

**Aus der MNR-Klinik Abteilung für Endokrinologie der  
Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. W.A. Scherbaum**

---

**Untersuchung des Einflusses von Interleukin-1 $\alpha$  und Interleukin-2 auf  
die Expression des humanen Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) in primä-  
ren Thyreozytenkulturen mittels der quantitativen Real-Time-PCR**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf  
vorgelegt von**

**Van-Dung Dan BUI**

**2004**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.- Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab  
Dekan

**Referent:** Priv.-Doz. Dr. Joachim Feldkamp

**Korreferent:** Univ.- Prof. Dr. Peter Goretzki

Tage der mündlichen Prüfung: 26.08.04, 30.08.04, 07.09.04

Để Ghi Nhớ Công Ơn Sinh Thành Dưỡng Dục

Kính Tặng Bố Má Mến Yêu

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
2.1	Der Stoffwechsel von Jodid und seine Bedeutung für die Schilddrüse	8
2.2	Die thyreoidale Aufnahme, Verteilung und Bedarf von Jodid im menschlichen Körper	9
2.3	Struktur, Funktion, Regulation und Expression des Natrium-Jodid-Symporters	13
2.3.1	Struktur	13
2.3.2	Funktion	15
2.3.3	Regulation	16
2.3.4	Intra- und extrathyreoidale Expression	19
2.4	NIS und das Immunsystem	20
2.4.1	NIS und autoimmune Schilddrüsenerkrankungen	20
2.4.2	Die Interleukine IL-1 $\alpha$ und IL-2	22
2.5	Fragestellung und Zielsetzungen	27
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	<b>28</b>
3.1	Bezugsquellen	28
3.1.1	Reagenzien	28
3.1.2	Geräte	30
3.1.3	Verbrauchsmaterialien	31
3.2	Methoden	33
3.2.1	Anlage von Primärkulturen aus Frischpräparaten menschlicher Schilddrüsengewebe	33

3.2.2	Kultivierung der Zellen -----	34
3.2.3	Herstellung von Zellsuspensionen durch Trypsinbehandlung der Monolayer-Kulturen-----	34
3.2.4	Zellzählung und Vitalitätskontrolle -----	35
3.2.5	Isolierung der Gesamt-RNA -----	35
3.2.6	Spektrophotometrische Konzentrations- bestimmung der Gesamt-RNA -----	36
3.2.7	cDNA-Synthese gemäß dem Protokoll des first-strand cDNA Synthesis Kit -----	37
3.2.8	Aufreinigung der cDNA mit dem High Pure PCR Product Purification Kit-----	38
3.2.9	Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)-----	39
<b>3.3</b>	<b>Statistische Auswertung-----</b>	<b>47</b>
<b>4</b>	<b><i>Ergebnisse</i> -----</b>	<b>48</b>
4.1	Quantifizierung, PCR-Effizienz und PCR-Fehler -----	48
4.2	Darstellung der Stimulationskurven IL-1 $\alpha$ und IL-2-----	53
4.2.1	Stimulationskurven GAPDH und NIS mit IL-1 $\alpha$ -----	54
4.2.1	Stimulationskurven GAPDH und NIS mit IL-2 -----	56
4.3	Der Einfluß der Interleukine 1 $\alpha$ und 2 auf die hNIS-Expression -----	58
<b>5</b>	<b><i>Diskussion</i> -----</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i> -----</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i>-----</b>	<b>76</b>
<b>8</b>	<b><i>Curriculum vitae</i>-----</b>	<b>88</b>
<b>9</b>	<b><i>Danksagung</i> -----</b>	<b>89</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
bTSH	bovines Thyrotropin
BSA	Bovines Albuminserum
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat; umfasst dATP dCTP, dGTP und dTTP
EDTA	Ethylen-diamin-tetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
FRTL-5 Zellen	Fischer-Rattenthreozytenzelllinie
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat- hydrogenase
GTC	Guanidiniumisothiozyanat
hNIS	humaner Natrium-Jodid-Symporter
kb	Kilobase
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
M	Molar
min	Minute
MMLV	<i>Moloney murine leukemia virus</i>
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
ntc	Wasserkontrolle ( <i>no template control</i> )

---

NTP	Nukleosidtriphosphat
OD <sub>260</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
Oligo-dT	Oligodeoxythymidin
PCR	Polymerasekettenreaktion
RA	Rezeptorantagonist
RNAse	Ribonuklease
RT-PCR	Real-Time-PCR ("Echtzeit-PCR")
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase, Raumtemperatur
s	Sekunden
SD	Standardabweichung
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur ( <i>melting temperature</i> )
TPO	Thyreoperoxidase
tRNA	Transfer-RNA
TSH	Thyrotropin
U	<i>Units</i> -Einheit, Mengenangabe bei Enzymen

## 2 Einleitung

### 2.1 Der Stoffwechsel von Jodid und seine Bedeutung für die Schilddrüse

Jod, als chemisch aktives Element im Periodensystem an 61. Stelle verzeichnet, spielt im menschlichen Körper eine zentrale Rolle, einerseits als Bestandteil der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ), andererseits als Regulator der Schilddrüsenfunktion. Die Bedeutung von Trijodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) liegt vor allem in der Kontrolle zahlreicher Stoffwechselfvorgänge. Ihr Wirkungsspektrum umfasst die Steigerung des Grundumsatzes und Gesamtstoffwechsels. Desweiteren haben sie einen fördernden Einfluss auf Wachstum und Entwicklung, eine Wirkung auf das Nervensystem und an die Muskulatur, eine fördernde Wirkung auf den Calcium- und Phosphatumsatz, sowie eine hemmende Wirkung auf die Glykogen- und Proteinsynthese. Die Wirkungsweise der Hormone an den einzelnen Organen und Stoffwechselsystemen ist sehr unterschiedlich und hängt entscheidend von der vorliegenden Hormonkonzentration ab.

Das Vorkommen von Jod variiert regional stark. Dieser Unterschied beruht zum einen auf dem exogenen Jodkreislauf als natürlicher Jodquelle, ist andererseits aber auch abhängig von in zunehmendem Maße jodhaltigen Zivilisationsprodukten, wie zum Beispiel jodiertes Speisesalz, Fleisch- Wurst- und Backwarenprodukten.

Das mit der Nahrung aufgenommene Jod wird im Gastrointestinaltrakt resorbiert. Dabei wird Jod zu Jodid reduziert und erreicht dann durch die Dünndarmschleimhaut das Blutplasma. Hier diffundiert Jodid durch die Membran der Erythrozyten und erreicht, zum Teil als plasmatisches und zum Teil als intraerythrozytäres Jodid, die Zielorgane.

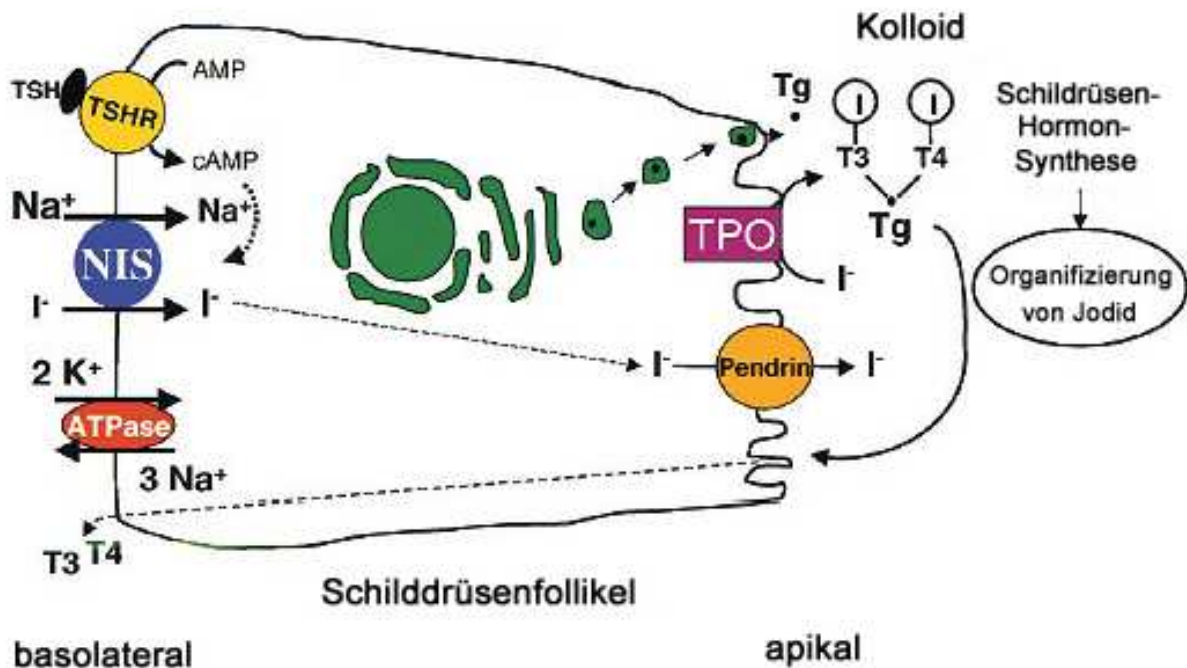


## 2.2 Die thyreoidale Aufnahme, Verteilung und Bedarf von Jodid im menschlichen Körper

Hauptort der Jodidaufnahme ist die Schilddrüse. Die Schilddrüse besteht histologisch aus Follikeln, deren Zellen um eine kolloidhaltige Matrix angeordnet sind. Die Thyreozyten sind durch eine strukturelle und funktionelle Polarität (Bidey und Tomlinson, 1988) charakterisiert. Für die selektive Aufnahme von Jodid in die Schilddrüse (Jodination) ist der Natrium-Jodid-Symporter (NIS) zuständig, der sich an der basolateralen Membran der Thyreozyten befindet (Paire *et al.*, 1997). Bei diesem Prozess wird Jodid durch den NIS selektiv in der Zelle um den Faktor 20 bis 40 angereichert. Wie andere natriumabhängige Symporter benutzt der NIS als Energiequelle den Natrium-Gradienten der Natrium-Kalium-ATPase ( $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ) (Chambard *et al.*, 1983). Diese Energie wird an dem gleichzeitig stattfindenden Transport von Jodid in die Zelle entgegen seines elektrochemischen Gradienten gekoppelt. Zwei Natrium-Ionen sind erforderlich, um ein Jodid-Ion in die Zelle zu transportieren (Cavaliere *et al.*, 1997).

Im weiteren wird Jodid passiv durch die apikale Membran in das Kolloid, dem eigentlichen Ort der Schilddrüsenhormonsynthese, verlagert. Dieser apikale Jodidtransport wird über Pendrin vermittelt, welches zur Gruppe der Chlorid-Jodid-Transporter gehört (Scott *et al.*, 1999; Bidart *et al.*, 2000). Im Gegensatz zum Natrium-Jodid-Symporter erfolgt dieser Jodidtransport entlang eines Jodidgradienten und benötigt somit keine zusätzliche Energie. Erst kürzlich konnten Rodriguez *et al.* (2002) einen weiteren apikalen Jodidtransporter (AIT) identifizieren. Dieser Transporter ermöglicht einen passiven Jodidtransfer in das Schilddrüsenkolloid. Auf den Mikrovilli der apikalen Membran, an der Grenze zwischen Kolloid und Zelle, wird Jodid organifiziert. Diese Reaktion wird von der Schilddrüsenperoxidase (TPO) katalysiert. Jodid wird oxidiert und an Tyrosyl-Reste innerhalb der Thyreoglobulin-Moleküle gebunden. Dieser Prozess wird als Jodisation bezeichnet. Es entstehen 3-Monojodotyrosin (MJT) und 3,5-Dijodotyrosin (DJT). Diese Reaktion wird durch 6-n-Propyl-2-Thiouracil (PTU) und 1-Methyl-2-Mercaptoimidazole (MMI)

blockiert. Aus MJD und DJT werden durch eine Kopplungsreaktion die Schilddrüsenhormone T3 und T4 synthetisiert, die extrazellulär im Kolloid gespeichert bleiben. Bei Bedarf wird das Thyreoglobulin durch Endozytose aufgenommen, durch phagolysosomale Hydrolyse werden T3 und T4 freigesetzt und ins Blut abgegeben. Das nicht sezernierte Jodotyrosin wird von der Jodotyrosine-Dehalogenase zu Jodid und Tyrosin metabolisiert, so dass Jodid wiederverwendet werden kann. Alle diese Reaktionen können durch TSH stimuliert werden. Das schilddrüsenstimulierende Hormon (TSH) wird in der Hirnanhangsdrüse gebildet und interagiert mit seinem spezifischen Rezeptor an der basolateralen Membran der Follikel über den zyklischen Adenosinmonophosphatweg (cAMP-Weg). Das plasmatische Jodid wird von der Niere filtriert und mehr als 90% des ausgeschiedenen Jodids, das den Körper verlässt, ist im Urin zu finden. Durch Schweiß und Muttermilch werden ebenfalls gewisse Mengen an Jodid ausgeschieden. Der Stuhl enthält auch Jodid, welches vom Blutplasma in den Dickdarm sezerniert wird (Cavalieri *et al.*, 1997).



**Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Schüsselfunktionen des Jodid-Transportes, der Biosynthese und der Organifizierung.**

Modifiziert nach Spitzweg (2001c)

TSHR	TSH-Rezeptor	T3, T4	Schüsldrüsenshormone
TSH	Thyrotropin	NIS	Natrium-Jodid-Symporter
AMP	Adenosinmonophosphat	TG	Thyreoglobulin
cAMP	Zyklisches AMP	TPO	Thyreoperoxidase
ATPASE	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase	Pendrin	Pendrin-Symporter

Der tägliche Jodbedarf eines erwachsenen Menschen beträgt 150-300 µg. Anhand der Jodkonzentration im Urin kann festgestellt werden, ob eine ausreichende Menge an Jod durch die Nahrung zugeführt wird.

Eine unzureichende Jodaufnahme verursacht eine gutartige und nicht-entzündliche Schüsldrüsensvergrößerung. Im Jahr 1996 wurde von der WHO veröffentlicht, dass ungefähr 30% der Weltbevölkerung an einer unzureichenden Jodversorgung leiden, weltweit 750 Millionen Menschen eine Struma haben und mehr als 5 Millionen an

Kretinismus erkrankt sind (WHO, 1996). Besonders ausgeprägt ist das Problem in vielen Länder Afrikas, Asiens und Südamerikas, aber auch in einigen europäischen Länder. In Deutschland leidet ein Drittel der Bevölkerung an einer euthyreoten Jodmangelstruma. Zur Zeit wird in Deutschland die tägliche Einnahme von 100 µg Jodid als Strumaprophylaxe empfohlen. Bei jungen Patienten mit diffuser Struma ohne Autonomie werden täglich 200 µg Jodid zur Beseitigung des intrathyreoidalen Jodmangels und zur konsequenten Rückbildung der Hyperplasie der Thyreozyten empfohlen. Neueste Daten deuten darauf hin, dass der Jodmangel die Epidemiologie der Struma, aber nicht den Entstehungsmechanismus der Struma verändert (Derwahl *et al.*, 2000). Eine breit angelegte Studie konnte beweisen, dass die Entstehung einer Struma zu 82% genetisch und nur zu 18% durch Umweltfaktoren bedingt ist (Brix *et al.*, 1999). Es konnte auch ein Locus auf Chromosom 14q gefunden werden, welcher mit der familiären Struma assoziiert ist (Neumann *et al.*, 1999).

Wie oben schon erwähnt wird das mit der Nahrung aufgenommene Jod vor der Resorption im Darm zu Jodid reduziert. Nach der Resorption verteilt sich das gebildete Jodid innerhalb von 2 Stunden gleichmäßig auf den Extrazellulärraum. Intrazellulär finden sich nur geringe Mengen Jodid in den Erythrozyten und Knochen. Der Verteilungsraum hängt im wesentlichen davon ab, in welchem Ausmaß andere Organe als die Schilddrüse Jodid aus ihm entnehmen und in sich anreichern. Neben der Schilddrüse vermögen weitere Organe wie die Nieren, die Magenschleimhaut, die Brust- und Speicheldrüse Jodid aufzunehmen. Weiter findet man eine Jodidaufnahme im Korioidplexus, im Ziliarkörper des Auges, in den Tränendrüsen, im Dünndarm, in der Haut sowie in der Plazenta (Shen *et al.*, 2001, Jhiang *et al.*, 1998, Filetti *et al.*, 1999, Spitzweg *et al.*, 1998).

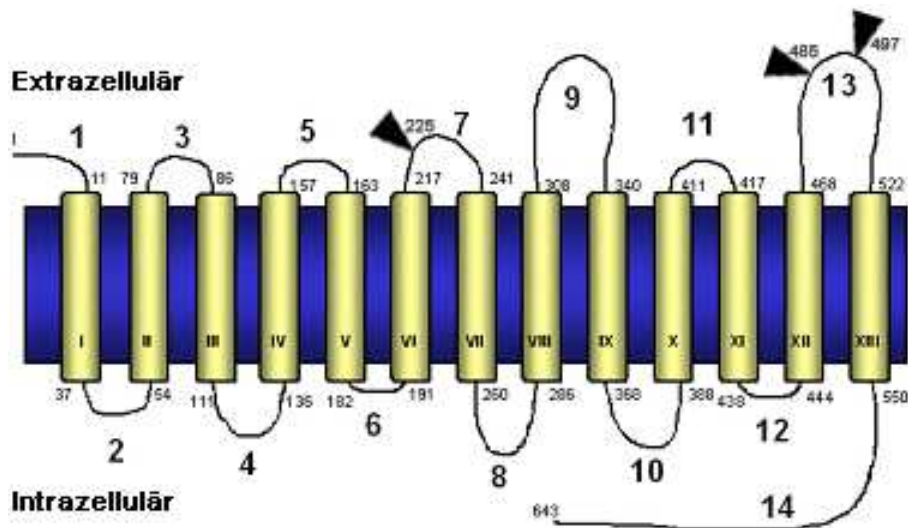
## **2.3 Struktur, Funktion, Regulation und Expression des Natrium-Jodid-Symporters**

### **2.3.1 Struktur**

Obwohl die biochemischen Grundlagen des Natrium-Jodid-Symporters auf zellulärer Ebene schon seit längerer Zeit bekannt sind, wurde die cDNA des Symporters erst vor kurzem kloniert (Carasco *et al.*, 1993; Dai *et al.*, 1996; Smanik *et al.*, 1996).

Die anschließende molekulare Charakterisierung zeigte, dass das hNIS-Gen auf dem Chromosom 9p12-13.2 lokalisiert ist und ein Glykoprotein von 643 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von annähernd 70-90 kDa kodiert. Die Kodierungsregion des hNIS besteht aus 15 Exons, unterbrochen von 14 Introns und kodiert für ein 3.9 kb großes mRNA Transkript. Als ein Mitglied der Natrium-abhängigen Transporterfamilie ist der NIS ein integrales Membranprotein mit 13 Transmembrandomänen, einem extrazellulären Aminoterminus und einem intrazellulären Carboxylterminus. (Dohan *et al.*, 2000).

Das NIS Protein besitzt drei N-glykosidische Bindungsstellen; eine befindet sich im siebten während die zwei anderen innerhalb des 13. Loops lokalisiert sind (Levy *et al.*, 1998).



**Abb. 2.2: Schematisches Modell des hNIS.**

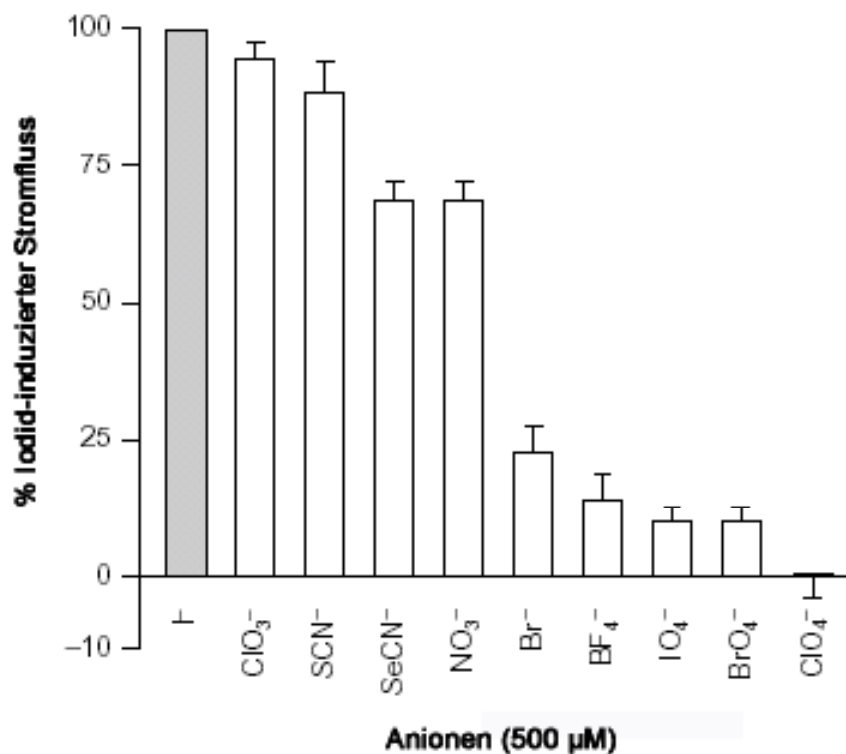
1 - 550	Sequenznummern (AS)	I - XIII	Transmembrandomänen
1 - 14	Extramembrandomänen	▼	N-glykosid. Bindungsstellen

Die von hNIS kodierte Aminosäuresequenz zeigt eine 84% Übereinstimmung (92%ige Ähnlichkeit) mit dem NIS der Ratte. Die meisten der nicht homologen Aminosäuren des menschlichen und rNIS befinden sich auf der Domäne des Carboxylterminus.

Pinke *et al.* und Perron *et al.* klonierten im Jahr 2001 den Symporter der Maus aus muriner Schilddrüsen-cDNA sowie muriner Brustdrüsen-cDNA. Hierbei handelt es sich auch um ein Protein aus 618 Aminosäuren mit einer hochgradigen Homologie zum NIS der Ratte und des Menschen.

### 2.3.2 Funktion

Bei intakter Funktion des NIS-Proteins wird Jodid in der Schilddrüse um den Faktor 20-40 konzentriert und für die Schilddrüsenhormonsynthese bereitgestellt. Die treibende Kraft für den Jodidtransport, bei dem zwei Natriumionen zusammen mit einem Jodidion in die gleiche Richtung transportiert werden, ist ein ins Zellinnere gerichteter Natriumgradient, der durch eine  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  aufrecht gehalten wird. Dementsprechend ist der vom NIS vermittelte Jodidtransport durch den  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Hemmer Quabain inhibierbar. Zusätzlich zu Jodid werden noch weitere Anionen, wie Chlorat ( $\text{ClO}_3^-$ ), Thiocyanat ( $\text{SCN}^-$ ), Selencyanat ( $\text{SeCN}^-$ ), Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Bromat ( $\text{Br}^-$ ), Borfluorid ( $\text{BF}_4^-$ ), Jodat ( $\text{JO}_4^-$ ) und Bromat ( $\text{BrO}_3^-$ ) vom Symporter transportiert. Thiocyanat ( $\text{SCN}^-$ ) und Perchlorat ( $\text{ClO}_4^-$ ) sind „klassische“ kompetitive Inhibitoren des Jodidtransports, wobei Perchlorat NIS blockiert, ohne selbst über denselben in die Schilddrüse transportiert zu werden (Eskandari *et al.*, 1997).



**Abb. 2.3: Substratselektivität des NIS. Modifiziert nach Eskandari (1997).**

Die induzierten Ionenströme von verschiedenen Anionen wurden bei  $V_m = -50\text{mV}$  erfasst. Die Werte sind auf Jodid normalisiert.

### 2.3.3 Regulation

Bereits vor der Klonierung des NIS-Gens wurde die Regulation des Jodidtransportes in die Schilddrüse intensiv untersucht. Das von der Hypophyse gebildete Thyreoidstimulierende Hormon (TSH) ist der wichtigste Modulator, der den Jodidtransport über den Adenylylzyklase-cAMP-Weg stimuliert. Die Behandlung von Rattenschilddrüsenzellen mit TSH, cAMP, Forskolin *in vitro* stimuliert neben dem Jodidtransport auch die NIS-Gen- und Proteinexpression (Kogai *et al.*, 1997). Neben einer verstärkten TSH-induziertem  $H_2O_2$ -Produktion scheint auch Adenosin ein Aktivator der NIS-Expression eine wichtige Bedeutung zu besitzen (Spitzweg *et al.*, 2000a). Die im Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus Basedow im Vergleich zu normalen Schilddrüsengewebe etwa 3 bis 4-fach erhöhte NIS-RNA- und Protein-Expression ist vermutlich die Folge der pathologischen TSH-Rezeptor-stimulierenden Antikörper, die über den TSH-Rezeptor die cAMP-Produktion und NIS-Expression stimulieren (Saito *et al.*, 1997b).

NIS ist auch im Brustgewebe exprimiert und wird durch Prolaktin stimuliert, was einen wesentlichen Regulationsmechanismus für die Jodanreicherung in der Muttermilch darstellen dürfte (Rillema *et al.*, 2000).

Bei Ratten wird die NIS-Proteinexpression in der laktierenden Brustdrüse durch Saugen stimuliert, nach 24h verschwindet dieser Effekt wieder. Das durch Saugen freigesetzte Hormon Oxytocin scheint somit ebenfalls das NIS-Expressionsniveau in der laktierenden Brustdrüse zu regulieren. (De la Vieja *et al.*, 2000).

Neben NIS-Stimulatoren wurden mittlerweile auch einige Inhibitoren der Expression des Symporters am Rattenmodell identifiziert.

Sowohl der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), als auch Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Östrogen, Ceramid und Sphingomyelinase,  $T_3$  und Dexamethason (Kawaguchi *et al.*, 1997; Ajjan *et al.*, 1998a, 1998b, 1998c; Pekary *et al.*, 1998; Furlanetto *et al.*, 1999; Spitzweg *et al.*, 1999c und 2000b)



fürten in FRTL-5 Zellen zu einer Downregulation der NIS-Expression. Thyreoglobulin scheint über den Mechanismus des negativen Feedback eine Supprimierung der TSH-induzierten NIS-Promoter-Aktivität zu bewirken, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die NIS-RNA- und Proteinexpression und die Jodaufnahmeaktivität inhibiert (Spitzweg *et al.*, 2000a). Furlanetto *et al.* (1999) zeigten, dass Östradiol eine Proliferation der FRTL-5 Zellen bewirkt, im Gegensatz dazu die NIS-RNA-Expression jedoch inhibiert wird. Diese Tatsache könnte die höhere Strumaprävalenz bei Frauen erklären. Neben den meisten Untersuchungen an FRTL-5 Zellen sind bis jetzt nur die Interleukine IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  an menschlichen Schilddrüsenzellen auf die NIS-Expression und Jodidaufnahmekapazität hin untersucht worden. Diese zeigen, wie von den FRTL-5 Zellen bekannt, eine Inhibition der NIS-Expression und Jodidaufnahmekapazität (Spitzweg *et al.*, 2000b).

Untersuchungen von hypothyreoten Hunden haben gezeigt, dass Jodid sowohl die Expression von TPO, als auch von NIS hemmt, was den Wolff-Chaikoff-Effekt (Hemmung der Jodid-Aufnahme wenige Stunden nach Jodidzugabe) erklären würde. (Uytterspot *et al.*, 1997).

Die Gruppe Eng *et al.* (1999) ermittelten bei Untersuchungen von Ratten eine Verringerung von NIS mRNA- und NIS Protein-Mengen als Folge von chronischem und akutem Jodid-Exzess. Sie formulierten die Hypothese, dass der Wegfall des akuten Wolff-Chaikoff-Effektes durch eine Verringerung des Symporters verursacht wird. Dadurch fällt die intrathyreoidale Jodidkonzentration unterhalb eines kritischen Wertes, was wiederum eine Wiederaufnahme von Jodid in die Schilddrüse zur Folge hat (Eng *et al.*, 1999).

Stimulatoren der NIS-Expression	Inhibitoren der NIS-Expression
TSH cAMP Forskolin Adenosin Prolaktin Oxytocin	TGF- $\beta$ 1 TNF- $\alpha$ IFN- $\gamma$ IL-1 $\alpha$ IL-1 $\beta$ IL-6 Östradiol Ceramid Sphingomyelinase T <sub>3</sub> Dexamethason Thyreoglobulin Jodid

**Tab 2.1: Stimulatoren und Inhibitoren der NIS-Expression bei FRTL5-Rattenzelllinien.**

### 2.3.4 Intra- und extrathyreoidale Expression

Seit der Klonierung des humanen NIS-Gens ist es möglich, Expressionsstudien durchzuführen, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen Normalgewebe und erkranktem Gewebe, sowohl von Schilddrüsengewebe, als auch von extrathyreoidalem Gewebe zu untersuchen.

Bei Untersuchungen mit hNIS Antikörpern stellt man fest, dass in normalem Schilddrüsengewebe die Schilddrüsenfollikelzellen ein heterogenes Muster aufweisen. Innerhalb eines Follikels sprechen die Follikelzellen unterschiedlich auf das Immunsystem an. So zeigen Untersuchungen mit hNIS-Antikörpern, dass nur ca. 30% der Follikelzellen nachweisbare Mengen an hNIS-Protein bilden, welches nur an der basolateralen Membran zu finden sind (Filetti *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu beobachtet man im Falle des TSH-Rezeptors eine ubiquitäre Expression in allen normalen Schilddrüsenfollikelzellen.

Stromazellen, Lymphozyten, intrafollikuläre Makrophagen und Endothelzellen reagieren nicht mit den hNIS-Antikörpern (Caillou *et al.*, 1998).

Neben der Schilddrüse sind auch einige extrathyreoidale Gewebe, wie die Speicheldrüse, die Tränendrüse, die Magenschleimhaut, die Brustdrüse und der Thymus in der Lage, Jodid mittels des  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ -Symporters anzureichern. Geringere NIS-Expressionen findet man in der Prostata, den Ovarien, der Nebenniere, der Lunge, des Herzens, dem Plexus choroideus und dem Ziliarkörper des Auges (Shen *et al.*, 2001, Jhiang *et al.*, 1998, Filetti *et al.*, 1999, Spitzweg *et al.*, 1998, 1999b, 2001c, Tazebay *et al.*, 2000). Berichte über eine Verstoffwechslung von Jodid in diesen Geweben sind seit längerer Zeit bekannt. Das Besondere in diesen extrathyreoidalen Geweben ist, dass TSH nicht stimulierend wirkt, jedoch der Symporter durch Perchlorat und Thiocyanat hemmbar ist (Carrasco *et al.*, 1993).

## 2.4 NIS und das Immunsystem

### 2.4.1 NIS und autoimmune Schilddrüsenerkrankungen

Zweithäufigste Ursache für die Entwicklung einer Struma neben dem alimentären Jodmangel sind Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse. Dies betrifft im besonderen die Autoimmunhyperthyreose (Morbus Basedow, MB). Dabei kommt es zur Produktion von Immunglobulinen, welche die Schilddrüsenfunktion stimulieren und gegen den TSH-Rezeptor gerichtet sind. Ihre Bindung an den TSH-Rezeptor führt wie im Falle von TSH zu einer Stimulierung der Hormonsynthese und –sekretion. TSH-Rezeptorantikörper stellen heterogene Immunglobuline dar. Sie können unterschiedliche Effekte am TSH-Rezeptor ausüben, wozu auch Effekte zählen, die die Proliferation stimulieren. Eine weitere Autoimmunerkrankung der Schilddrüse, die Struma lymphomatosa Hashimoto (HT), kann zu einer Schilddrüsenvergrößerung führen. Histologisch steht hier eine erhebliche Vermehrung des lymphatischen Gewebes mit Ausbildung von Lymphfollikeln mit Keimzentren im Vordergrund.

Entsprechend der klinischen Beobachtung und der Radionuklidanreicherung zeigt wie oben erwähnt das Schilddrüsengewebe von Morbus Basedow-Patienten ein erhöhtes NIS-Expressionsniveau, während im Gegensatz dazu die NIS-Expression im Schilddrüsengewebe bei Hashimoto-Thyroiditis Patienten reduziert ist. Die Ursache der reduzierten NIS-Expression mit der Folge der Hypothyreoseentwicklung bei der Hashimoto-Thyreoiditis ist möglicherweise auf die Wirkung der durch die infiltrierenden T-Zellen produzierten Interleukine zurückzuführen (Weetman *et al.*, 1996; Spitzweg *et al.*, 2000b, 2002). Neben diesen Autoimmunmechanismen, die zu den für die chronische HT typischen lymphozytären und plasmazellulären Infiltraten der Schilddrüse führen, sind humorale Effektormechanismen, Autoantikörper (TPO-Antikörper, TG-Antikörper) im Rahmen der zellvermittelten Zytotoxizität wahrscheinlich an der Hypothyreoseentwicklung beteiligt. Während TPO-Antikörper für den serologisch-diagnostischen Nachweis der Autoimmunthyreoiditis im

Vordergrund stehen, ist die Rolle der Thyreoglobulinautoantikörper insbesondere in der Initialphase der Erkrankung bis jetzt unklar. Die erhöhte NIS-Expression beim Morbus Basedow wird durch TSH-Rezeptor-stimulierende Antikörper hervorgerufen (Saito *et al.*, 1997a; Spitzweg *et al.*, 1997). Da NIS für den Jodidtransport in die Schilddrüse verantwortlich ist und eine kritische Voraussetzung für die Schilddrüsenhormonsynthese darstellt, wird NIS (neben TPO, TG, und TSH-R-AK) als weiteres Autoantigen bei der Pathogenese autoimmuner Schilddrüsenerkrankungen vermutet (Endo *et al.*, 1996; Raspe *et al.*, 1995; Spitzweg *et al.*, 2000b, 2002).

### 2.4.2 Die Interleukine IL-1 $\alpha$ und IL-2

Wie schon erwähnt, spielen die Interleukine im Rahmen der zellvermittelten Zytotoxizität als Regulator der NIS-Proteinexpression und Jodidaufnahmefähigkeit eine wichtige Rolle (Weetman *et al.*, 1996; Spitzweg *et al.*, 2000b, 2002). Sie reagieren in Wechselwirkung mit vielen anderen Immunmodulatoren und beeinflussen nahezu jedes Gewebe und Organsystem. Im Folgenden werden die in unseren Experimenten benutzten Interleukine IL-1 $\alpha$  und IL-2 kurz definiert, klassifiziert, und in ihren pathophysiologischen Wirkungsmechanismen sowie therapeutischen Strategien charakterisiert.

Der Begriff Zytokine leitet sich aus dem Griechischen ab und bedeutet soviel wie „zwischen den Zellen bewegend“. Biologisch gesehen sind Zytokine hormonähnliche regulatorische Mediatoren, die zwischen verschiedenen Zellen wirken. Sie werden von zahlreichen Zelltypen produziert und wirken auf eine Vielzahl von Zellen, die *per definitionem* aus dem Immunsystem stammen. In der Regel werden sie nach vorangegangener Stimulation produziert, sind hochaktiv (minimale Konzentrationen im Bereich von wenigen pg bis ng), binden an hochaffine Rezeptoren und sind meist (im Gegensatz zu den Hormonen, die endokrin wirken) in kurzer Distanz autokrin, parakrin und juxtakrin aktiv. Es handelt sich meist um einfache Polypeptide (5-100 kDa), deren Produktion transient (vorübergehend) ist. In den letzten Jahrzehnten ist eine große Zahl verschiedenster Zytokine identifiziert worden. Diese Substanzen sind an der Regulierung der Ontogenese, der Gewebereparatur, der Immunabwehr, der Entzündung, der Kontraktilität des Herzens und der Gefäße, der Aufrechterhaltung der Körperprozesse und des Zellsterbens beteiligt. Zytokine werden nach ihrer Funktion, nach ihrer Struktur, und nach ihrem Zytokinrezeptor klassifiziert.

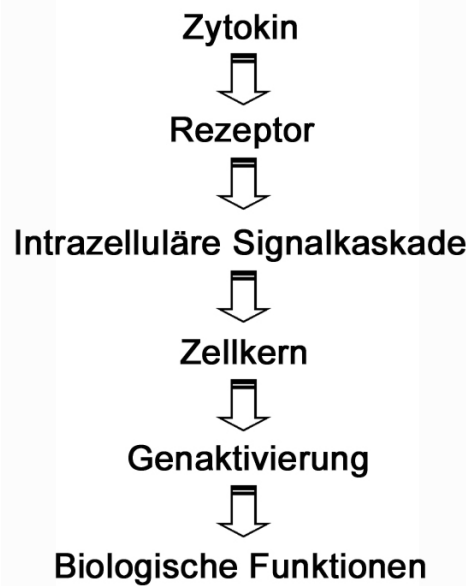
Die beiden Mediatoren IL-1 und IL-2 waren die ersten Zytokine, die Ende der 70er Jahre als Interleukine („Mediatoren zwischen den Leukozyten“) bezeichnet wurden. Diese beiden Mediatoren wurden ursprünglich durch Ihre Eigenschaft charakterisiert, die Lymphozy-

tenproliferation zu stimulieren. IL-1 ist ein gutes Beispiel dafür, dass ein Zytokin nicht nur eine, sondern „unzählige“ (Dinarello *et al.*, 1994) Funktionen besitzt (multifunktionell: pleiotrop). Dies hat zunächst dazu geführt, dass IL-1 unter unterschiedlichen Namen, mit verschiedenen Funktionen parallel von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde, unter anderem als endogenes Pyrogen (EP), Lymphozyten-aktivierender Faktor (LAF) oder als Leukozyten-endogener Mediator (LEM). In der strukturellen Zytokinklassifikation wird die IL-1-Familie zu den  $\beta$ -Faltblatt-Zytokinen, das IL-2 zu den  $\alpha$ -helikalen Zytokinen gezählt.

IL-1 ist ein Peptid mit einem Molekulargewicht (MG) von 17 KDa, IL-2 ein Peptid mit dem MG 15,4 KDa.

Zur IL-1-Familie gehören IL- $\alpha$ , IL- $\beta$ , IL-1-Ra und die Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Diese bestehen aus 12  $\beta$ -Ketten, die 3 Kleeblatt- bzw. Y-Strukturen mit jeweils 4  $\beta$ -Faltblattstrukturen ergeben.

Den verschiedenen strukturellen Zytokinklassen werden bestimmte biologische Aktivitäten zugeordnet. Den helikalen Zytokinen wird bevorzugt eine Rolle in der Hämatopoese sowie der erworbenen und der angeborenen Immunität zugeschrieben, während den Faltblatt-Zytokinen bevorzugt Funktionen in Wachstum, Differenzierung und Immunregulation zukommen. Aufgrund der Zuordnung von bestimmten Zytokinen zu bestimmten Hauptsignalwegen lässt sich diese verallgemeinernde Zuordnung der Zytokine zu bestimmten Funktionen verstehen (Theze *et al.*, 1999).



**Abb. 2.4: Ablauf der Induktion biologischer Funktionen durch Zytokine.**

Die Zytokine binden an hochaffine Rezeptoren, dadurch setzen sie unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden in Gang, die, abhängig von ihrer Zusammensetzung, schließlich unterschiedliche Gene aktivieren und damit verschiedene biologischen Funktionen hervorrufen.

Die Rezeptoren der Zytokine stellen ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Zytokine dar. Jedes Zytokin übt seine Wirkung durch hochaffine Rezeptoren aus, die über unterschiedliche Strukturen verfügen, und demnach in einige wenige Gruppen eingeteilt werden können. Die größte Gruppe der Zytokinrezeptor-Familie umfasst die Klasse-I-Zytokinrezeptoren (Hämatopoetin-Rezeptor-Familie; „*class I cytokine receptor family*“), an denen bevorzugt die Zytokine der  $\alpha$ -helikalen Klasse (IL-2) binden. Die Rezeptoren dieser Klasse zeichnen sich durch 2 extrazelluläre Domänen aus, die jeweils etwa 100 Aminosäuren lang sind.

Die Klasse-IV-Zytokinrezeptoren beinhalten die IL-1-Rezeptoren. Diese Rezeptoren zeichnen sich durch die Anwesenheit von 3 extrazellulären Immunoglobulin-ähnlichen Domänen aus.

Im menschlichen Körper sind unter aktivierten bzw. pathologischen Bedingungen verschiedene Zytokine gleichzeitig anwesend, wobei jedoch nur die Summe der Funktionen (protagonistisch und antagonistisch) für uns sichtbar wird. Unter diesen Bedingungen wird die



Produktion neuer Zytokine initiiert, die Produktion anderer herunterreguliert oder die Funktion verschiedener Zytokine durch Antagonisten oder Rezeptorregulation beeinflusst. Im Rahmen der Aktivierung der Zytokinproduktion kann es zur Produktion weiterer Mediatoren in einer sogenannten Zytokin-Kaskade kommen, in der z.B. Zytokine wie IL-1 die Produktion weiterer Zytokine veranlasst (Loppnow *et al.*, 1990; 1998).

IL-1 besitzt z.B. pleiotrope Wirkungen: Fieber, Zytokinproduktion und Proliferation. Neben IL-1 haben TNF und IL-6 einen Einfluß auf eine redundante Fieberaktivierung. Diese redundante Funktion ist der Grund dafür, warum die Ausschaltung eines Zytokins in der Therapie in vielen Fällen noch keine ausreichende Wirkung verursacht, da wahrscheinlich andere Zytokine diese Funktion übernehmen.

IL-1 aktiviert die Expression von Rezeptoren, ohne die IL-2 nicht vermehrt in Aktion treten kann. Der IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA), der an den gleichen Rezeptor wie die IL-1-Agonisten bindet, blockiert die Bindung der Agonisten (Eisenberg *et al.*, 1990; Hannum *et al.*, 1990). Interessanterweise wird, im Gegensatz zur IL-1-Produktion, die IL-1-RA-Produktion durch IL-10 stimuliert (Jenkins *et al.*, 1994).

Name	Bildungsort	Wirkung
Interleukin 1	Makrophagen, B- und T-Zellen, Natürliche Killerzellen (NK), Gliazellen, Hautzellen, Fibroblasten	induziert die Differenzierung von B-Zellen und Plasmazellen, fördert NK- und Makrophagenaktivität, alarmiert Helferzellen, lockt neutrophile Granulozyten an, Induktion von IL-6, INF, IL-1 $\beta$ und GM-CSF, erzeugt Fieber und Akut-Phase-Protein
Interleukin 2	aktivierte T-Zellen	induziert Vermehrung und Differenzierung von B- und T-Zellen, induziert Lymphokinproduktion in T-Zellen, erhöht Monozytenaggressivität, aktiviert Killerzellen

**Tab 2.2: IL-1 $\alpha$  und IL-2 mit ihren Bildungsorten und Wirkungsweisen.**

IL-1 tritt als Interleukin 1 $\alpha$  und 1 $\beta$  auf, wobei für Interleukin 1 $\beta$  ein direkter experimenteller Nachweis seiner arthritisauslösenden Wirkung existiert. Zusätzlich sind im Plasma und in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (RA) erhöhte Konzent-

rationen von IL  $1\beta$  festzustellen. Ein drittes Interleukin steht als Gegenspieler zu den beiden erstgenannten Interleukinen im Gleichgewicht. Es lagert sich an deren Rezeptorbindungsstellen an und blockiert sie kompetitiv. Dieser Interleukin 1-Rezeptorantagonist (IL-1-RA) kommt bei RA im Gelenk nur in reduzierter Menge vor, und seine antagonistische Wirkung reicht nicht aus, um die beiden Interleukin 1-Agonisten in Schach zu halten. Externe Zufuhr des humanen Interleukin 1-Rezeptorantagonisten behebt diesen Mangel und greift grundlegend in den Krankheitsprozess ein.

Außerdem spielt IL-1 eine wichtige Rolle bei der Ausdifferenzierung von sogenannten Osteoklasten aus Vorläuferzellen. Osteoklasten sind Spezialzellen, die bei der normalen Erneuerung der Knochen substanz im Körper zunächst den alten Knochen „abräumen“, bevor dann der Osteoblast den Knochen wieder aufbaut.

IL-2 wird von aktivierten T-Zellen gebildet und dient als T-Zell-Wachstumsfaktor (sog. *T-cell growth factor*, TCGF). Es stimuliert die Produktion anderer Zytokine (z.B. Interferone), steigert aber auch die Proliferation der B-Zellen und induziert die Zytotoxizität aktivierter Makrophagen. IL-2 wird als Immunmodulator v.a. bei malignem Melanom und fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom angewendet.

## 2.5 Fragestellung und Zielsetzungen

Seit der Klonierung des NIS-Gens im Jahre 1996 wird die NIS-Expression hinsichtlich seiner Regulation in Bezug auf benigne und maligne intra- und extrathyreoidale Erkrankungen untersucht.

Aufgrund der Tatsache, dass das Expressionsverhalten des  $\text{Na}^+ \text{-J}^-$ -Symporters bisher nur in FRTL-5-Zellen und Karzinomzelllinien untersucht wurde, war es das primäre Ziel dieser Dissertation den Einfluss der Interleukine IL-1 $\alpha$  und IL-2 auf das Expressionsmuster des humanen Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) aus menschlichem Schilddrüsengewebe zu untersuchen. Dabei sollte das Expressionsverhalten des hNIS in Abhängigkeit von IL-1 $\alpha$  und IL-2 auf RNA- bzw. cDNA-Ebene mittels der modernen Methode der Quantifizierung von Nukleinsäuren, der „Real-Time-PCR“, durchgeführt werden.

Da aus vorangegangenen Studien mit FRTL-5-Zellen der Ratte bekannt ist (Ajjan *et al.*, 1998a), dass IL-1 $\alpha$  zu einer dosisabhängigen Downregulation der NIS-Expression führt, soll in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, welchen Einfluß IL-1 $\alpha$  auf die Expression des Symporters in humanen Thyreozyten ausübt. Darüber hinaus soll die Frage geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß IL-2, dessen Auswirkungen auf den NIS bis dato noch nicht untersucht worden ist, einen Einfluss auf die Expression des Symporters hat.

### 3 Materialien und Methoden

#### 3.1 Bezugsquellen

##### 3.1.1 Reagenzien

- Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

- Dithiothreitol (DTT)
- First-strand cDNA Synthesis Kit

- Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland

- Dispase II (neutrale protease)
- Insulin-Transferrin-Natrium-Selen Supplement

- Gibco Life Technologies, Weiterstadt, Deutschland

- Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlg.
- Earle's Balanced Salt Solution (10x) (EBSS)
- Natriumbicarbonat 7,5 %
- Penicillin/Streptomycin
- RPMI 1640 Medium
- Trypsin-EDTA

- Merck, Darmstadt, Deutschland

- Eosin G
- Ethanol
- Natriumchlorid
- Natriumphosphat

- Promega, Mannheim, Deutschland

- Nuclease-freies Wasser

- Qiagen, Hilden, Deutschland

- Rneasy Mini Kit

- QIAshredder

- Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

- Deoxyribonuclease I, DNase I

- Dispase

- High Pure™ PCR Product Purifikation Kit

- Hybridisierungsproben (Hybridization Probes)

- LightCycler-FastStart DNA Master

- PCR Deoxynukleotide Mix

- Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- Albumin vom Rind

- bovines TSH

- BSA

- β-Mercaptoethanol

- Diethylpyrocarbonat (DEPC)

- Dimethylsulfoxid (DMSO)

- Ethylendiamin-Tetraacetat (EDTA)

- Forskolin

- Fötale Kälberserum

- Humanes rekombinantes Interleukin-1α

- Humanes rekombinantes Interleukin-2

- L-Glutamin

- L-Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin

- Minimum Essential Medium Eagle

- Somatostatin

- Tib Molbiol, Berlin, Deutschland

- LightCycler Hybridisierungsproben

- LightCycler Oligonukleotidprimer

- Upjohn, Heppenheim, Deutschland

- Hydrocortison

### 3.1.2 Geräte

- Bochem, Wellburg, Deutschland

- Laborbrenner Gasprofi

- GFL, Burgwedel, Deutschland

- Schüttelwasserbad

- Heidolph, Kelheim, Deutschland

- Magnetrührwerk mit Silumin-Heizplatte

- Hettich, Tuttlingen, Deutschland

- Zentrifuge Rotixa 120 R

- Zentrifuge Mikroliter

- Leitz, Wetzlar, Deutschland

- Lichtmikroskop Flouvert

- Memmert, Schwabach, Deutschland

- Brutschrank

- Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany

-Photometer Gene Quant II

- Thermo-DUX, Wertheim, Deutschland

-Thermocycler Techne Genius

- UniEquip, Martinsried, Deutschland

-Vakuum-Konzentrator Univapo 150 H

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

-Filtertips (10  $\mu$ l, 100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l)

- Corning Costar, Bodenheim, Deutschland

-Einmal-Pipetten (1; 5; 10; 25 ml)

-Petrischalen

-Zellkulturflaschen

- Eppendorf, Köln, Deutschland

-Einmal-Pipettenspitzen (10; 100; 1000  $\mu$ l)

-Einmal-Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 ml)

-Silanisierte Reaktionsgefäße (0,6; 1,5 ml)

- Greiner, Solingen, Deutschland

-Falcon-Röhrchen, 15 und 50 ml

-Gewebekulturflaschen, 250 ml, 75 cm<sup>2</sup>

-Gewebekulturplatten, 6 Well, mit Abdeckplatte

-Gewebekulturschalen

-Kulturflaschenboden, mit Filter

- Sarstedt, Newton, USA

-Zellschaber 25 cm

- Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland

-Einmal-Filterhalter, Porendurchmesser 0,2  $\mu\text{m}$



## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anlage von Primärkulturen aus Frischpräparaten menschlicher Schilddrüsengewebe

Die Isolierung von menschlichen Thyreozyten erfolgte direkt nach der operativen Entnahme von euthyreoten Strumagewebe. Als Transportmedium fungierte RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin ohne Natriumbicarbonat. Um spätere Verunreinigungen durch Fibroblasten und Fettzellen weitmöglichst zu verhindern, wurde das Schilddrüsenpräparat großzügig von der Organkapsel und dem Fettgewebe entfernt. Das Schilddrüsengewebe wurde in möglichst kleine Stücke (ca. 2 x 2 x 2 mm) zerkleinert und dreimal in Spinnerlösung gewaschen.

Die Spinnerlösung wird aus:

- ad 1 l *aqua destillata*,
- 100 ml *Earle's Balanced Salt Solution* (10x) (EBSS),
- sowie 6 ml Natriumhydrogencarbonat

jedes Mal frisch zubereitet. Anschließend wurden die zerkleinerten Schilddrüsengewebestücke mit 50 ml Spinnerlösung und 250 mg Dispase für 2 Stunden bei 37°C und 400 U/min in einem Trypsiniergefäß inkubiert. Während dieser Zeit erfolgte die enzymatische Dissoziation des Gewebes.

Nach 2 Stunden wurde die Suspension durch ein doppelt steriles Sieb gefiltert. Die durch das Sieb aufgefangene Gewebemasse wurde erneut mit 50 ml Spinnerlösung und 250 mg Dispase inkubiert und gefiltert. Dieser Vorgang wiederholte sich solange, bis die Gewebemasse eine bindegewebsähnliche Farbe aufzeigte.

Die durch das doppelte Sieb gefilterte Flüssigkeit wurde mit Spinnerlösung so oft gewaschen, bis als Pellet ein weißes Sediment zu beobachten war.

Das weiße Pellet wurde dann in 1 ml Nährmedium (Basismedium plus Serumzusätze plus FKS) resuspendiert und in Kulturflaschen a 20 ml eingebracht.

### 3.2.2 Kultivierung der Zellen

Die Aussaat der Zellen erfolgte auf 6 Well Platten ( $1 \times 10^6$  Zellen pro Well). Als Kultivierungsmedium wurde *Minimum Essential Medium Eagle* verwendet, das mit folgenden Serumzusätze supplementiert wurde:

- Penicillin/Streptomycin (2,5 mg/ml)
- Insulin-Transferrin-Natrium Selen Supplement (10 mg/l)
- Hydrocortison ( $1 \mu\text{g/ml}$ )
- L-Glutamin (200 mM/l)
- Somatostatin (10 ng/ml)
- L-Glycyl-L-Histidyl-L-Lysin (10 ng/ml)

### 3.2.3 Herstellung von Zellsuspensionen durch Trypsinbehandlung der Monolayer-Kulturen

Nach mikroskopischer Kontrolle zum Ausschluss von Kontaminationen und pathologischer Morphologie erfolgte das Absaugen der Nährlösung. Die Zellkulturen wurden dann einmal mit  $37^\circ\text{C}$  warmer PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA und nach 8 minütiger Inkubation bei  $37^\circ\text{C}$  durch vorsichtiges Klopfen von der Kulturschale abgelöst. Die enzymatische Lyse wurde durch den Zusatz von  $\frac{1}{2}$  Volumenanteil Nährstoffmedium mit 10% FKS gestoppt.

Die Zellsuspension wurde zur Zentrifugation in 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 1.300g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden die Zellaggregate durch Zusatz von Nährmedium resuspendiert. Pro Well wurde in 2 ml Medium  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät und für 24 Stunden mit 10 mU/ml bTSH vorstimuliert, um anschließende Inhibitionsversuche deutlicher nachweisen zu können. Nach einem erneuten Mediumwechsel erfolgte die Zugabe der jeweiligen zu untersuchenden Faktoren; Forskolin (10  $\mu\text{M}$ ), IL-1 $\alpha$  und IL-2. Um zu überprüfen, ob die eingesetzten Zytoki-

ne die Expression des Symporters dosisabhängig beeinflussten, wurden für die IL-1 $\alpha$  und IL-2 jeweils drei verschiedene Konzentrationen ausgetestet (10, 100, 1000 U/ml). Zusätzlich zu den Stimulationsansätzen wurde eine unstimulierte Probe mitgeführt, die als Basalwert fungierte.

### 3.2.4 Zellzählung und Vitalitätskontrolle

Von der in 3.2.3 erhaltenen, gut durchmischten Zellsuspension wurden 50  $\mu$ l entnommen und mit 20  $\mu$ l Eosin und 430  $\mu$ l *Aqua dest.* gefärbt. Eosin ist eine schnell agierende, alkoholische Gegenfärbung, die eine Darstellung von zytoplastischen Bestandteilen mit Farbkontrast zwischen Nuklei und Zytoplasma bietet. Zur Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl von 4 großen Eckquadranten bestimmt.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\text{Zellzahl/ml Zellsuspension} = (X:4) \cdot 10 \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

### 3.2.5 Isolierung der Gesamt-RNA

Nach weiteren 48 Stunden Inkubation erfolgte eine RNA-Isolierung gemäß dem Protokoll des *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland).

Nachdem die Überstände des Kulturmediums abpipettiert worden sind, wurden die kultivierten Zellen durch einen Lysis-Puffer, der  $\beta$ -Mercaptoethanol und das chaotrope Salz Guanidiniumisothiozyanat (GTC) enthält, lysiert. Das GTC denaturiert und inaktiviert dabei gleichzeitig auch eventuell vorhandene RNAsen. Nach der Lyse wurde das Zellmaterial in speziellen „QIAshreddern“ zerkleinert. Zum Lysat wurde 70%iger Alkohol gegeben. Dieser vermag die Bindungskapazität der Nukleinsäure so zu erhöhen, so dass nach an-

schließender Zentrifugation die Gesamt-RNA an die Membran des „Spin Columns“ gebunden werden konnte. Nach einem Waschschrift mit dem Puffer RW1 und erneuter Zentrifugation, wurden die „Spin-Columns“-Membranen mit alkoholhaltigem RPE-Puffer von Begleit-substanzen wie z.B. Salze, Proteine, und andere zelluläre Verunreinigungen gewaschen. Durch Zentrifugation bei höchster Umdrehung wurde das Lysat getrocknet und die RNA in RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

Weil die Inaktivierung der RNAsen sofort nach der Lyse der Zellen stattfindet, ist die Methode sehr stabil und liefert qualitativ hochwertige RNA. Sie hat sich inzwischen zur wichtigsten Methode der RNA-Isolierung etabliert. Um die vorliegende RNA-Konzentration zu erhöhen, erfolgte eine Einengung des Volumens auf 15 µl mittels eines Vakuum-Konzentrators (Speed-vac). Dabei handelt es sich um eine Tischzentrifuge, an die ein Vakuum angelegt wird. Das Vakuum führt zu einer Siedepunktniedrigung des Lösungsmittels (Wasser und Ethanol) und damit zu einem raschen Verdampfen der Flüssigkeit. Um zu verhindern, dass austretende Gasblasen die DNA-Lösungen in der gesamten Apparatur verteilen, zentrifugiert man gleichzeitig und verhindert so ein Schäumen. Gleichzeitig erfolgte eine DNase Behandlung der eingengten RNA. Dazu wurde 4 µl einer 1:10 verdünnten DNase I Lösung in das Gesamtvolumen von 50 µl isolierter RNA gegeben.

### **3.2.6 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA**

Die gewonnenen Menge an Gesamt-RNA wurde abschließend mittels Messung der Absorption bei 260 nm am Gene Quant II (RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) photometrisch gemessen.

Unter Einbeziehung der Formel (Formel 1)

$$1A_{260} = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

konnte die Konzentration durch die Formel 2:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnung in der Küvette} \times 40 = \text{ng RNA}/\mu\text{l}$$

errechnet werden. Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich somit aus der Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm, der Verdünnung und einem für DNA/RNA bzw. Oligonukleotide spezifischen Multiplikationsfaktor.

Aus der Tatsache, dass Nukleinsäuren zwei Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm in einem Verhältnis von 2:1 besitzen, und Aminosäuren ihr Absorptionsmaximum bei 280 nm aufweisen, kann man aus dem Verhältnis der  $OD_{260 \text{ nm}}$  und der  $OD_{280 \text{ nm}}$  eine Aussage über eine mögliche Proteinkontamination in der RNA-Lösung machen. Bei Verunreinigungen der RNA mit Proteinen ergibt sich eine *Ratio* der  $OD_{260 \text{ nm}} / OD_{280 \text{ nm}} \leq 2$ .

Der in unseren Messungen ermittelte Wert von  $\geq 1,9$  ergibt für unsere Zwecke einen guten Reinheitsgrad der Gesamt-RNA. Nach erfolgter Berechnung der Gesamtmenge an isolierter RNA wurden 1-3  $\mu\text{g}$  RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt.

### **3.2.7 cDNA-Synthese gemäß dem Protokoll des *first-strand cDNA Synthesis Kit***

Die Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgt über die Bindung der mRNA an Oligo-dT<sub>18</sub>-Primer. Die Oligo-dT<sub>18</sub>-Primer lagern sich an die Poly(A)-Sequenz der mRNA an und schreiben diese mittels Reverse-Transkriptase in 5' → 3' Richtung in cDNA um. Die Reverse Transkriptase, das Schlüsselenzym dieser enzymatisch katalysierten Reaktion, ist in unserem Fall eine RNA-abhängige DNA-Polymerase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT). Diese MMLV-RT hat ihr Optimum bei 37°C. Die Umschreibung erfolgt für 1 Stunde bei 37°C.

Bevor die mRNA mit den Reagenzien des *first-strand cDNA Synthesis Kit* zusammengebracht werden, wird das Reaktionsvolumen mit RNase freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 8  $\mu$ l aufgefüllt. Um restliche DNAsen zu zerstören und die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, wird der Ansatz dann für 10 Minuten auf 65°C erhitzt. Dabei wurden 3  $\mu$ g RNA-Lösung mit Nuklease-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 8  $\mu$ l gebracht und 10 min bei 65 °C erhitzt. Der für die Synthese von cDNA benötigte Mastermix setzte sich wie folgt zusammen:

- 5  $\mu$ l BULK reaction mixes [MMLV-RT, *Rnase/DNase-free BSA*, *dATP*, *dCTP*, *dGTP*, and *dTTP in aqueous buffer*]
  
- 1  $\mu$ l 200 mM DTT
  
- 1  $\mu$ l Not I-Oligo-dT<sub>18</sub>-Primer (1:25 verdünnt)

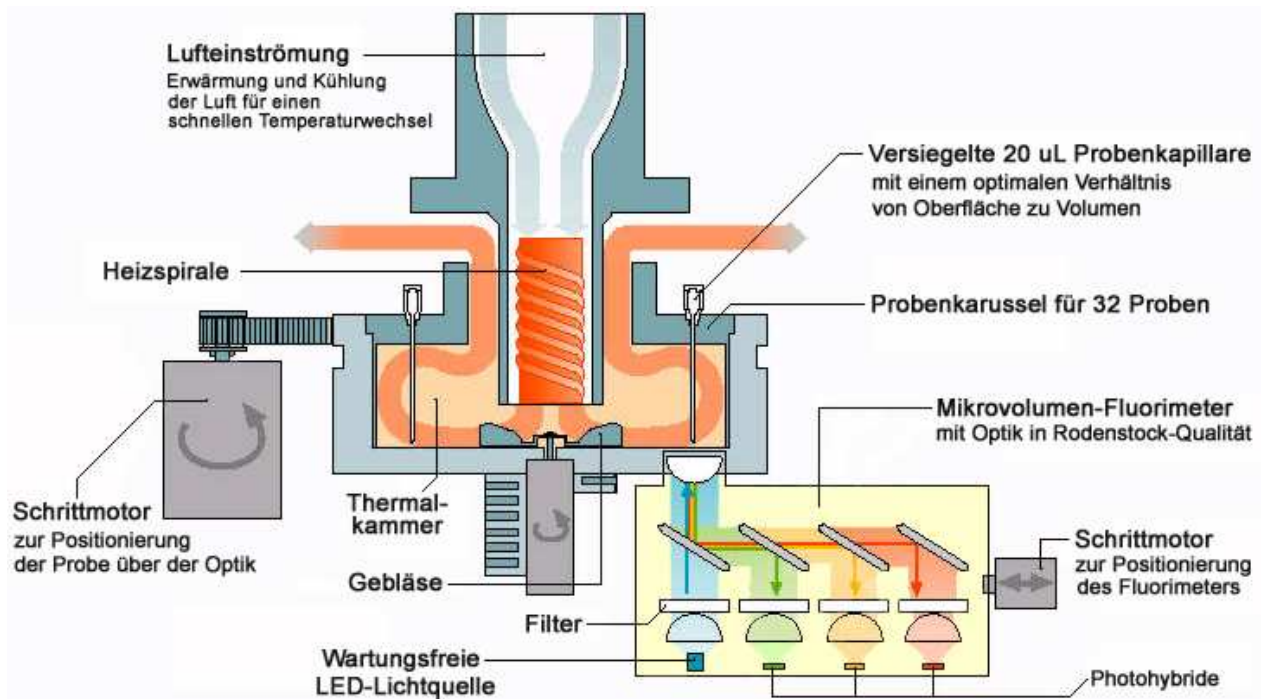
Nach erfolgreicher Denaturierung der RNA wurden je 7  $\mu$ l des Mastermixes zu der RNA-Lösung gegeben. In der Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C, dem Arbeitsoptimum der MMLV-Reverse Transkriptase erfolgt die Reverse Transkription. Die so gewonnene cDNA steht dann als Template für die RT-PCR zur Verfügung.

### **3.2.8 Aufreinigung der cDNA mit dem *High Pure PCR Product Purification Kit***

Die Reinigung der gewonnenen cDNA von Primern, restlichen Nukleotiden und Proteinen geschieht mittels Glasmilch. Das Prinzip beruht darauf, dass Glasmilch, bzw. Silica-Material in der Anwesenheit hoher Konzentrationen des chaotropen Salzes Guanidinisothiocyanat DNA binden kann. Nach einem Waschschriff mit einem Salz-Ethanol-Puffer, kann durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen die gereinigte cDNA wieder eluiert werden.

### 3.2.9 Real-Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR erfolgt eine Quantifizierung der revers transkribierten mRNA als Genexpressionsergebnis eines Stimulationsversuches. Die modernste Methode der Quantifizierung von Nucleinsäuren ist die „Real-Time PCR“. Eine mögliche Applikation für diese Methode ist der LightCycler (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland).



**Abb. 3.1: Schematische Ansicht des LightCyclers.**

Modifizierte Darstellung der Fa. Roche (ergänzt aus dem LC-Handbuch)

Der Lightcycler der Firma Roche Diagnostics besteht aus einer oberen und unteren Einheit. Die obere Einheit enthält die Heizspirale. Die untere Einheit enthält die Thermalkammer, das Fluorimeter, Antriebseinheiten, elektronische Platinen und die Stromversorgung. Die verschiedenen Komponenten sind auf einer 10mm starken, gegossenen Grundplatte aus Aluminium befestigt. Dies garantiert Stabilität, insbesondere für die Thermalkammer und das Fluorimeter.

Der LightCycler der Fa. Roche, Mannheim, ermöglicht die Durchführung einer kompletten PCR in weniger als 30 Minuten. Den Verlauf der PCR kann man über einen angeschlossenen PC direkt als quantitative „Echtzeit“ PCR (online PCR) verfolgen. Die Temperierung des Gerätes erfolgt durch einen Luftstrom. Der Aufheizprozess erfolgt durch Zufuhr von Luft, die mittels einer Heizwendel aufgeheizt wird; der Abkühlprozess erfolgt durch Zufuhr von Umgebungsluft mit Raumtemperatur. Bedingt durch die geringe Masse von Luft können sehr schnelle Temperaturwechsel innerhalb der rotationssymmetrischen Reaktionskammer erreicht werden. Durch den Einsatz von speziellen Glaskapillaren als Reaktionsgefäße wird ein besonders effizienter Temperaturtransfer ermöglicht, da diese Kapillaren ein besonders günstiges Oberflächen-zu-Volumen-Verhältnis besitzen. Dadurch können extrem kurze Zyklus-Zeiten erreicht werden. Die Glaskapillaren ermöglichen aber nicht nur den schnellen Temperaturtransfer, sondern dienen gleichzeitig als optisches Element. Ähnlich einer Glasfaseroptik wird die resultierende Fluoreszenz reflektiert und konzentriert an die Spitze der Kapillare geleitet. Durch das emittierte Licht der LED (Licht-emittierende Diode) des Fluorimeters mit einer Wellenlänge von 470 nm, welches über eine Linse auf die Spitze der Kapillare fokussiert wird, wird ein entsprechender Fluoreszenz-Farbstoff in der Kapillare angeregt. Die von der Probe ausgesandte Fluoreszenz wird dann von derselben Linse wieder gesammelt, über dichrotische Filter geleitet und an Photohybriddetektoren weitergeleitet. Die optische Einheit enthält drei Filtersysteme für 530, 640 und 710 nm, so dass eine Detektion von drei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen möglich ist. Die Fluoreszenz kann entweder einmal pro Zyklus zu unterschiedlichen Zeitpunkten oder in Form eines kontinuierlichen Messvorgangs, z.B. zum Aufnehmen einer Schmelzkurve gemessen werden.



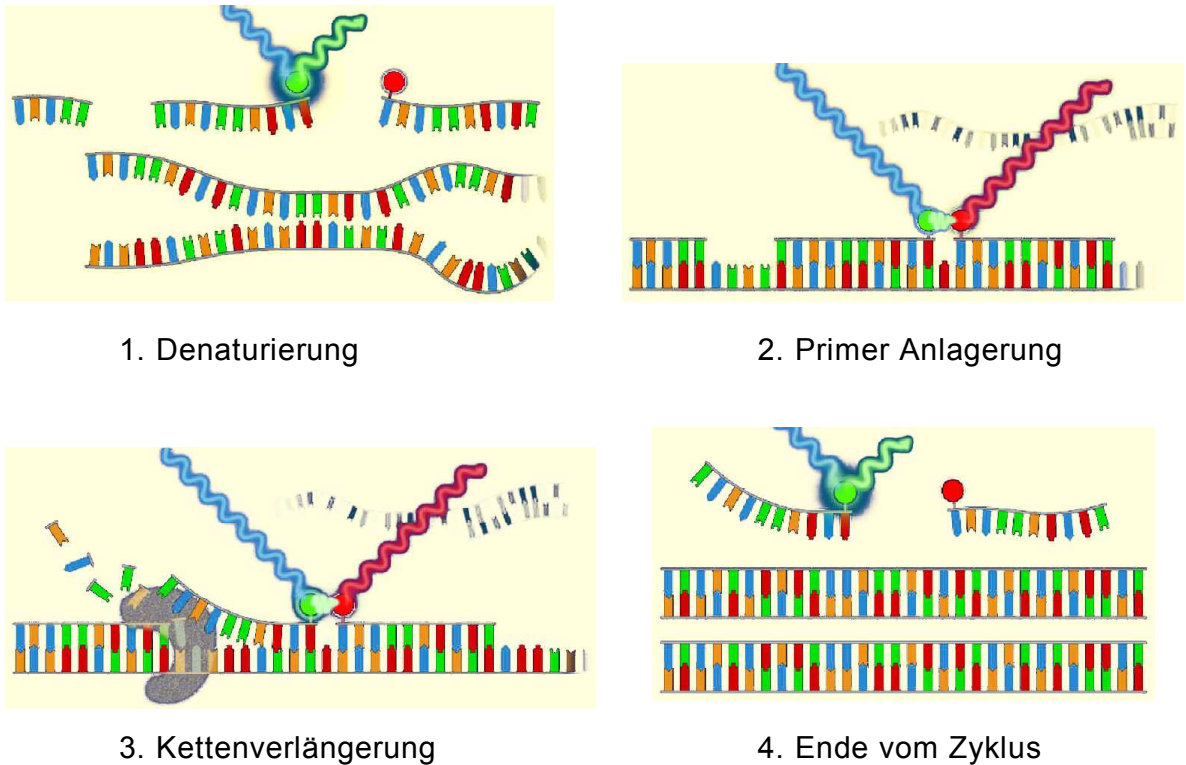
Als Quantifizierungs-Messprinzip von hNIS und GAPDH wählten wir Primer und Hybridisierungs sonden aus der Vorarbeit der Arbeitsgruppe Seissler/Wagner.

<b>Primer u. Sonden</b>	<b>Sequenz</b>
GAPDH 1 for	5'- ttg gta tcg tgg aag gac tca
GAPDH 1 rev	5'- tgt cat cat att tgg cag gtt t
GAPDH FL	5'- tgt ccc cac tgc caa cgt gtc ag -3'-Fluor
GAPDH LC	5'- LC Red640-ggt gga cct gac ctg ccg tct aga
hNIS F	5'- gcc tca cca gca cct acg ag
hNIS R	5'- cag aat gta tag cgg ctc ctc g
HNIS FL	5'- cac tta gca tca cca cga cct gga ac -3'-Fluor
HNIS LC	5'- LC Red640- cat cag ttc aga cca cag cct tca tg

**Tab. 3.1: Oligonukleotidsequenz der Primer und Sonden für hNIS bzw. GAPDH.**

Das resultierende PCR-Produkt ist ca. 200 bis 300 bp lang und liegt innerhalb des klonierten Bereichs. Die ausgesuchten Primer hatten eine Länge von 20 bis 25 Nukleotiden und einen GC-Gehalt (Guanin-Cytosin-Gehalt) zwischen 50 und 60%.

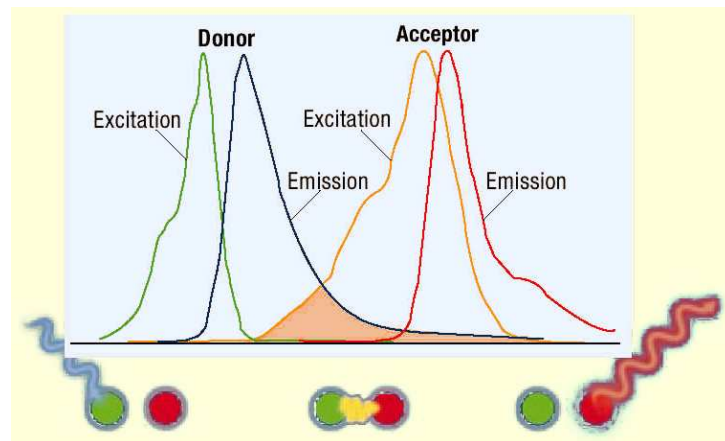
Die Verwendung von markierten Sonden (Hybridisierungsproben) ermöglicht die spezifische Detektion von PCR-Produkten. Die Lage der Hybridisierungsproben wurde so gewählt, dass sie innerhalb des durch die Primer begrenzten Fragmentes liegen und somit zu einer Erhöhung der Spezifität für das PCR-Produkt führen.



**Abb. 3.2: Schematischer Ablauf einer PCR mit Hybridisierungsproben.**

Bei den Hybridisierungsproben handelt es sich um zwei sequenz-spezifische, mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide. Diese binden sich zwischen den beiden Primern an die Ziel-DNA. Während die erste Sonde, markiert mit dem Donorfarbstoff Fluorescein, sich an das 3'-Ende bindet, trägt die zweite Sonde an dem 5'-Ende den Akzeptorfarbstoff LightCycler-Red (LC-Red 640). Aufgrund der Kopf-an-Schwanz-Anordnung der Sonden befinden sich beide in der Primerannealingphase in räumlicher Nähe zueinander. Der Abstand zwischen den beiden Sonden sollte maximal ca. 5 Nukleotide betragen. Binden sich beiden Sonden an die Ziel-DNA und regt man gleichzeitig den Donorfarbstoff Fluorescein der ersten Sonde an, emittiert dieses keine Fluoreszenz, sondern überträgt die Energie aufgrund der räumlichen Nähe auf die benachbarte zweite Sonde. Dieser Energietransfer von Donorsonde auf die Akzeptorsonde basiert auf dem sogenannten Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Prinzip (kurz: „FRET“). Die Akzeptorsonde emittiert nun rote Fluoreszenz, deren Intensität in Summe direkt proportional der

Menge an Amplifikat ist (De Silva *et al.*, 1998; Caplin *et al.*, 1999). Die Detektion dieser bestimmten Wellenlänge erfolgt durch eine optische Einheit am LightCycler-Gerät.



**Abb. 3.3: Zeitlicher Ablauf einer PCR mit Hybridisierungsproben.**

Donor: Spender  
 Acceptor: Empfänger  
 Excitation: Anregungszustand  
 Emission: Emissionszustand

Neben den gewählten spezifischen Primer und Hybridisierungssonden benötigen wir zur Quantifizierung des Expressionsverhaltens mit dem humanen Symporter einen externen Standard.

Das Prinzip beruht darauf, dass das Zielgen über einen bekannten Orientierungspunkt bzw. externen Standard, dessen Kopienzahl bekannt ist, bezogen und somit quantifiziert werden kann. In unserem Fall haben wir als externen Standard das Haushaltsgen („house-keeping“-gen) Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) gewählt. Von diesem nimmt man an, dass es in den untersuchten Ansätzen in einer konstanten Menge exprimiert wird (Bustin *et al.*, 2000). Die Menge an spezifischem Produkt, in unserem Fall des Natrium-Jodid-Symporters (NIS) wird dann auf die konstante Menge des Haushaltsgen bezogen. Als Standard fungieren sowohl für das Target-Gen hNIS als auch für das „house-keeping“-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase

(GAPDH) die klonierten PCR-Fragmente aus der Arbeitsgruppe Seissler/Wagner (Wagner *et al.*, 2002).

Die PCR-Fragmente sind aus isolierter RNA der Schilddrüsenkarzinomlinie FTC133 über eine Reverse Transkription in eine komplementäre DNA (cDNA) und Einbau in einen Klonierungsvektor mit Hilfe der Gen-Datenbank (unter Anwendung des Winstar Quickprime Programm) Oligonukleotidprimer über eine Polymerasekettenreaktion amplifiziert worden. Damit sowohl eine optimale Effizienz in der PCR erreicht wird, als auch einen Vergleich der zu messenden cDNA-Proben zu ermöglichen, wurden die Plasmidstandards linearisiert und der DNA-Gehalt spektrophotometrisch bestimmt. Die vorliegende Kopienzahl wurde über folgende Formel berechnet:

$$\text{Kopienzahl}/\mu\text{l} = \text{Konzentration (g}/\mu\text{l}) / \text{Plasmidgröße (nt)} * 660 \text{ g/mol}$$

Die Konzentration des entsprechenden Standard wurde auf  $10^{10}$  Kopien/2  $\mu\text{l}$  eingestellt, zu je 10  $\mu\text{l}$  in silanisierten Einmal-Reaktionsgefäßen aliquotiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Bei Bedarf wurde eine serielle Verdünnung in Zehnerschritten hergestellt und 2  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Verdünnungsstufen in die PCR eingesetzt.

Für einen Real-Time-PCR-Ansatz auf GAPDH benötigte man folgendes Reaktionsgemisch:

Matrizen-DNA (cDNA-GAPDH-Standard)	2,0 $\mu\text{l}$
FastStart DNA Master Hybridization Probe	2,0 $\mu\text{l}$
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,6 $\mu\text{l}$
Primer sense (5 $\mu\text{M}$ )	1,0 $\mu\text{l}$
Primer antisense (5 $\mu\text{M}$ )	1,0 $\mu\text{l}$
GAPDH-Sonde FL (2 $\mu\text{M}$ )	2,0 $\mu\text{l}$
GAPDH-Sonde LC (2 $\mu\text{M}$ )	2,0 $\mu\text{l}$
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu\text{l}$

Im Fall von hNIS wurde folgendes Reaktionsgemisch vorgelegt:

Matrizen-DNA (cDNA-hNIS-Standard)	2,0 $\mu$ l
FastStart DNA Master Hybridization Probe	2,0 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,0 $\mu$ l
Primer sense (5 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l
Primer antisense (5 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l
NIS-Sonde FL (2 $\mu$ M)	2,0 $\mu$ l
NIS-Sonde LC (2 $\mu$ M)	2,0 $\mu$ l
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Die eingesetzten Primerpaar-Kombinationen und Primerkonzentrationen mit der dazugehörigen Annealingtemperatur, die Magnesiumchlorid-Konzentration für die eingesetzten DNA-Polymerasen der jeweiligen GAPDH- bzw. hNIS-Reaktionsgemische, sowie die Ermittlung der Inter- und Intra-Assayvariationskoeffizienten zur Real-Time PCR auf hNIS wurden in den Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe Seissler/Wagner optimiert und etabliert (Wagner *et al.*, 2002).

Alle Lösungen werden in speziellen Zentrifugenadaptern gekühlten Glaskapillaren pipettiert, für 15 Sekunden bei 2.900 rpm zentrifugiert und in das Carousel des LightCyclers gegeben und das PCR-Programm gestartet. Auf den Abbildungen 3.4 und 3.5 sind die optimierten Real-Time-PCR Profile für die GAPDH- bzw. hNIS-Läufe aus der LightCycler Software abgebildet.

**Denaturierung**

Cycles	1						
Type:	None	Fluorescence Display Mode =				F7A	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

**PCR**

Cycles	32						
Type:	Quantification	Fluorescence Display Mode =				F7A	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	60	12	20	0	0	0	Single
3	72	17	20	0	0	0	None

**Abkühlung**

Cycles	1						
Type:	None	Fluorescence Display Mode =				F7A	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	30	20	0	0	0	None

**Abb. 3.4: Optimiertes Real-Time-PCR Profil für GAPDH (LC-Software).****Denaturierung**

Cycles	1						
Type:	None	Fluorescence Display Mode =				F7A	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	600	20	0	0	0	None

**PCR**

Cycles	41						
Type:	Quantification	Fluorescence Display Mode =				F7A	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	95	10	20	0	0	0	None
2	60	10	20	0	0	0	Single
3	72	15	20	0	0	0	None

**Abkühlung**

Cycles	1						
Type:	None	Fluorescence Display Mode =				F7A	
Segment Number	Temperature Target (°C)	Hold Time (sec)	Slope (C°/sec)	2° Target Temp (°C)	Step Size (C°)	Step Delay (Cycles)	Acquisition Mode
1	40	60	20	0	0	0	None

**Abb. 3.5: Optimiertes Real-Time-PCR Profil für hNIS (LC-Software).**

### **3.3 Statistische Auswertung**

Die statistischen Auswertungen der Messergebnisse wurde mit Hilfe von Origin (MicroCal/OriginLab) und Excel (Microsoft) durchgeführt. Der ungepaarten Student´ t-test wurde angewandt, dabei galten p-Werte, die kleiner als 0,05 waren, als statistisch signifikant.

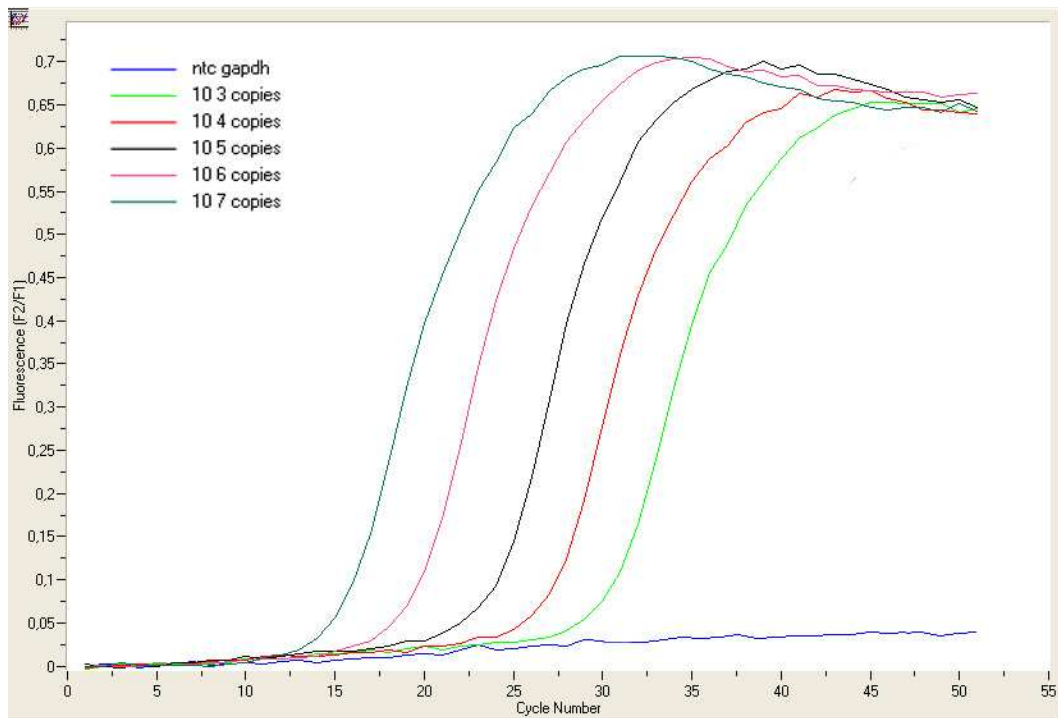
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Quantifizierung, PCR-Effizienz und PCR-Fehler

Wie im Material und Methodenteil beschrieben, erfolgte direkt nach der operativen Entnahme von menschlichen euthyreoten Strumae colloides nodosa die Isolation von Thyreozyten. Nach entsprechender Kultivierung und Inkubation innerhalb von ca. 2 Wochen, wurden die Thyreozyten auf eine definierte Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well ausgesät, und nach einer Adaptionszeit von ca. 24 Std. 10 mU/ml bTSH zugesetzt. Nach 24-stündiger Vorinkubation mit bTSH wurde nach einem Wechsel des Kulturmediums die Stimulation der Zellen mit Forskolin als Positivkontrolle (10  $\mu$ mol), IL-1 $\alpha$ , und IL-2 (1000, 100 und 10 U/ml) durchgeführt. Nach weiteren 48 Stunden Inkubation erfolgte die RNA Isolierung, wie unter Punkt 3.2.5 beschrieben. Die isolierte RNA wurde aufgereinigt, in die cDNA umgeschrieben und abschließend als Template in den Real-Time-PCR-Lauf eingesetzt. Im Gegensatz zur herkömmlichen semiquantitativen PCR hat die Real-Time-PCR den Vorteil, innerhalb der log-linearen Phase des PCR-Laufes eine visuelle Bestimmung der PCR-Produkte zu ermöglichen. Durch den Vergleich der PCR-Profile der einzelnen cDNA-Proben mit denen der Verdünnungsreihe des homologen, externen Standards kann die Anzahl der vorliegenden cDNA-Kopien mit einer Genauigkeit und Schnelligkeit bestimmt werden, wie sie innerhalb der herkömmlichen PCR nicht erreicht werden kann.

Zur Berechnung der GAPDH-Kopienzahl wurden 40 ng cDNA in die Real-Time-PCR gegeben. Zur Bestimmung der hNIS-Amplifikation wurden 200-250 ng cDNA benötigt. Parallel zu jedem PCR-Lauf wurde eine Wasserkontrolle („ntc“) und eine Verdünnungsreihe des jeweiligen, homologen Standards mitbestimmt. Im Fall von hNIS umfasste die Standardkurve  $10^6$  bis  $10^2$  Kopien, von GAPDH von  $10^7$  bis  $10^3$  Kopien.



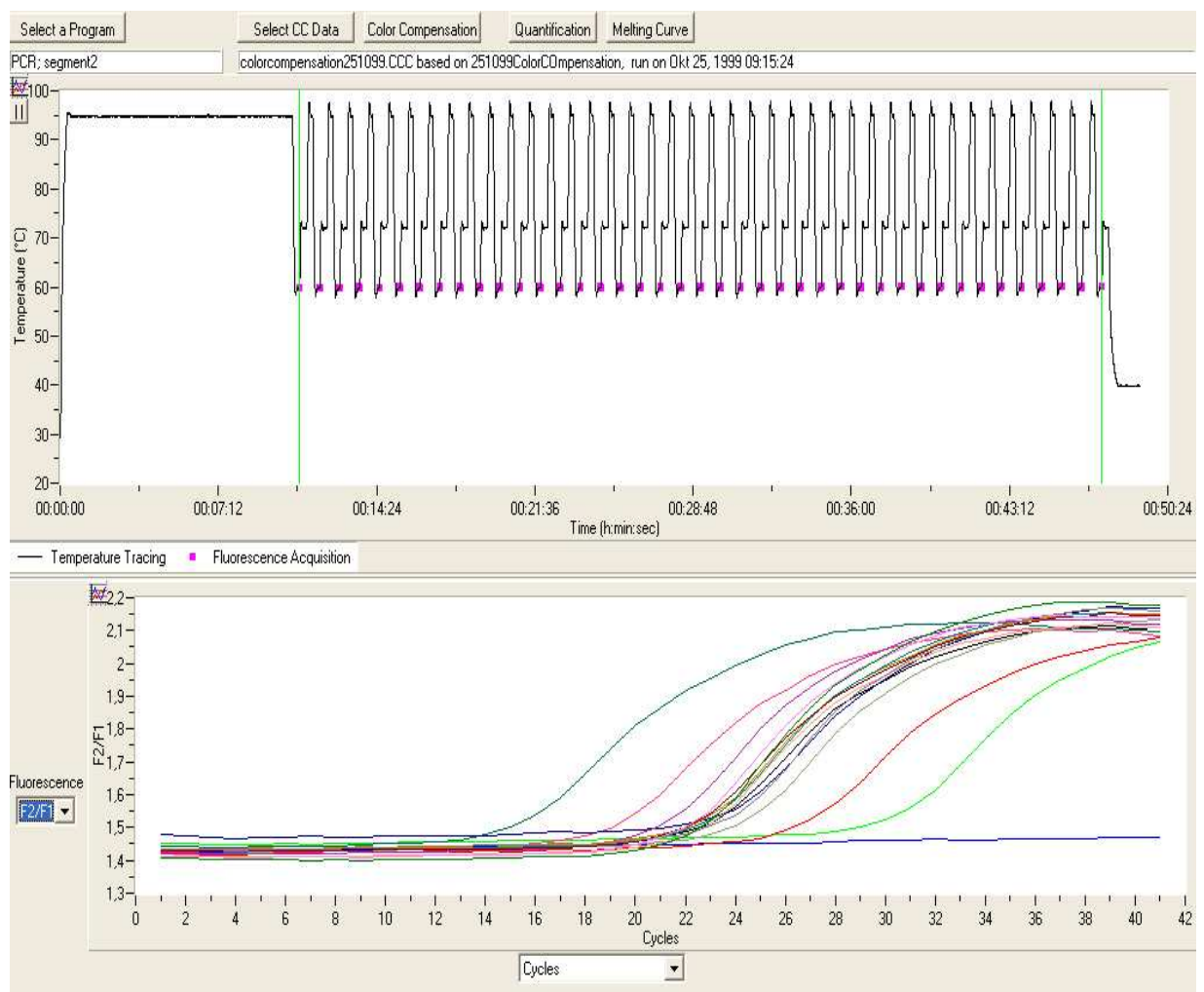


**Abb. 4.1: Real-Time-PCR Lauf; Dargestellung mittels der LightCycler-Software.**

Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl während einer Real-Time-PCR. Die GAPDH-Standardkurven umfassen  $10^7$  bis  $10^3$  Kopien, in dessen Bereich später die Stimulationskurven erwartet werden. ntc ist die mitgeführte Wasserkontrolle.

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der LightCycler Software LCDA (Version 3.1.102) mit dem Analysemodul der „Fit Points“-Methode. Aus der Eichgerade kann die Konzentrationen der vorliegenden Proben bestimmt werden. Die resultierenden Kopienzahlen für hNIS wurden auf GAPDH normalisiert, in dem sie mit einem Korrekturfaktor verrechnet wurden, so dass als Ergebnis die hNIS-Kopienzahl pro 1 Mio. GAPDH-Kopien angegeben wurde.

Alle durchgeführten Real-Time-PCR-Läufe sind wie in der Abbildung 4.2 und 4.1 als „Echtzeit“ PCR (online PCR) mit Hilfe der LightCycler Software während des Laufes zu beobachten.



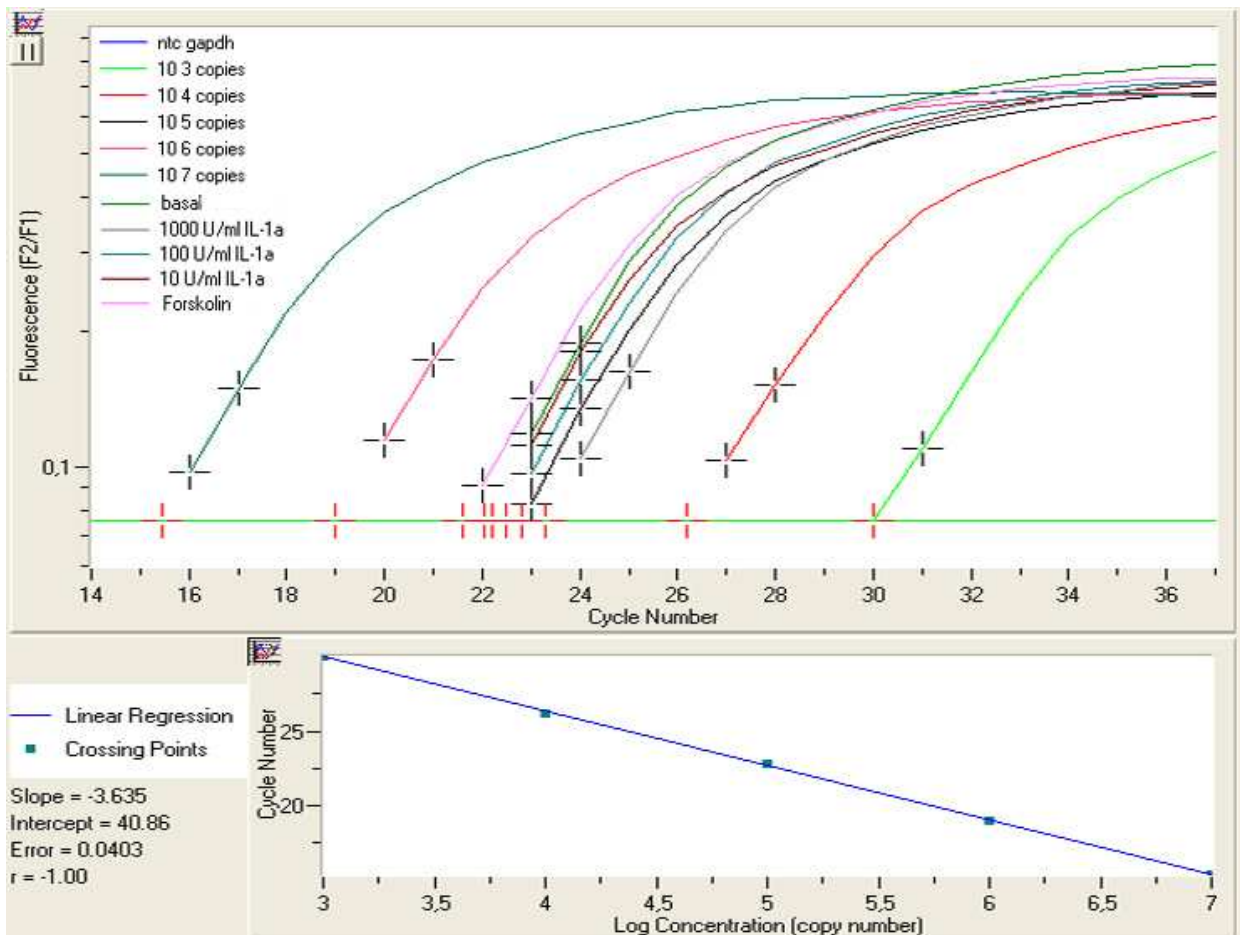
**Abb. 4.2: Real-Time-PCR Lauf; dargestellt mittels der LightCycler-Software.**

(Legende s. Abb. 4.3)

Oberes Fenster: Dargestellt ist der PCR-Lauf mit der Temperaturveränderung über die Zeit.

Unteres Fenster: Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz ( $F_2/F_1$ ) über die Zykluszahