIS}^{**}=0,0705$). Die Behandlung der nativen MCF-7-Zellen mit atRA oder atRA/DEXA hat gegenüber unbehandelten, nativen Zellen keine statistisch signifikante Erhöhung der Iodid-Aufnahme zur Folge ($p_n^*=0,9936$ bzw. $p_n^{***}=0,8608$).

4.3.3 Iodid-Efflux

Um die Auswirkungen der atRA/DEXA-Vorbehandlung der MCF-7-Zellen auf die Retentionszeit des Radiopharmakons zu untersuchen, wurde in einem Iodid-Efflux-Versuch zu bestimmten Zeitpunkten nach Radioiodgabe die Höhe der Zerfallsrate (counts pro Minute) gemessen. Hierbei hat sich eine statistisch signifikante Erhöhung der Iodaufnahme durch die atRA/DEXA-Behandlung der NIS-transfizierten MCF-7-Zellen gezeigt ($p_{\text{NIS atRA/DEXA_NIS}}=0,0462$). Eine solche Behandlung ermöglichte eine 2,8-fach höhere Aufnahme des sich zur gleichen Zeit in den NIS-transfizierten MCF-7-Zellen befindenden Radioiods. Nach dem Ablauf der Versuchszeit konnte die höchste Zerfallsrate pro Minute bei den NIS-transfizierten, atRA/DEXA-vorbehandelten MCF-7-Zellen, gefolgt von NIS-transfizierten MCF-7-Zellen, und atRA/DEXA-vorbehandelten MCF-7-Zellen beobachtet werden. Die Ergebnisse zeigen zudem, dass die alleinige Behandlung der MCF-7-Zellen mit atRA/DEXA die Iodaufnahme erhöht und die Retentionszeit verlängert, die Höhe der Zerfallsrate der NIS-transfizierten bzw. NIS-transfizierten, atRA/DEXA-vorbehandelten Zellen jedoch nicht erreicht. So wurde eine statistisch signifikante Erhöhung der Iodaufnahme bei den NIS-transfizierten MCF-7-Zellen gegenüber atRA/DEXA-vorbehandelten, nativen MCF-7-Zellen beobachtet ($p_{\text{natRA/DEXA_NIS}}=0,0006$). Trotz der durch die erhöhte Iodidaufnahme verlängerten Retentionszeit konnte ein rasches Herausströmen des Radiopharmakons aus den Zellen beobachtet werden. Bei den atRA/DEXA-vorbehandelten nativen MCF7-Zellen ergab die Zerfallsrate nach 45 min 44% des zu Beginn des Versuchs aufgenommenen Iods, bei den NIS-transfizierten MCF-7-Zellen 18,4%, bei NIS-transfizierten, atRA/DEXA-vorbehandelten MCF-7-Zellen 8,3%. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Zelllinien bezüglich des am Ende des Versuchs vorhandenen Iods festgestellt werden ($p_{\text{natRA/DEXA_NIS}}=0,4658$; $p_{\text{NIS_NIS atRA/DEXA}}=0,2406$; $p_{\text{natRA/DEXA_NIS atRA/DEXA}}=0,1310$). Um einen therapeutischen Effekt des Radiopharmakons und die gewünschte DNA-Schädigung der Tumorzellen zu erzielen, muss jedoch die Retentionszeit stabil und voraussagbar verlängert werden können. Um den Iodid-Efflux zu verzögern und die Wirkung des Radiopharmakons auf die Zellen zu verstärken, wurde in einem weiteren Schritt die Wirkung des Anionkanalblockers DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedisulfonsäure) untersucht.

Bei NIS-transfizierten MCF-7-Zellen wurde die maximal mögliche Iodidaufnahme durch eine alleinige Vorbehandlung mit dem Kombinationsmedium aus atRA/DEXA erreicht. Durch den DIDS-Zusatz wurde eine statistisch signifikante Reduzierung der maximal möglichen Iodidaufnahme beobachtet ($p_{\text{NIS atRA/DEXA DIDS_NIS atRA/DEXA}}=0,0038$). Bezüglich des am Ende des

Versuchs in den Zellen vorhanden Iods konnte entgegen der Erwartung eine statistisch signifikant höhere Zerfallsrate der nativen, atRA/DEXA-verbandelten Zellen gegenüber atRA/DEXA/DIDS-vorbehandelten, nativen Zellen beobachtet werden ($p_{\text{natRA/DEXA DIDS_natRA/DEXA}}=0,0190$). Der DIDS-Zusatz konnte demnach den Efflux des Radiopharmakons nicht erfolgreich hemmen. Es wurde zudem eine statistisch signifikant höhere Zerfallsrate der NIS-transferten Zellen gegenüber nativer, atRA/DEXA/DIDS-vorbehandelter Zellen beobachtet ($p_{\text{NIS_natRA/DEXA/DIDS}}=0,0012$). Eine alleinige DIDS-Behandlung nativer MCF-7-Zellen hätte demnach weniger Wirkung als eine Transfektion der Zellen. Nach 45 min wurde bei den nativen, atRA/DEXA/DIDS-vorbehandelten MCF-7-Zellen nur noch 7,5% des zu Beginn des Versuchs aufgenommenen Iods vorhanden. Bei den NIS-transferten, atRA/DEXA/DIDS-vorbehandelten MCF-7-Zellen waren es sogar lediglich 6,6%. Nach dem Ablauf der Versuchszeit konnte weder bei den nativen, noch den NIS-transferten MCF-7-Zellen durch eine zusätzliche DIDS-Behandlung eine Verzögerung des Iodid-Efflux beobachtet werden.

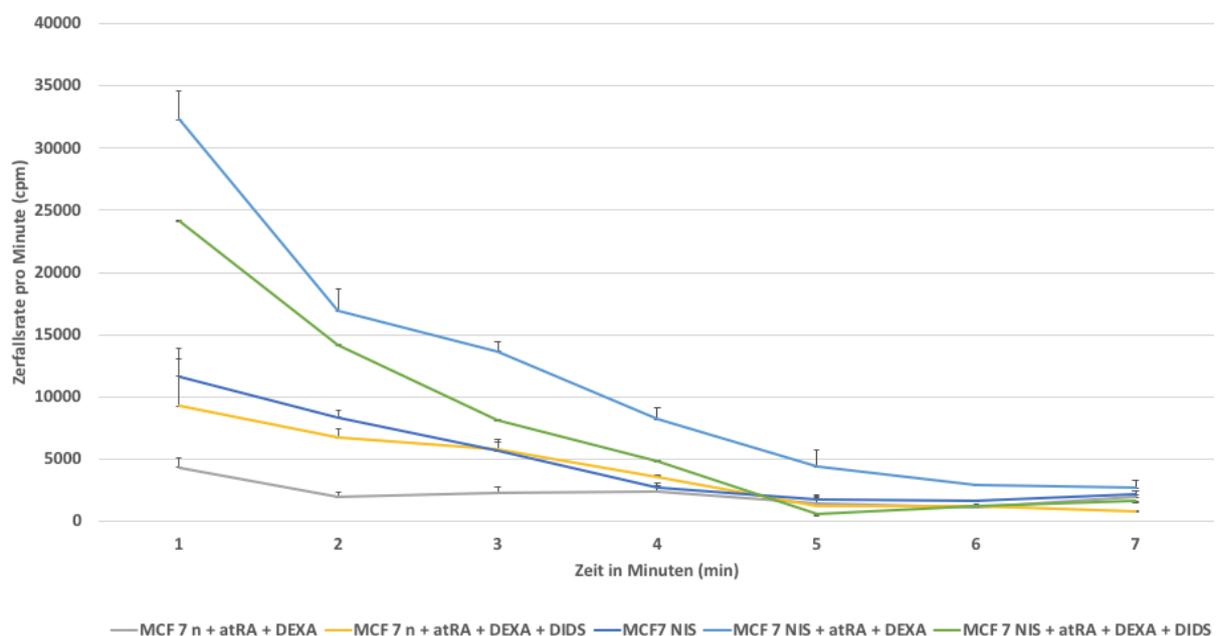


Abbildung 14: Iodid-Efflux-Assay in vitro mit nativen und NIS-transferten Zellen unter atRA/DEXA- und DIDS-Behandlung. NIS-transfizierte MCF-7-Zelllinien stellen die Kontrollgruppe dar.

Die Linien stellen den Verlauf der Zerfallsrate der einzelnen MCF-7-Zelllinien dar. Durch eine Vorbehandlung mit atRA/DEXA und DIDS konnte bei den nativen Zellen nicht die Iodidaufnahme der NIS-transferten MCF-7-Zellen erreicht werden. Die maximal mögliche

Iodidaufnahme wurde bei den atRA/DEXA-vorbehandelten, NIS-transfizierten MCF-7-Zellen beobachtet. Nach Ablauf der Versuchszeit ist die Höhe der Zerfallsrate bei allen Zelllinien vergleichbar niedrig.

4.4 Ergebnisse *in vivo*

Bedingt durch den aufwendigen Versuchsaufbau, die Notwendigkeit mehrfacher Narkosen für die MRT- und SPECT-Untersuchungen, das rasche Wachstum der Tumorzellen und das darauffolgende Einsetzen der Abbruchkriterien konnten lediglich drei Tumorproben einige Tage nach durchgeführter Radioiodtherapie entnommen und histologisch aufgearbeitet werden. Die Tumore wurden den Versuchstieren entnommen, in ein Agarose-Gel überführt, mit einer Dicke von 4 Mikrometern geschnitten auf Objektträger übertragen und immunhistochemisch gefärbt.

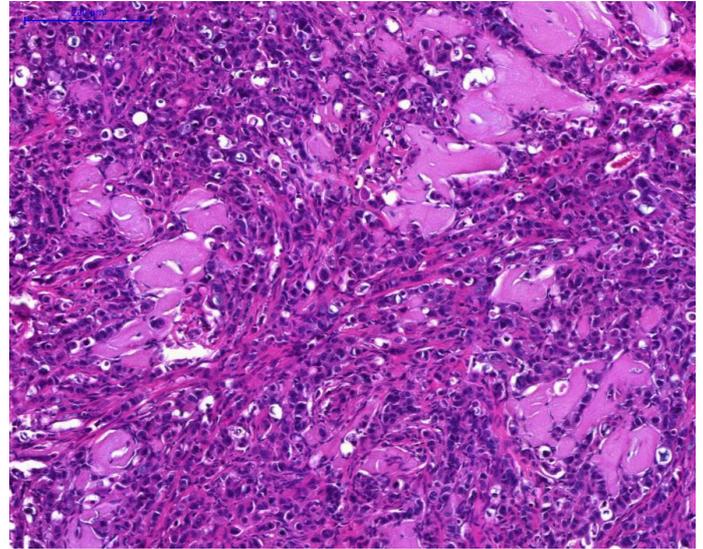
4.4.1 Immunhistochemische Untersuchung der Tumorproben

Bei der ersten Tumorprobe handelt es sich um NIS-transfizierte MCF-7-Tumorzellen am 9. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie. Hierbei konnten einzelne apoptotische Zellen innerhalb des Zellverbandes nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse konnten bei der Untersuchung der zweiten Tumorprobe (NIS-transfizierte MCF-7-Tumorzellen am 3. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie) beobachtet werden. Bei der dritten Tumorprobe handelt es sich um NIS-transfizierte, atRA/DEXA/DIDS-behandelte MCF-7-Tumorzellen am 7. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie. Bei dieser Tumorprobe ist ein im Tumor zentral gelegener, nekrotischer Bereich erkennbar.

1a



1b



1c

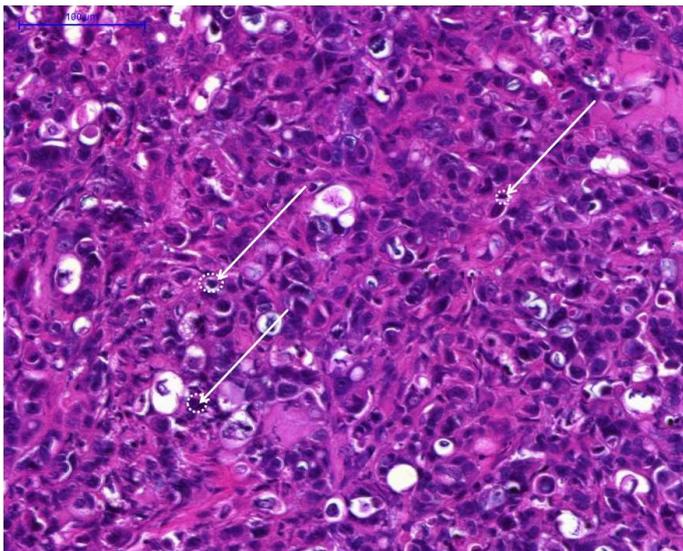


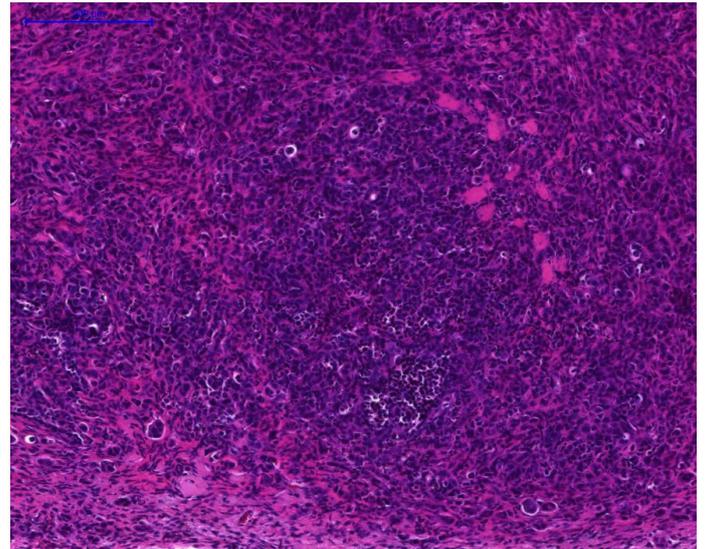
Abbildung 15: HE-Färbung der Tumorprobe (NIS-transfizierte MCF-7-Tumorzellen am 9. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie)

a) HE-Färbung Übersicht. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 1000 µm b) HE-Färbung. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 200 µm. c) HE-Färbung. Darstellung der Nekrosen (markiert mit weißer Umrandung/weißen Pfeilen). Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

2a



2b



2c

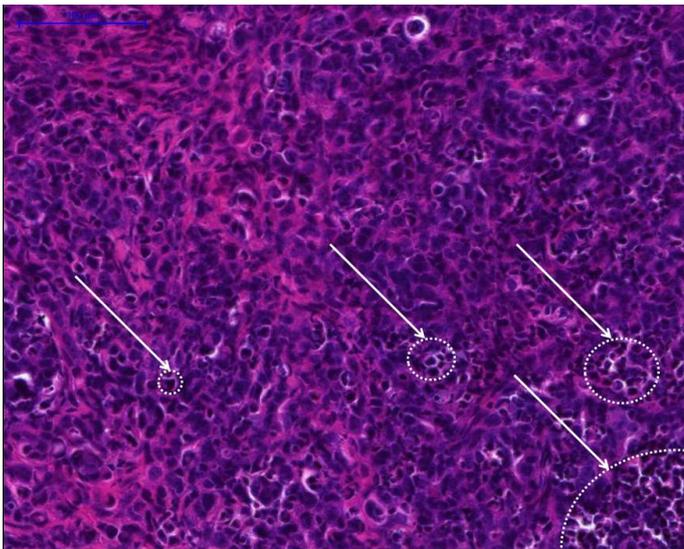
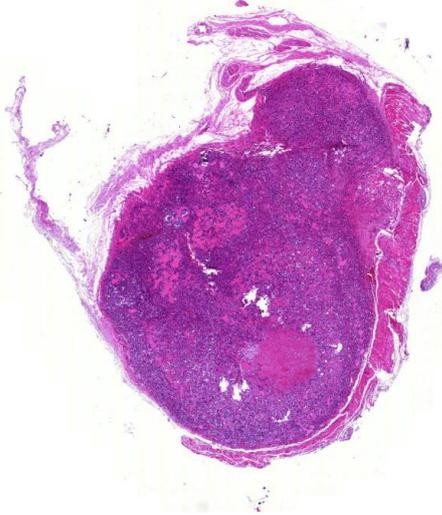


Abbildung 16: HE-Färbung der Tumorprobe (NIS-transfizierte MCF-7-Tumorzellen am 3. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie)

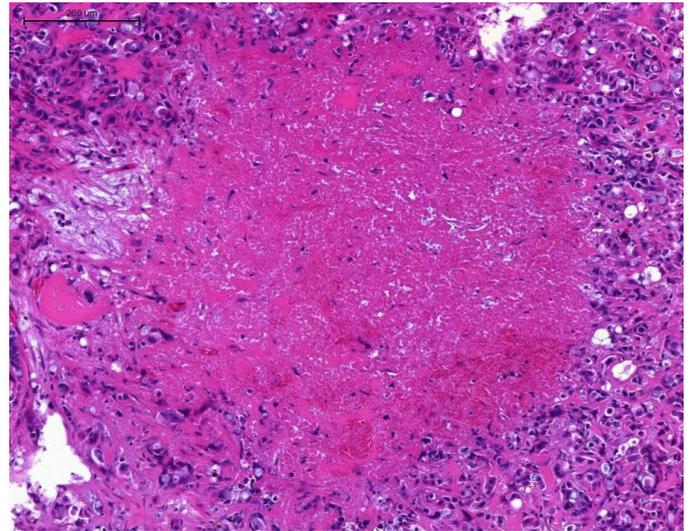
a) HE-Färbung Übersicht. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 1000 µm b) HE-Färbung. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 200 µm. c) HE-Färbung. Darstellung der Nekrosen (markiert mit weißer Umrandung/weißen Pfeilen). Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

3a

1000 μm



3b



3c

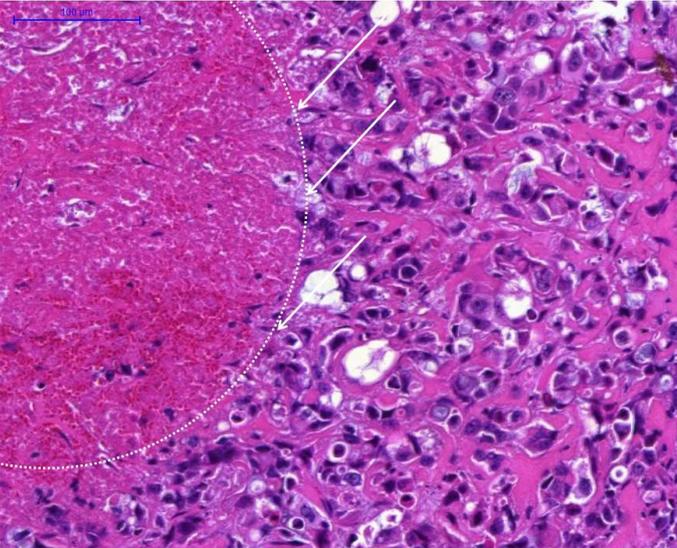


Abbildung 17: HE-Färbung der Tumorprobe (NIS-transfizierte, atRA/DEXA/DIDS-behandelte MCF-7-Tumorzellen am 7. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie)

a) HE-Färbung Übersicht. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 1000 μm b) HE-Färbung. Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 200 μm . c) HE-Färbung. Darstellung der Nekrosen (markiert mit weißer Umrandung/weißen Pfeilen). Der eingezeichnete Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

5. Diskussion

5.1 Darstellung und Funktion von NIS

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob die simultane Anwendung von NIS als Reporter- und therapeutisches Gen in MCF-7-Zellen, die damit verbundene gleichzeitige Darstellung der Iodaufnahme und -akkumulation durch bildgebende Verfahren sowie die therapeutische Zerstörung der Tumorzellen möglich sind. Das körpereigene Iodtransport-Protein scheint für eine solche Anwendung besonders geeignet zu sein, da bei einem denkbaren Einsatz keine Abwehrreaktionen zu erwarten sind und die therapeutische Effizienz bereits seit Jahrzehnten in der Behandlung von Thyreopathien bei gleichzeitigen geringfügigen extrathyreoidalen Nebenwirkungen nachgewiesen werden konnte (25, 79, 80). Zudem ist insbesondere die Anwendung in Mammakarzinomzellen vielversprechend, da der Symporter nicht nur physiologischerweise in der laktierenden Brustdrüse, sondern auch in bis zu 80% der Mammakarzinomzellen exprimiert wird. Gesundes, nicht laktierendes Brustdrüsengewebe zeigt hingegen keine NIS-Expression (39, 81-85).

Um die Anwendung von NIS als Reporter- und therapeutisches Gen zu prüfen, wurde das Protein-codierende Gen zunächst in die zu untersuchenden Mammakarzinomzellen MCF-7 stabil transfiziert. Als Kontrolle diente stets die native Zelllinie MCF-7. Der molekularbiologische Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung bei gleichzeitiger Darstellung lebender Zellen. Wie bereits beschrieben betrug die Expressionsrate bei der Identifizierung der NIS-transfizierten Zellen ca. 20%. Dies bestätigte die Ergebnisse von Knostman et al. (86) bezüglich der MCF-7-Zelllinie. Zu ähnlichen Ergebnissen mit der Zelllinie CMT93 kam Gaertner et al. (87). Durch fehlende Färbung der Isotypenkontrollen beider Zelllinien konnte eine unspezifische Bindung des NIS-Antikörpers ausgeschlossen werden. Die Zelllinien zeigten sowohl zu Beginn als auch im Laufe der Versuche eine konstante Expressionsrate.

Eine weitere Methode zur Überprüfung der Expressionsrate NIS-transfizierter Zellen stellte der spezifische immunhistochemische Nachweis des NIS-Proteins dar. Hierbei wurde der von Castro et al. (88) entwickelter und beschriebener NIS-Antikörper (Human Sodium Iodide Symporter (hNIS) Ab-1 Clone FP5A) verwendet. Die Expression des Proteins bei den NIS-transfizierten Zellen betrug ca. 10% und wurde durch membranassoziierte Färbung sichtbar. Im Gegensatz hierzu war bei den nativen MCF-7-Kontrollzellen keine NIS-spezifische Färbung nachweisbar. Eine unspezifische Färbung konnte durch die Isotypenkontrollen beider Zelllinien

ausgeschlossen werden. *In vivo*-Untersuchungen von Tazebay et al. (39) zeigten, dass das NIS-Protein in 20 von 23 (87%) der invasiven Mammakarzinomproben und in 5 von 6 (83%) der duktaalen Mammakarzinomproben durch die immunhistochemische Färbung bestätigt werden konnten während gesunde, aus Brustverkleinerungen gewonnene Brustgewebeproben kein NIS-Protein exprimierten. Damit konnte im Gegensatz zu den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen das NIS-Protein in nicht transfizierten MCF-7-Zellen immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe um Rudnicka et al. (44) konnte sogar bei 45 von 50 (90%) der untersuchten invasiven duktaalen Mammakarzinomproben das NIS-Protein immunhistochemisch nachweisen. Angelousi et al. (89) haben hingegen nur bei 32% der untersuchten 56 Proben (41 Mammakarzinomproben, 11 Proben gutartiger Brusterkrankungen und 4 Gewebeproben aus der Umgebung des Tumors) das NIS-Protein nachweisen können. Die Darstellbarkeit des NIS-Protein erscheint daher stark zu variieren. Die beschriebenen Ergebnisse weisen zudem darauf hin, dass bei der beobachteten zytoplasmatischen Lokalisation des Proteins keine transmembranäre Symporterfunktion möglich sei. Die intrazelluläre Lokalisation und die damit zusammenhängende fehlende Funktionsfähigkeit des Symporters stellte ebenfalls die Arbeitsgruppe von Wapnir et al. (42) in Frage. Bei der immunhistochemischen Untersuchung von insgesamt 169 Proben, konnte das Protein in 30% der Gewebeproben aus der Umgebung des Tumors, 88% der Proben des duktaalen Mammakarzinoms und 76% der Proben des invasiven Mammakarzinoms nachgewiesen werden. Peyrottes et al. (90) führten immunhistochemische Untersuchungen von 93 Schilddrüsen – und Mammakarzinomproben mit drei unterschiedlichen NIS-Antikörpern durch. Hierbei beschrieb die Arbeitsgruppe von Peyrottes anhand intrazellulärer Färbung eine sehr niedrige Expressionsrate des Proteins in lediglich einigen wenigen Proben des Mammakarzinoms. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Castro et al. (88) charakterisierte Peyrottes et al. (90) die Bindung der verwendeten Antikörper als unspezifisch. Demnach resultiere die von Jhiang et al (91) und Caillou et al. (92) beschriebene geringe Iodaufnahme in Schilddrüsenkarzinomen (und auch in Mammakarzinomen) nicht an der fehlenden Membranständigkeit, sondern an der zu geringen Expressionsrate des Proteins im Tumorgewebe und der zu schwachen Darstellung durch die Färbung, was die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse bestätigt. Die Arbeitsgruppe um Beyer et al. (93) hat Gene, die im Mammakarzinomgewebe für den Einbau des NIS-Proteins in die Zellmembran verantwortlich sind, identifiziert, um die fehlerhafte Lokalisation des NIS-Proteins als Ursache für die fehlende Funktion des Symporters zu untersuchen. Hierbei stellte sich heraus, dass das Cysteinyl-tRNA-Synthetase-Gen bei dem Einbau des Proteins in die Zellmembran eine wichtige Rolle spielt.

Allerdings konnte der Zusammenhang nur in Östrogenrezeptor-sensitiven Mammakarzinom-Subtypen beobachtet werden. Demnach könnte der Grad des Einbaus von NIS in die Zellmembran und die damit verbundene immunhistochemische Darstellbarkeit des Proteins je nach Art des Mammakarzinoms variieren. Außerdem ist zu beachten, dass bisher keine standardisierte Nachweismethode zur Bestimmung der Expressionsrate von NIS-exprimierenden Zellen beschrieben wurde, so dass die Ergebnisse je nach verwendeter Methode variieren können. Auf diese Weise wurden ebenfalls in den hier beschriebenen Versuchen abhängig von der gewählten Methode zur immunologischen Bestimmung der NIS-Expressionsrate zum Teil erhebliche Unterschiede beobachtet. Im Rahmen der Immunfluoreszenz wurden ca. 20% aller Zellen zum Nachweis des Proteins gefärbt, bei der immunhistochemischen Färbung betrug die Expressionsrate ca. 10%. Die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Empfindlichkeit der Färbungen entstehen. Während die Empfindlichkeit einer immunhistochemischen Färbung sehr hoch ist und eine bis zu 100 000-fache Substratmenge pro Minute durch die verwendeten Enzyme umgesetzt wird, können die im Rahmen einer Fluoreszenzfärbung gefärbten Strukturen häufig schwieriger bestimmten Zellkompartimenten zuzuordnen sein, was die Interpretation der Ergebnisse erschweren kann. Ähnliche Ergebnisse wurden von Sui et al. (94) im Rahmen der Bestimmung der Expressionsrate des Her2-Proteins in Mammakarzinomzellen beobachtet. Da zudem in den meisten Publikationen nicht die Menge der durchschnittlichen Werte von NIS-exprimierenden Zellen innerhalb einer Probe, sondern das grundlegende Vorhandensein von NIS-exprimierenden Zellen in untersuchten Gewebetypen beschrieben wurden, war es bei den hier beschriebenen Versuchen nicht möglich oder sinnvoll, einen Mindestprozentsatz an NIS-exprimierenden Zellen für die weiteren Untersuchungen zu voraussetzen. Um solche Fragestellungen im Mammakarzinomgewebe zu untersuchen und zu vervollständigen, müssen die biochemischen Prozesse, die zur NIS-Expression, -Regulation, zum transmembranären Einbau und der damit zusammenhängenden physiologischen Funktion des Proteins zunächst im gesunden, NIS-exprimierenden Gewebe vollständig charakterisiert werden. Ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Expressionsrate einzelner Zellverbände und der später durchgeführten Radioiodtherapie konnte in der Literatur nach bestem Wissen nicht gefunden werden.

Der alleinige Nachweis der NIS-Expression in den untersuchten Zellen bedeutet noch keinesfalls, dass das Protein dort seine physiologische Funktion erfüllt. Um eine Radioiodtherapie an extrathyreoidalen Tumorzellen durchzuführen, muss der Symporter nicht nur in die Zellmembran eingebaut werden, sondern entsprechend der Prozesse im Schilddrüsengewebe das Radiopharmakon sekundär-aktiv in die Zellen aufnehmen. Um die

Funktion des Proteins zu überprüfen, wurden die NIS-transfizierten und nativen Zellen auf ihre Fähigkeit zur Iodaufnahme hin überprüft. Dies erfolgte über die Messung des Radioaktivzerfalls (Zerfallsrate pro Minute) mit dem Radioaktivversuch nach Weiss et al. (50). Dabei wurden NIS-exprimierende MCF7-Klone nativen MCF7-Zellen bezüglich der Iodaufnahme gegenübergestellt. Die Spezifität der NIS-vermittelten Iodaufnahme wurde durch den Zusatz eines kompetitiven NIS-Inhibitor nach Carrasco et al (22) bestätigt. NIS-transfizierte Zellen zeigten gegenüber nativen MCF7-Zellen eine bis zu 34-fach höhere Iodaufnahme.

Die Ergebnisse dieser Versuche bestätigen die Symporterfunktion des Proteins *in vitro*. Bei der Bestimmung der Radioiodaufnahme war jedoch zu beachten, dass das Iodid rasch aus den Zellen diffundiert und das nicht von den Zellen aufgenommene Radiopharmakon in einem zeitkritischen Schritt mit dem Ausspülen der Wells entfernt wurde. Methodisch bedingte, geringfügig abweichende Zeitintervalle konnten demnach zu systematischen Unstimmigkeiten führen. Um die Fehlerquelle möglichst gering zu halten, wurde der zeitkritische Schritt von zwei Personen durchgeführt. Ähnliche Ergebnisse wurden von Gärtner et al. (87) bei der Messung der endogenen Iodidaufnahme in Mammakarzinom- (EMT6), Rektumkarzinom- (CMT93) und Lungenkarzinomzellen (CMT64) beobachtet. Die Funktion des NIS wurde bis zum Beginn der Tierversuche kontinuierlich überprüft. Das in Vorversuchen angewendete Selektionsantibiotikum Zoecin wurde den Versuchstieren nicht verabreicht und beeinflusste demnach nicht die NIS-Expression der Tumorzellen.

5.2. Stimulation der NIS-Expression mit atRA

Die konventionelle Therapie bei Schilddrüsenkarzinomen besteht in der chirurgischen Resektion des erkrankten Gewebes und der anschließenden Radioiodtherapie mit dem Ziel der Zerstörung des verbliebenen Tumorgewebes sowie etwaiger Metastasen. Im Laufe der Therapie kann es jedoch zur Bildung von Resistenzen kommen, so dass das Iodid von den Tumorzellen nicht mehr aufgenommen wird. Zudem reicht die NIS-Expression der Schilddrüsenkarzinome häufig nicht aus, um mit der Radioiodtherapie als alleiniger Therapiemodalität den gewünschten Therapieeffekt zu erzeugen (95). Hierfür müsste die NIS-Expression deutlich erhöht, sowie der Iod-Efflux nach Radioiodgabe verzögert werden. Sollte eine ausreichende Stimulation der NIS-Expression in den Tumorzellen gelingen, wäre neben der Therapie mit Radioiodid zusätzlich auch die simultane Anwendung von diagnostischen, bildgebenden Verfahren wie der Szintigraphie möglich (37, 96).

Der in dieser Arbeit vorgestellte Versuchsaufbau orientiert sich an den Ergebnissen von Schmutzler et al. (97-99) bei denen erstmals die regulatorische Funktion von atRA bei Schilddrüsenkarzinomzellen nachgewiesen wurde. Bei fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinomen wurde eine verringerte Iodidaufnahme durch eine beeinträchtigte NIS-Funktion beobachtet. Eine atRA-induzierte Modulation der Zellen im Rahmen einer Redifferenzierung bewirkte bei einer Gruppe von 50 Patienten mit nicht behandelbaren Schilddrüsentumoren nach 5 Wochen bei 21 Patienten eine Iodidaufnahme im Tumorgewebe. Ein Jahr später konnte von der gleichen Arbeitsgruppe eine reinduzierte Iodidaufnahme durch eine atRA-stimulierte NIS-Expression an FTC 238-Zellen nachgewiesen werden (100). Diese Befunde eröffnen neue Möglichkeiten der Behandlung schwer therapierbarer Tumorentitäten der Schilddrüse. Hierbei stellt sich die Frage nach dem therapeutischen Einsatz der atRA-Behandlung bei weiteren Tumorarten, wie der in dieser Arbeit beschriebenen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7. Neben der reinduzierten Iodidaufnahme konnte zudem eine durch Apoptose und anschließende Hemmung der DNA-Synthese induzierte zusätzliche Wachstumshemmung der Schilddrüsenkarzinomzellen nach einer atRA-Behandlung von Elisei et al. (101) beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe um Elisei et al. (101) konnte zwar keine vermehrte Iodidaufnahme der atRA-behandelten Zellen beobachten, dies könnte jedoch daran liegen, dass die Funktion der RAR-Rezeptoren bei undifferenzierten Tumorzellen beeinträchtigt sein kann. Auch in den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen konnte durch eine atRA-Behandlung nativer MCF-7-Zellen keine statistisch signifikante vermehrte Iodid-Aufnahme beobachtet werden. Die Arbeitsgruppe von Jeong et al. (102) konnte wiederum eine 6,5-fach erhöhte Aufnahme von Radioiodid in humanen anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen durch eine atRA-Behandlung nachweisen. Die Arbeitsgruppe von Zhang et al. (103) untersuchte die Effekte einer Kombinationstherapie aus atRA und Tributtersäureglycerinester, der physiologischerweise die Zellproliferation von Magen- und Darmkrebszellen verhindert, auf humane follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen. Die Behandlung ermöglichte *in vitro* eine erhöhte NIS-Expression, eine Radioiodaufnahme sowie die Hemmung der Proliferation der Tumorzellen. Bei den ersten *in vivo*-Untersuchungen von Tang et al. (104) konnte bei den schlecht therapierbaren, zur Metastasierung und Bildung von Tumorrezidiven neigenden medullären Schilddrüsenkarzinomzellen eine atRA-induzierte erhöhte NIS-Expression beobachtet werden. Bei den weiteren *in vivo*-Untersuchungen an undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomzellen von Lan et al. (105) konnte ebenfalls eine 3,5-fach erhöhte Iodidaufnahme nachgewiesen werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse stellten die Grundlage für die weiteren Untersuchungen der atRA-Behandlung weiterer Tumorzellen,

die über die NIS-Expression zur Iodidaufnahme fähig waren, dar. Auf die möglichen Ursachen der in dieser Arbeit dargestellten lediglich geringfügigen Erhöhung der NIS-Expression nativer MCF-7-Zellen durch eine atRA-Behandlung wird im Folgenden eingegangen.

Die Radioiodtherapie als alleinige Therapiemaßnahme zur Behandlung von Mammakarzinomen erscheint im Vergleich zu den oben beschriebenen Tumorentitäten der Schilddrüse gegenwärtig nicht zielführend, da die Menge des exprimierten NIS in den Mammakarzinomzellen deutlich geringer ist als in den Tumorzellen der Schilddrüse (32). Die Modulation des Zellwachstums bei Tumorzellen durch Regulation der Zelldifferenzierung durch atRA als nachgewiesenen NIS-Stimulator könnte theoretisch sowohl die NIS-Expression erhöhen als auch das Wachstums der Tumorzellen hemmen und damit eine Anwendung in Tumorthherapie und –diagnostik sowohl bei Schilddrüsen- als auch Mammakarzinomen ermöglichen (So et al. (106), Kogai et al. (24, 95, 107)). Es wurden einige Ergebnisse zur atRA-Behandlung an Mammakarzinomzellen beschrieben, die zu dem o.g. Versuchsaufbau beitragen. Die Arbeitsgruppe von Kogai et al. (63) konnte die NIS-stimulierende Wirkung der atRA-Behandlung mit einer bis zum 9,4-fach erhöhten Iodidaufnahme bei MCF-7-Zellen bestätigen. Gleichzeitig wurde ein verzögerter Iodid-Efflux beobachtet. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte im Jahr 2004 *in vivo* in Maus-Xenograft-Modellen eine um das 15-fache erhöhte Iodidaufnahme der MCF-7-Zellen bei einer atRA-Behandlung ohne signifikante Beeinflussung anderer Organe beobachten (60). Die Ergebnisse konnten in den hier beschriebenen Versuchen mit alleiniger atRA-Behandlung der nativen MCF-7-Zellen nicht bestätigt werden. Die Iodidaufnahme der nativen Mammakarzinomzellen erhöhte sich kaum. Interessanterweise bewirkte die atRA-Behandlung NIS-transfizierter MCF-7-Zellen gegenüber unbehandelter NIS-transfizierter MCF-7-Zellen eine Erhöhung der Iodidaufnahme um ca. 10%. Ein solcher Unterschied zwischen nativen und NIS-transfizierten MCF-7-Zellen wurde nach bestem Wissen nicht in der Literatur beschrieben. Lediglich die Arbeitsgruppe von Elisei et al. (101) konnte eine fehlende NIS-Stimulation nach einer atRA-Vorbehandlung bei Karzinomzellen beobachten. Hierbei handelte es sich jedoch um Schilddrüsen- und nicht um Mammakarzinomzellen. Für die fehlende NIS-Expression wurde die eingeschränkte Funktion der RAR-Rezeptoren, die durch Dedifferenzierungsprozesse bei der Karzinogenese entstanden ist, verantwortlich gemacht. Bei den MCF-7-Zellen handelt es sich jedoch um Tumorzellen, bei denen eine beeinträchtigte RAR-Funktion bisher selten beobachtet werden konnte.

Um die geringfügige NIS-Stimulation der nativen MCF-7-Zellen durch die atRA-Behandlung zu erklären, wurden die in der Literatur beschriebenen Signalkaskaden und -wege, die zur NIS-

Expression bzw. zur Stimulation der atRA-induzierten NIS-Expression führen, analysiert. Zudem wurde auf die Anwendung unterschiedlicher Agenzien in Kombination mit atRA sowie die genaue Charakterisierung der Unterschiede bei der NIS-Expression zwischen den Vorgängen in den Schilddrüsen- und Mammakarzinomzellen eingegangen.

Im Jahr 2007 konnte eine Adenovirus-vermittelte NIS-Expression in MCF-7-Zellen durch die atRA-Behandlung gesteigert und die Radioiodidaufnahme um das 27-fache gegenüber nativer MCF-7-Zellen erhöht werden (108). In dem hier beschriebenen Versuch konnte die Iodidaufnahme der atRA-stimulierten, NIS-transfizierten Zellen gegenüber nativer MCF-7-Zellen um das 18,4-fache erhöht werden. Die hohe NIS-Expression, die von Lim et al. (108) beschrieben worden ist, konnte zwar nicht erreicht werden, auch wenn die Tendenz zur erhöhten Iodidaufnahme atRA-behandelter, NIS-transfizierter Zellen bestätigt werden konnte. Im Jahr 2006 konnte Dohan et al. (109) die stimulierende Wirkung von Hydrokortison auf die atRA-vermittelte NIS-Expression bei MCF-7-Zellen mit einer 2-fach erhöhten Iodidaufnahme belegen. Gleichzeitig wurden die Unterschiede der NIS-Stimulation zwischen Schilddrüsen- und Mammakarzinomzellen untersucht. Hierbei wurde nachgewiesen, dass die hohe intrazelluläre Iodid-Konzentration, die zur Hemmung der NIS-Expression in den Schilddrüsenzellen führt, keine Auswirkung auf die NIS-Expression in MCF-7-Zellen hat (109). Demnach kann eine hohe Iodid-Konzentration nicht zu einer Hemmung der NIS-Expression in MCF-7-Zellen führen. Im Jahr 2008 konnte *in vitro* die Stimulation der NIS-Expression über den PI3K-Signalweg sowie den IGF1-Rezeptor beobachtet werden (110). Zu ähnlichen *in vitro* Ergebnissen kamen auch Ohashi et al. (61). Auf intramolekularen Ebene konnte ein Enhancer im ersten Intron des NIS-Moleküls für die direkte Regulierung der atRA-Rezeptoren RAR (retinoic acid receptor) und RXR (retinoic x receptor) und die damit zusammenhängende atRA-Stimulation der NIS-Expression charakterisiert werden (111). Die Arbeitsgruppe von Willhauck et al. (112) knüpfte an diese Ergebnisse an und untersuchte den Einfluss von atRA auf MCF-7-Zellen in Kombination mit Carbamazepin, das den PXR (pregnane x-receptor) aktiviert und über einen Zwischenschritt Heterodimere mit RXR und RAR bildet. Die Inkubation mit beiden Stimulantien führte zur einer doppelt so hohen Iodidaufnahme. Durch die Kombinationstherapie aus atRA und Carbamazepin konnte zudem die Zytotoxizität der Radioiodtherapie von 20% (Zellen unter alleiniger atRA-Behandlung) auf 50% erhöht werden. Damit wurde Carbamazepin als ein wirksamer Stimulator der atRA-induzierten NIS-Expression beschrieben. Diese Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Funktion der RA- bzw. RX-Rezeptoren der in diesem Versuch verwendeten MCF-7-Zellen beeinträchtigt sein könnte. Ähnliche Ergebnisse beschrieb die Arbeitsgruppe von Farias et al.,

(113) bei denen eine verminderte Expression von RAR in MCF-7-Zellen nachgewiesen worden ist. Ebenso könnte eine atRA-Resistenz während der Karzinogenese der MCF-7-Zellen zu einer verminderten Iodidaufnahme führen. Ein solcher Zusammenhang konnte von Schug et al. (114) in *in vivo*-Untersuchungen an MMTV-neu (Maus-Mammatumovirus tragend) beschrieben werden. Eine weitere Erklärung für die geringe Iodidaufnahme der atRA-behandelten, nativen MCF-Zellen könnte eine fehlende bzw. zu geringe Versorgung der Zellen mit Östrogen darstellen. Erst in den *in vivo*-Untersuchungen wurden den Versuchstieren Östrogenpellets appliziert. In den vorangegangenen *in vitro*-Versuchen erhielten die Zellen keine zusätzlichen Östrogenzusätze. Den Ergebnissen von Lu et al. (115) zufolge kann eine zu geringe Östrogenzufuhr der Zellen zu einer Downregulation von RAR führen, was die geringe Iodidaufnahme der MCF-7-Zellen im *in vitro*-Versuch erklären könnte. Zu ähnlichen Ergebnissen kam die Arbeitsgruppe von Ryan et al. (116). Hierbei konnte in weiteren *in vitro*-Untersuchungen am gesunden Brustdrüsengewebe sowie an benignen und malignen Mammakarzinomzellen die erhöhte NIS-Expression nach einer atRA-Behandlung in Kombination mit Estradiol und Thyroxin nachgewiesen werden. Bei diesen Untersuchungen wurde nicht nur die wichtige Rolle des Estradiols bei der atRA-Stimulation der NIS-Expression nachgewiesen, sondern zudem die potenzielle regulatorische Funktion vom Schilddrüsenhormon Thyroxin im Mammakarzinomgewebe bestätigt.

Den dargestellten Ergebnissen zufolge können die o.g. Stimulantien einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der Expressionsrate von NIS bzw. auf die Stimulierbarkeit der Expression durch die atRA-Behandlung haben. Es konnte kein eindeutiger Grund für die geringe Stimulation der nativen MCF-7-Zellen durch die atRA-Behandlung gefunden werden. Nach bestem Wissen konnte ebenfalls kein ähnlicher Zusammenhang zwischen der geringen Stimulation der nativen MCF-7-Zellen gegenüber derjenigen der NIS-transfizierten MCF-7-Zellen in der Literatur gefunden werden.

5.3 Stimulation der NIS-Expression mit DEXA

Der therapeutische Effekt der Radioiodtherapie ist nur bei ausreichender NIS-Expression erzielbar. Um eine möglichst wirksame Stimulation der NIS-Expression zu erhalten, wurde eine bereits in mehreren Publikationen beschriebene gleichzeitige Anwendung von atRA in Kombination mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason (DEXA) untersucht.

Die Kombinationsbehandlung aus atRA und DEXA zeigte bei der NIS-transfizierten MCF-7-Zelllinie die maximal mögliche Iodidaufnahme. Bei nativen MCF-7-Zellen konnte keine statistisch signifikante Erhöhung der Iodidaufnahme beobachtet werden. Dies widerspricht den von Kogai et al. (62) beschriebenen Ergebnissen von *in vitro* Untersuchungen der Kombinationsbehandlung nativer MCF-7-Zellen. Die erhöhte Iodidaufnahme erklärte die Arbeitsgruppe von Kogai et al. in der verlängerten Halbwertszeit der NIS-mRNA. Damit ergab sich ein verbesserter Therapieeffekt bei gleichzeitiger Radioiodidgabe. Ebenfalls zeigten die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppe eine signifikante Stimulation der atRA-induzierten NIS-Expression durch DEXA sowie eine erhöhte selektive Zytotoxizität (67, 117). Nach der Inkubation der Zellen im Kombinationsmedium erhöhte sich die Expression von NIS, ähnlich der hier beschriebenen Ergebnisse der transfizierten Zellen, um das 11-fache. Gleichzeitig verlängerte sich die Iodidakkumulationszeit um das 3-bis 4-fache. Die Zytotoxizität erhöhte sich entsprechend von 17% bei alleiniger atRA-Behandlung auf 80% bei einer Kombinationsbehandlung aus atRA und DEXA (67). Bei der ersten *in vivo* Studie an MCF-7-Zellen mit der Kombinationsbehandlung aus atRA und DEXA beschrieb Willhauck et al. (118) eine signifikante Verbesserung der Stimulation der NIS-Expression bei gleichzeitiger vermehrter Iodidakkumulation. Die Studie von Willhauck et al. (112) ging sogar über den oben beschriebenen Versuchsaufbau hinaus und untersuchte zusätzlich die Wirkung von Carbamazepin auf die Kombinationsbehandlung aus atRA und DEXA an MCF-7-Zellen. Die atRA/Dexa-stimulierte NIS-Expression konnte durch die Gabe von Carbamazepin noch einmal um das 1,5-fache erhöht werden, während eine alleinige Behandlung mit Carbamazepin keinen Effekt auf die funktionelle NIS-Expression hatte. Die Zytotoxizität der Kombinationsbehandlung betrug bis zu 90%, sodass die Kombinationstherapie aus atRA, DEXA und Carbamazepin auch in der Zukunft bei der NIS-Stimulation der Tumorzellen denkbar sein könnte.

Bei den NIS-transfizierten MCF-7-Zellen konnte die Iodidaufnahme durch die Vorbehandlung mit atRA/DEXA gegenüber unbehandelten, transfizierten MCF-7-Zellen um das 1,6-fache erhöht werden. Gegenüber atRA-vorbehandelten, NIS-transfizierten MCF-7-Zellen konnte die

Iodidaufnahme um das 1,4-fache erhöht werden. Damit war die Kombinationsbehandlung mit atRA/DEXA an NIS-transfizierten MCF-7-Zellen am effektivsten. Gegenüber nativen unbehandelten MCF-7-Zellen konnte sogar eine 25,9-fach erhöhte Iodidaufnahme erreicht werden. Eine so wirksame NIS-Stimulation der Mammakarzinomzellen könnte im weiteren Verlauf der Behandlung *in vivo* zu einem therapeutischen Effekt der Radioiodtherapie führen. Das Einbringen der NIS-transfizierten Zellen *in vivo* in die damit zusammenhängende Gentherapie bzw. die Anregung körpereigener Zellen zur NIS-Expression muss jedoch zwingend weiter untersucht werden.

5.4 Iodid-Efflux

Die erhöhte NIS-Expression und die damit zusammenhängende verstärkte Iodidaufnahme der behandelten Zellen führte zu der Frage nach den Auswirkungen der Vorbehandlung auf die Retentionszeit des Radiopharmakons. In einem Iod-Efflux-Versuch wurden die nativen, die atRA/DEXA-vorbehandelten, die NIS-transfizierten und die NIS-transfizierten und atRA/DEXA-vorbehandelten MCF-7-Zellen zu bestimmten Zeitpunkten nach Radioiodgabe auf die Höhe der Zerfallsrate hin untersucht. Zudem wurde die Auswirkung von DIDS auf die Zelllinien überprüft. In diesem Versuch konnte eine Erhöhung der Iodaufnahme durch die atRA/DEXA-Behandlung der nativen MCF-7-Zellen beobachtet werden. Wie in Abbildung 14 gezeigt, konnte nach dem Ablauf der Versuchszeit die höchste Zerfallsrate pro Minute bei den NIS-transfizierten, atRA/DEXA-vorbehandelten MCF-7-Zellen, gefolgt von NIS-transfizierten MCF-7-Zellen, den atRA/DEXA-vorbehandelten MCF-7-Zellen und nativen MCF-7-Zellen beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die alleinige Behandlung der nativen MCF-7-Zellen mit atRA/DEXA die Iodaufnahme erhöht und damit die Retentionszeit verlängert, die Höhe der Zerfallsrate der NIS-transfizierten bzw. NIS-transfizierten, atRA/DEXA-vorbehandelten Zellen jedoch nicht erreicht. Trotz der durch die erhöhte Iodidaufnahme verlängerten Retentionszeit konnte ein rasches Herausströmen des Radiopharmakons aus den Zellen beobachtet werden. Nach 45 min ergab bei den atRA/DEXA-vorbehandelten nativen MCF7-Zellen die Zerfallsrate 44% des zu Beginn des Versuchs aufgenommenen Iods, bei den NIS-transfizierten MCF-7-Zellen 18,4%, bei NIS-transfizierten, atRA/DEXA-vorbehandelten MCF-7-Zellen 8,3%. Um einen therapeutischen Effekt des Radiopharmakons und die gewünschte DNA-Schädigung der Tumorzellen zu erzielen, muss jedoch die Retentionszeit stabil und voraussagbar verlängert werden können. Um den Iodid-Efflux zusätzlich zu verzögern und die Wirkung des Radiopharmakons auf die Zellen zu verstärken, wurde in einem

weiteren Schritt die Wirkung des Anionkanalblockers DIDS (4,4'-Diisothiocyano-2,2'-Stilbenedisulfonsäure) untersucht.

Bei NIS-transfizierten MCF-7-Zellen konnte die maximal mögliche Iodidaufnahme überraschenderweise durch eine atRA/DEXA-Vorbehandlung erreicht werden. Durch den DIDS-Zusatz verringerte sich die maximal mögliche Iodidaufnahme um ca. 25%. Nach 45 min konnte nur eine sehr geringe, therapeutisch nicht mehr wirksame Menge an Radioiod und kein signifikanter Unterschied der Zerfallsrate durch eine DIDS-Behandlung unter den untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Damit konnte keine Verlängerung der Iodretentionszeit durch DIDS nachgewiesen werden. Lediglich bei den nativen MCF-7-Zellen konnte durch eine DIDS-Behandlung die Iodidaufnahme deutlich gesteigert werden.

Der beschriebene Versuchsaufbau orientierte sich an den in der Literatur bereits beschriebenen DIDS-Ergebnissen. Bereits im Jahr 2002 konnte die Arbeitsgruppe von Min et al. (119) die Iodidaufnahme bei NIS-transfizierten Kolonkarzinomzellen (SNU-C5) durch die Behandlung mit DIDS um das 2,35-fache erhöhen. Der Iodid-Efflux betrug jedoch innerhalb von 10 min 70%. Damit konnte eine vermehrte NIS-Expression, aber keine Verlängerung der Iodidretentionszeit nachgewiesen werden. Auch die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen eine ähnliche Tendenz. Ein Jahr später beschrieb Sieger et al. (120) die Wirkung von DIDS an NIS-transfizierten Hepatomzellen (MH3924A) *in vitro* und *in vivo* und verglich die Ergebnisse mit dem Verhalten nativer Tumorzellen. NIS-transfizierte Zellen zeigten eine bis zu 30-fach höhere Iodidaufnahme. Eine Behandlung mit DIDS erhöhte die Iodidaufnahme zusätzlich um 87%. Eine verlängernde Wirkung des Kanalblockers auf die Retentionszeit des Radiopharmakons wurde nicht beschrieben. Auch wenn die Radioiodaufnahme der in diesem Versuch beschriebenen MCF-7-Zellen nicht so stark erhöht werden konnte wie bei den Hepatomzellen, so zeigte die DIDS-Behandlung ähnlich der von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Ergebnisse keine Verlängerung der Retentionszeit (119,120). Im Jahr 2003 wurden von Rillema et al. (121) zum ersten Mal MCF-7-Zellen auf die Wirkung von DIDS hin untersucht. Hierbei wurde überraschenderweise eine Hemmung der Iodidaufnahme der MCF-7-Zellen beobachtet. Dieser Zusammenhang widerspricht den in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen. Die (in dieser Arbeit nicht aufgetretene) Verlängerung der Iodretentionszeit wurde wiederum von der Arbeitsgruppe um Manley et al. (122) im Jahr 2005 beschrieben. In dieser Publikation konnte durch die DIDS-Behandlung der humanen Chorionkarzinomzellen der Iodid-Efflux verringert werden. Im Jahr 2006 konnte die Halbwertszeit des Radioiods an NIS-transfizierten, humanen anaplastischen (FRO)- und medullären (TT)

Schilddrüsenkarzinomzellen von Elisei et al. (76) untersucht werden. Bei den FRO-Zellen betrug die Halbwertszeit 9 min, bei den TT-Zellen 20 min. Durch den DIDS-Zusatz konnte die Iodretentionszeit bei den FRO-Zellen, nicht aber bei den TT-Zellen verlängert werden. Lindencrona et al. (123) haben schließlich die Wirkung von TSH, EGF und DIDS an Schilddrüsenepithelzellen untersucht. Bei dem Versuchsaufbau wurden die Zellen 48 Stunden vor dem Versuchsbeginn mit TSH oder EGF vorbehandelt. TSH führte zu einer Stimulation, EGF zu einer verminderten ^{211}At -Aufnahme. Durch die Anwendung von DIDS konnte ein reduzierter Efflux und eine erhöhte ^{211}At -Aufnahme in TSH-stimulierten Zellen beobachtet werden. Bei den Untersuchungen der EGF-vorbehandelten Zellen zeigte die DIDS-Anwendung jedoch einen gegenteiligen Effekt, reduzierte die Aufnahme von ^{211}At und beschleunigte den Efflux des Radiopharmakons.

Die Zusammenhänge und die genauen Wirkmechanismen des Anionkanalblockers in nativen und NIS-transfizierten Zellen sind demnach noch nicht völlig geklärt und charakterisiert. Unterschiedliche und teilweise widersprüchliche Ergebnisse sind nicht durch abweichende Konzentrationen der verwendeten Zusätze (atRA, DEXA, DIDS) oder Zellkulturbedingungen zu erklären. Um die molekularbiologischen Zusammenhänge zu entschlüsseln und sichere Prognosen für eine therapeutische Anwendung der beschriebenen Agenzien stellen zu können, bedarf es noch weitreichender und aufwändiger Forschung auf diesem Gebiet.

5.5 Immunhistologie

Bei der histologischen Untersuchung der zwei Tumorproben der NIS-transfizierten MCF-7-Zellen konnten nach Radioiodtherapie einzelne apoptotische Zellen innerhalb der Zellverbände nachgewiesen werden. Bei der DIDS-Probe ist jedoch ein im Tumor zentral gelegener, ausgedehnter nekrotischer Bereich erkennbar. Der Tumor scheint demnach bereits 9 Tage nach der Radioiodbehandlung von der Mitte aus zu zerfallen. Es kann nicht sicher bestätigt werden, ob die Nekrose durch die DIDS-Blockade des Iodid-Efflux entstanden ist. Um eine genauere Prognose stellen zu können, wären noch zahlreiche weitere Untersuchungen notwendig. Nichtsdestotrotz ist die histologische Abweichung von den Tumoren ohne DIDS-Behandlung beachtlich. Dabei stellt sich die Frage, weshalb eine solche Wirkung bez. des Iodid-Efflux nicht in den *in vitro*-Versuchen dargestellt werden konnte, bzw. ob die Tumornekrose nicht doch lediglich durch die DIDS-induzierte, vermehrte NIS-Expression der Zellen und die damit zusammenhängende verstärkte Wirkung des Radioiods entstanden ist. Nicht außer Acht gelassen werden sollten hierbei die widersprüchlichen Angaben zur DIDS-Behandlung in der Literatur, die die Auswertung der Ergebnisse erschweren. Möglicherweise ist der Iodid-Efflux mit dem Versuch nach Weiss et al. (78) schlecht detektierbar und bedarf einer anderen Nachweismethode. Sollte doch die vermehrte NIS-Expression durch die DIDS-Behandlung zum therapeutischen Erfolg geführt haben, sollte wiederum beachtet werden, dass in den *in vitro*-Versuchen die NIS-transfizierten, atRA/DEXA-vorbehandelten Zellen eine höhere NIS-Expressionsrate aufwiesen als die Zellen mit der zusätzlichen DIDS-Behandlung. Demnach müssten größere Tumorschäden an den atRA/DEXA-vorbehandelten NIS-Tumoren nach der Radioiodtherapie zu erwarten sein. Sollte entgegengesetzt der in dieser Arbeit dargestellten *in vitro*-Ergebnisse die DIDS-Behandlung zu einer erhöhten NIS-Stimulation NIS-transfizierter Mammakarzinomzellen führen, ergibt sich die Frage nach einer atRA/DEXA/DIDS-Behandlung, um einen therapeutischen Effekt durch die Radioiodtherapie zu erzeugen. Auf diese Weise könnte durch die orale Gabe der Agenzien der Erfolg der Radioiodtherapie sowohl an nativen als auch an NIS-transfizierten Tumoren ermöglicht oder deutlich verbessert werden.

Obwohl keine histologische Probe eines nativen MCF-7-Tumors nach der Radioiodtherapie erhalten werden konnte, sprechen die *in vitro*-Untersuchungen dafür, dass durch die NIS-Stimulation über eine atRA/DEXA/DIDS-Vorbehandlung eine vergleichbare Iodaufnahme wie bei den unbehandelten NIS-transfizierten MCF-7-Zellen beobachtet werden könnte. Eine solche Vorbehandlung der Tumorzellen (z.B. über die orale Gabe der Agenzien) könnte demnach unbestritten zu einem verbesserten therapeutischen Effekt führen, auch wenn die

maximal erreichbaren Iod-Werte der atRA/DEXA-vorbehandelten, NIS-transfizierten Zellen im *in vitro*-Versuch nicht erreicht werden konnten.

6. Zusammenfassung

Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) ist ein körpereigenes Protein, dessen Funktion bei der Bildgebung und Behandlung von Schilddrüsenerkrankungen genutzt wird. Das erfolgreiche Einbringen des NIS-Gens in extrathyreoidale Tumore führt demnach auch in diesen Geweben zur Iodid-Aufnahme und -Akkumulation. Damit ist sowohl die Durchführung der Radioiodtherapie als auch gezielte Bildgebung der NIS-transfizierten Tumorzellen möglich.

Die Fragestellung beinhaltet das Einbringen von NIS als Reporter- und therapeutisches Gen in humane Mammakarzinomzellen MCF-7. Die NIS-Expression wurde dabei entweder über Gentherapie oder mittels einer Anwendung von all-trans-Retinolsäure (atRA) in Kombination mit dem synthetischen Glucocorticoid Dexamethason (DEXA) induziert. Zudem sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine Kombinationstherapie aus radioaktivem Iod und dem Anionkanalblocker DIDS bezüglich der Retentionszeit des radioaktiven Iods zeigt.

Die Aufnahme und die Retentionszeit des Iods wurden mithilfe eines Radioaktivversuchs *in vitro* untersucht. Die *in vivo*-Untersuchungen erfolgten im etablierten Maus-Xenograftmodell. Eine histologische Untersuchung der aus den Versuchstieren entnommenen Proben nach der Radioiodtherapie sollte etwaige morphologischen Gewebeveränderungen im Tumorgewebe aufzeigen.

Durch die Transfektion des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) in Mammakarzinomzellen und das damit verbundene Einbringen des Proteins in extrathyreoidales Tumorgewebe konnte die Fähigkeit der behandelten Zellen zur Iodidaufnahme bestätigt werden. Das NIS-positive Tumorgewebe konnte zudem über die SPECT-Bildgebung *in vivo* dargestellt und eine Radioiodtherapie durchgeführt werden. Der Erfolg der Radioiodbehandlung ist aufgrund der wenigen erhaltenen Tumorproben nicht zweifelsfrei nachweisbar. Durch die Kombinationsbehandlung mit DIDS konnte *in vivo* im Gegensatz zu den *in vitro*-Ergebnissen ein verbesserter therapeutischer Effekt histologisch nachgewiesen werden.

Die Notwendigkeit des externen Einbringens des NIS-Gens könnte bei einer erfolgreichen oralen Gabe von atRA/DEXA/DIDS entfallen. Ob ein therapeutischer Effekt durch eine solche Behandlung erzielbar ist, muss jedoch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

7. Abstract

The sodium/iodide cotransporter (NIS) is an endogenous protein. Its function is used in the imaging and treatment of thyroid diseases. The successful transfer of NIS-gene into nonthyroidal tumors leads to iodine uptake and accumulation in these tissues. This allows both the radioiodine therapy and selective imaging of NIS-transfected tumor cells.

The central question of the dissertation focuses on the transfection of NIS as a reporter and therapeutic gene in human breast cancer cells MCF-7. NIS expression was induced either by gene therapy or by using all-trans retinoic acid (atRA) in combination with the synthetic glucocorticoid dexamethasone (DEXA). In addition, the effects of a combination therapy of radioactive iodine and the anion exchange inhibitor DIDS with regard to the retention time of the radioactive iodine were examined.

The uptake and retention time of the iodine were verified *in vitro*. The *in vivo* investigations were monitored in the established mouse xenograft model. A histological examination of the samples taken from the test animals after radioiodine therapy showed the morphological changes in the tumor tissue.

The ability of the treated cells to absorb iodide was confirmed by the transfection of the sodium iodide symporter (NIS) in breast cancer cells and the associated insertion of the protein into nonthyroid tumor tissue. The NIS-positive tumor tissue could also be visualized *in vivo* using SPECT imaging and radioiodine therapy could be carried out. Nevertheless, the success of radioiodine treatment is not fully detectable due to only few samples received. In contrast to the *in vitro* results, the combination treatment with DIDS *in vivo* verified an improved therapeutic effect in histological samples.

The necessity for external transfection of the NIS gene could be omitted by oral administration of atRA / DEXA / DIDS. However, further investigations must confirm whether a therapeutic effect can be achieved with such a treatment.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Sekundär-aktive Aufnahme von Iodid in die Schilddrüsenzellen (modifiziert nach (24)).	13
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Iodid-Stoffwechsels im menschlichen Körper (modifiziert nach (14)).	14
Abbildung 3: Die Sekundärstruktur des NIS (modifiziert nach (36)).	15
Abbildung 4: Inhibition des Iodid-Effluxes an Ratten-Schilddrüsenzellen FRTL5 durch den Anionkanalblocker DIDS (mod. nach (77)).	23
Abbildung 5: Etablierung des Maus-Xenograftmodells	38
Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung der MCF-7-Zellen	43
Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie zum Nachweis NIS-exprimierender Zellen	45
Abbildung 8: Isotypenkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Färbung	46
Abbildung 9: Fluoreszenzmikroskopie der mit atRA/DEXA vorbehandelten, NIS-transfizierten MCF-7-Zellen zum Nachweis NIS-exprimierender Zellen	47
Abbildung 10: In vitro Iodidaufnahme von nativen und NIS-transfizierten Tumorzellen MCF-7 bei gleichzeitiger Behandlung mit $KClO_4$	48
Abbildung 11: In vitro Iodidaufnahme von nativen und NIS-transfizierten Tumorzellen MCF-7 bei gleichzeitiger Behandlung mit dem HBSS-Puffer	49
Abbildung 12: In vitro Iodidaufnahme von nativen und NIS-transfizierten Tumorzellen MCF-7	50
Abbildung 13: Stimulation der Iodid-Aufnahme in vitro durch Behandlung nativer und NIS-transfizierter MCF-7-Zellen mit atRA und der Kombination aus atRA/DEXA	52
Abbildung 14: Iodid-Efflux-Assay in vitro mit nativen und NIS-transfizierten Zellen unter atRA/DEXA- und DIDS-Behandlung. NIS-transfizierte MCF-7-Zelllinien stellen die Kontrollgruppe dar.	54
Abbildung 15: HE-Färbung der Tumorprobe (NIS-transfizierte MCF-7-Tumorzellen am 9. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie)	56
Abbildung 16: HE-Färbung der Tumorprobe (NIS-transfizierte MCF-7-Tumorzellen am 3. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie)	57
Abbildung 17: HE-Färbung der Tumorprobe (NIS-transfizierte, atRA/DEXA/DIDS-behandelte MCF-7-Tumorzellen am 7. Tag nach durchgeführter Radioiodtherapie)	58

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Regulation von NIS.....	21
------------------------------------	----

10. Literaturverzeichnis

1. Hertz S, Roberts A. Radioactive iodine in the study of thyroid physiology; the use of radioactive iodine therapy in hyperthyroidism. *J Am Med Assoc.* 1946;131:81-6.
2. Hertz S, Roberts A. Radioactive iodine in the study of thyroid physiology; the use of radioactive iodine therapy in Graves' disease. *West J Surg Obstet Gynecol.* 1946;54(12):474-86.
3. Keating FR, Jr. Radioactive iodine in the study and treatment of thyroid diseases. *Postgrad Med.* 1948;3(6):410-22.
4. Means JH. The use of radioactive iodine in the diagnosis and treatment of thyroid diseases. *Bull N Y Acad Med.* 1948;24(5):273-86.
5. Kelsey MP, Haines SF, Keating FR, Jr. Radioiodine in the study and treatment of thyroid disease; a review. *J Clin Endocrinol Metab.* 1949;9(2):171-210.
6. Yount E, Andrews JR, Jester AW. The use of radioactive iodine in the diagnosis and treatment of thyroid disease. *N C Med J.* 1952;13(9):466-70.
7. Grünwald FD, KM. Diagnostik und Therapie von Schilddrüsenerkrankungen. *Lehmanns Media Berlin.* 2014.
8. Pinke LA, Dean DS, Bergert ER, Spitzweg C, Dutton CM, Morris JC. Cloning of the mouse sodium iodide symporter. *Thyroid.* 2001;11(10):935-9.
9. Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, et al. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;226(2):339-45.

10. Reiners C. Radiojodtherapie Indikation, Durchführung und Risiken. Deutsches Ärzteblatt. 1993;90(45).
11. Grünwald F. Nuklearmedizinische Diagnostik und Therapie-Aktuelle Bedeutung für die klinische Medizin. Hessisches Ärzteblatt. 2001;3.
12. Kita T, Yokoyama K, Higuchi T, Kinuya S, Taki J, Nakajima K, et al. Multifactorial analysis on the short-term side effects occurring within 96 hours after radioiodine-131 therapy for differentiated thyroid carcinoma. Ann Nucl Med. 2004;18(4):345-9.
13. Bonnema SJ, Hegedus L. Radioiodine therapy in benign thyroid diseases: effects, side effects, and factors affecting therapeutic outcome. Endocr Rev. 2012;33(6):920-80.
14. Hotze LS-D, PM. Schilddrüsenkrankheiten - Diagnose und Therapie. Berliner Medizinische Verlagsanstalt. 2003.
15. Röhl T. Radiojodkinetik bei Radiojodtherapie der Schilddrüse-Vergleich von Test und Therapie, Vergleich verschiedener Berechnungsmethode, Restkörpersodis. Dissertation. 2010.
16. Hermann H. Nuklearmedizin. Elsevier Verlag. 2004.
17. Sauer R. Strahlentherapie und Onkologie. Urban & Firsch Verlag. 2003.
18. Schicha HS, O. Nuklearmedizin-Basiswissen und klinische Anwendung. Schattauer Verlag. 2007.
19. Avram AM. Radioiodine scintigraphy with SPECT/CT: an important diagnostic tool for thyroid cancer staging and risk stratification. J Nucl Med Technol. 2014;42(3):170-80.
20. Avram AM. Radioiodine scintigraphy with SPECT/CT: an important diagnostic tool for thyroid cancer staging and risk stratification. J Nucl Med. 2012;53(5):754-64.

21. Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*. 1996;379(6564):458-60.
22. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1154(1):65-82.
23. Wolff J. Transport of Iodide and Other Anions in the Thyroid Gland. *Physiol Rev*. 1964;44:45-90.
24. Kogai T, Taki K, Brent GA. Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13(3):797-826.
25. Eskandari S, Loo DD, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N. Thyroid Na⁺/I⁻ symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Biol Chem*. 1997;272(43):27230-8.
26. Ruf J, Carayon P. Structural and functional aspects of thyroid peroxidase. *Arch Biochem Biophys*. 2006;445(2):269-77.
27. Spitzweg C, Joba W, Schriever K, Goellner JR, Morris JC, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter immunoreactivity in human exocrine glands. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(11):4178-84.
28. Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, et al. The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. 2003;24(1):48-77.
29. Dohan O, Carrasco N. Advances in Na⁽⁺⁾/I⁽⁻⁾ symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;213(1):59-70.
30. Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M. Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol*. 1999;141(5):443-57.

31. Marine DLF, H. The absorption of potassium iodide by perfused thyroid glands and some of the factors modifying it. *J Pharmacol Exp Ther* 7. 1915(5):557-76.
32. Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T. Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J Endocrinol*. 2001;170(1):185-96.
33. Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology*. 1997;138(8):3555-8.
34. Morris JC, Bergert ER, Bryant WP. Binding of immunoglobulin G from patients with autoimmune thyroid disease to rat sodium-iodide symporter peptides: evidence for the iodide transporter as an autoantigen. *Thyroid*. 1997;7(4):527-34.
35. Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, et al. Characterization of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(11):5568-73.
36. Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem*. 1998;273(35):22657-63.
37. Spitzweg C, Morris JC. The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2002;57(5):559-74.
38. Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(5):1746-51.

39. Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zhao QH, et al. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med.* 2000;6(8):871-8.
40. Rillema JA, Yu TX, Jhiang SM. Effect of prolactin on sodium iodide symporter expression in mouse mammary gland explants. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279(4):E769-72.
41. Rillema JA, Rowady DL. Characteristics of the prolactin stimulation of iodide uptake into mouse mammary gland explants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997;215(4):366-9.
42. Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, et al. 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.* 2003;88(4):1880-8.
43. Damle AA, Narkar AA, Badwe RA. Radioiodide uptake and sodium iodide symporter expression in breast carcinoma. *Indian J Exp Biol.* 2011;49(6):416-22.
44. Rudnicka L, Sinczak A, Szybinski P, Huszno B, Stachura J. Expression of the Na(+)/I(-) symporter in invasive ductal breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol.* 2003;41(1):37-40.
45. Heil J, Fuchs V, Golatta M, Schott S, Wallwiener M, Domschke C, et al. Extent of primary breast cancer surgery: standards and individualized concepts. *Breast Care (Basel).* 2012;7(5):364-9.
46. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med.* 1998;339(14):974-84.
47. Chlebowski RT. Reducing the risk of breast cancer. *N Engl J Med.* 2000;343(3):191-8.

48. Dietrich J. Der Hypophysen-Schilddrüsen-Regelkreis. Entwicklung und klinische Anwendung eines nichtlinearen Modells. Logos-Verlag, Berlin. 2002.
49. Dietrich JT, A.; Pickardt, CR.; Mitzdorf U. . Thyrotropic Feedback Control: Evidence for an Additional Ultrashort Feedback Loop from Fractal Analysis. *Cybernetics and Systems*. 2004;06.
50. Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology*. 1984;114(4):1099-107.
51. Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev*. 1992;13(3):596-611.
52. Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology*. 1997;138(6):2227-32.
53. Spitzweg C, Heufelder AE, Morris JC. Thyroid iodine transport. *Thyroid*. 2000;10(4):321-30.
54. Heufelder AS, C. Pathogenese der immunogenen Hyperthyreose und endokrinen Orbitopathie. *Der Internist*. 1998;39(6):599-606.
55. Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, et al. Increased expression of the Na⁺/I⁻ symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(10):3331-6.
56. Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem*. 2001;276(24):21458-63.

57. Harii N, Endo T, Ohmori M, Onaya T. Extracellular adenosine increases Na⁺/I⁻ symporter gene expression in rat thyroid FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999;157(1-2):31-9.
58. Rillema JA, Collins S, Williams CH. Prolactin stimulation of iodide uptake and incorporation into protein is polyamine-dependent in mouse mammary gland explants. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;224(1):41-4.
59. De La Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Physiol Rev.* 2000;80(3):1083-105.
60. Kogai T, Kanamoto Y, Che LH, Taki K, Moatamed F, Schultz JJ, et al. Systemic retinoic acid treatment induces sodium/iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. *Cancer Res.* 2004;64(1):415-22.
61. Ohashi E, Kogai T, Kagechika H, Brent GA. Activation of the PI3 kinase pathway by retinoic acid mediates sodium/iodide symporter induction and iodide transport in MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res.* 2009;69(8):3443-50.
62. Kogai T, Kanamoto Y, Li AI, Che LH, Ohashi E, Taki K, et al. Differential regulation of sodium/iodide symporter gene expression by nuclear receptor ligands in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology.* 2005;146(7):3059-69.
63. Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, Huang M, Brent GA. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(15):8519-24.
64. Marischler C. *Basics Endokrinologie.* Elsevier Verlag. 2013.
65. Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL. MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids.* 1975;26(6):785-95.

66. Chen YH, Desai P, Shiao RT, Lavelle D, Haleem A, Chen J. Inhibition of myeloma cell growth by dexamethasone and all-trans retinoic acid: synergy through modulation of interleukin-6 autocrine loop at multiple sites. *Blood*. 1996;87(1):314-23.
67. Unterholzner S, Willhauck MJ, Cengic N, Schutz M, Goke B, Morris JC, et al. Dexamethasone stimulation of retinoic Acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of ¹³¹I in breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(1):69-78.
68. Wolff J, Chaikoff IL, et al. The temporary nature of the inhibitory action of excess iodine on organic iodine synthesis in the normal thyroid. *Endocrinology*. 1949;45(5):504-13, illust.
69. Eng PH, Cardona GR, Previti MC, Chin WW, Braverman LE. Regulation of the sodium iodide symporter by iodide in FRTL-5 cells. *Eur J Endocrinol*. 2001;144(2):139-44.
70. Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, et al. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and Na⁺/I⁻ symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol*. 1997;131(2):195-203.
71. Ajjan RA, Watson PF, McIntosh RS, Weetman AP. Intrathyroidal cytokine gene expression in Hashimoto's thyroiditis. *Clin Exp Immunol*. 1996;105(3):523-8.
72. Spitzweg C, Joba W, Morris JC, Heufelder AE. Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid*. 1999;9(8):821-30.
73. Mazzaferri EL. Histologic variants of papillary thyroid carcinoma. *Endocr Pract*. 2001;7(2):139-42.
74. Elisei R, Pinchera A, Romei C, Gryczynska M, Pohl V, Maenhaut C, et al. Expression of thyrotropin receptor (TSH-R), thyroglobulin, thyroperoxidase, and calcitonin messenger ribonucleic acids in thyroid carcinomas: evidence of TSH-R gene transcript in medullary histotype. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(4):867-71.

75. Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med.* 2002;43(9):1188-200.
76. Elisei R, Vivaldi A, Ciampi R, Faviana P, Basolo F, Santini F, et al. 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.* 2006;91(6):2389-95.
77. Lecat-Guillet N, Ambroise Y. Synthesis and evaluation of imidazo[2,1-b]thiazoles as iodide efflux inhibitors in thyrocytes. *ChemMedChem.* 2009;4(11):1819-30.
78. Weiss SP, NJ.; Grollman, EF. Effect of Thyrotropin on Iodide Efflux in FRTL-5 Cells Mediated by Ca²⁺. *Endocrinology* 1984;114(4):1108-13.
79. Spitzweg C. Gene therapy in thyroid cancer. *Horm Metab Res.* 2009;41(6):500-9.
80. Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(4):1447-63.
81. Chatterjee S, Thaker N, De A. Combined 2-deoxy glucose and metformin improves therapeutic efficacy of sodium-iodide symporter-mediated targeted radioiodine therapy in breast cancer cells. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2015;7:251-65.
82. Moon DH, Lee SJ, Park KY, Park KK, Ahn SH, Pai MS, et al. Correlation between ^{99m}Tc-pertechnetate uptakes and expressions of human sodium iodide symporter gene in breast tumor tissues. *Nucl Med Biol.* 2001;28(7):829-34.
83. Wapnir IL, Goris M, Yudd A, Dohan O, Adelman D, Nowels K, et al. The Na⁺/I⁻ symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin Cancer Res.* 2004;10(13):4294-302.
84. Kogai T, Curcio F, Hyman S, Cornford EM, Brent GA, Hershman JM. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin

stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression. *J Endocrinol.* 2000;167(1):125-35.

85. Tanosaki S, Ikezoe T, Heaney A, Said JW, Dan K, Akashi M, et al. Effect of ligands of nuclear hormone receptors on sodium/iodide symporter expression and activity in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;79(3):335-45.

86. Knostman KA, McCubrey JA, Morrison CD, Zhang Z, Capen CC, Jhiang SM. PI3K activation is associated with intracellular sodium/iodide symporter protein expression in breast cancer. *BMC Cancer.* 2007;7:137.

87. Gaertner FC, Rohde F, Mueller J, Blechert B, Janssen KP, Essler M. Endogenous expression of the sodium iodide symporter mediates uptake of iodide in murine models of colorectal carcinoma. *Int J Cancer.* 2009;125(12):2783-91.

88. Castro MR, Bergert ER, Beito TG, McIver B, Goellner JR, Morris JC. Development of monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: immunohistochemical characterization of this protein in thyroid cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(8):2957-62.

89. Angelousi A, Nonni A, Kassi E, Kontzoglou K. Expression of sodium iodide symporter in human breast tissues. *J BUON.* 2016;21(1):53-60.

90. Peyrottes I, Navarro V, Ondo-Mendez A, Marcellin D, Bellanger L, Marsault R, et al. Immunoanalysis indicates that the sodium iodide symporter is not overexpressed in intracellular compartments in thyroid and breast cancers. *Eur J Endocrinol.* 2009;160(2):215-25.

91. Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, McGaughy VR, et al. An immunohistochemical study of Na⁺/I⁻ symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology.* 1998;139(10):4416-9.

92. Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, et al. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(11):4102-6.
93. Beyer SJ, Zhang X, Jimenez RE, Lee ML, Richardson AL, Huang K, et al. Microarray analysis of genes associated with cell surface NIS protein levels in breast cancer. *BMC Res Notes.* 2011;4:397.
94. Sui W, Ou M, Chen J, Wan Y, Peng H, Qi M, et al. Comparison of immunohistochemistry (IHC) and fluorescence in situ hybridization (FISH) assessment for Her-2 status in breast cancer. *World J Surg Oncol.* 2009;7:83.
95. Kogai T, Brent GA. The sodium iodide symporter (NIS): regulation and approaches to targeting for cancer therapeutics. *Pharmacol Ther.* 2012;135(3):355-70.
96. Spitzweg C, Morris JC. Sodium iodide symporter (NIS) and thyroid. *Hormones (Athens).* 2002;1(1):22-34.
97. Schmutzler C, Winzer R, Meissner-Weigl J, Kohrle J. Retinoic acid increases sodium/iodide symporter mRNA levels in human thyroid cancer cell lines and suppresses expression of functional symporter in nontransformed FRTL-5 rat thyroid cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240(3):832-8.
98. Schmutzler C, Kohrle J. Retinoic acid redifferentiation therapy for thyroid cancer. *Thyroid.* 2000;10(5):393-406.
99. Schmutzler C. Regulation of the sodium/iodide symporter by retinoids--a review. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001;109(1):41-4.
100. Schmutzler C, Schmitt TL, Glaser F, Loos U, Kohrle J. The promoter of the human sodium/iodide-symporter gene responds to retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;189(1-2):145-55.

101. Elisei R, Vivaldi A, Agate L, Ciampi R, Molinaro E, Piampiani P, et al. All-trans-retinoic acid treatment inhibits the growth of retinoic acid receptor beta messenger ribonucleic acid expressing thyroid cancer cell lines but does not reinduce the expression of thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(4):2403-11.
102. Jeong H, Kim YR, Kim KN, Choe JG, Chung JK, Kim MK. Effect of all-trans retinoic acid on sodium/iodide symporter expression, radioiodine uptake and gene expression profiles in a human anaplastic thyroid carcinoma cell line. *Nucl Med Biol.* 2006;33(7):875-82.
103. Zhang M, Guo R, Xu H, Zhang M, Li B. Retinoic acid and tributyrin induce in-vitro radioiodine uptake and inhibition of cell proliferation in a poorly differentiated follicular thyroid carcinoma. *Nucl Med Commun.* 2011;32(7):605-10.
104. Tang M, Hou YL, Kang QQ, Chen XY, Duan LQ, Shu J, et al. All-trans-retinoic acid promotes iodine uptake via up-regulating the sodium iodide symporter in medullary thyroid cancer stem cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014;15(4):1859-62.
105. Lan L, Deng W, Chen HL, Huo LL, Deng LL, Zhang GY, et al. [All-trans retinoic acid improves iodine uptake of thyroid cancer cells via repressing transcriptional activity of beta-catenin]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2016;96(7):553-8.
106. So MK, Kang JH, Chung JK, Lee YJ, Shin JH, Kim KI, et al. In vivo imaging of retinoic acid receptor activity using a sodium/iodide symporter and luciferase dual imaging reporter gene. *Mol Imaging.* 2004;3(3):163-71.
107. Kogai T, Liu YY, Mody K, Shamsian DV, Brent GA. Regulation of sodium iodide symporter gene expression by Rac1/p38beta mitogen-activated protein kinase signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2012;287(5):3292-300.
108. Lim SJ, Paeng JC, Kim SJ, Kim SY, Lee H, Moon DH. Enhanced expression of adenovirus-mediated sodium iodide symporter gene in MCF-7 breast cancer cells with retinoic acid treatment. *J Nucl Med.* 2007;48(3):398-404.

109. Dohan O, De la Vieja A, Carrasco N. Hydrocortisone and purinergic signaling stimulate sodium/iodide symporter (NIS)-mediated iodide transport in breast cancer cells. *Mol Endocrinol.* 2006;20(5):1121-37.
110. Kogai T, Ohashi E, Jacobs MS, Sajid-Crockett S, Fisher ML, Kanamoto Y, et al. Retinoic acid stimulation of the sodium/iodide symporter in MCF-7 breast cancer cells is mediated by the insulin growth factor-I/phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(5):1884-92.
111. Alotaibi H, Yaman E, Salvatore D, Di Dato V, Telkoparan P, Di Lauro R, et al. Intronic elements in the Na⁺/I⁻ symporter gene (NIS) interact with retinoic acid receptors and mediate initiation of transcription. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(10):3172-85.
112. Willhauck MJ, DJ OK, Wunderlich N, Goke B, Spitzweg C. Stimulation of retinoic acid-induced functional sodium iodide symporter (NIS) expression and cytotoxicity of (1)(3)(1)I by carbamazepine in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125(2):377-86.
113. Farias EF, Arapshian A, Bleiweiss IJ, Waxman S, Zelent A, Mira YLR. Retinoic acid receptor alpha2 is a growth suppressor epigenetically silenced in MCF-7 human breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 2002;13(8):335-41.
114. Schug TT, Berry DC, Toshkov IA, Cheng L, Nikitin AY, Noy N. Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPARbeta/delta to RAR. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(21):7546-51.
115. Lu M, Mira-y-Lopez R, Nakajo S, Nakaya K, Jing Y. Expression of estrogen receptor alpha, retinoic acid receptor alpha and cellular retinoic acid binding protein II genes is coordinately regulated in human breast cancer cells. *Oncogene.* 2005;24(27):4362-9.
116. Ryan J, Curran CE, Hennessy E, Newell J, Morris JC, Kerin MJ, et al. The sodium iodide symporter (NIS) and potential regulators in normal, benign and malignant human breast tissue. *PLoS One.* 2011;6(1):e16023.

117. Sponziello M, Scipioni A, Durante C, Verrienti A, Maranghi M, Giacomelli L, et al. Regulation of sodium/iodide symporter and lactoperoxidase expression in four human breast cancer cell lines. *J Endocrinol Invest*. 2010;33(1):2-6.
118. Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Senekowitsch-Schmidtke R, Wunderlich N, Goke B, Morris JC, et al. Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;109(2):263-72.
119. Min JJ, Chung JK, Lee YJ, Shin JH, Yeo JS, Jeong JM, et al. In vitro and in vivo characteristics of a human colon cancer cell line, SNU-C5N, expressing sodium-iodide symporter. *Nucl Med Biol*. 2002;29(5):537-45.
120. Sieger S, Jiang S, Schonsiegel F, Eskerski H, Kubler W, Altmann A, et al. Tumour-specific activation of the sodium/iodide symporter gene under control of the glucose transporter gene 1 promoter (GTI-1.3). *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30(5):748-56.
121. Rillema JA, Hill MA. Pendrin transporter carries out iodide uptake into MCF-7 human mammary cancer cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2003;228(9):1078-82.
122. Manley SW, Li H, Mortimer RH. The BeWo choriocarcinoma cell line as a model of iodide transport by placenta. *Placenta*. 2005;26(5):380-6.
123. Lindencrona U, Forssell-Aronsson E, Nilsson M. Transport of free ^{211}At and $^{125}\text{I}^-$ 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*. 2007;34(5):523-30.

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]

11. Danksagung

Zuallererst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. U. Schumacher besonderen Dank aussprechen für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe forschen zu können. Herzlichen Dank für die vielseitige Unterstützung, die Geduld und das Engagement.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. sc. hum. E. J. Koziolk für die Betreuung der Arbeit bedanken.

Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern im Institut für Anatomie und Experimentelle Morphologie für ihre tatkräftige Unterstützung und die freundliche Anleitung und Hilfestellung.

Der Werner Otto Stiftung und dem Stipendium zur Förderung des wissenschaftlichen Nachwuchses in der Medizin an der Universität Hamburg verdanke ich die Möglichkeit, mich über mehrere Monate ausschließlich mit der experimentellen Arbeit befassen zu können. Vielen Dank für die großzügige Unterstützung.

Dziękuję rodzicom Dariuszowi i Renacie za wsparcie, cierpliwość i miłość.

12. Lebenslauf

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13. Eidesstattliche Versicherung

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: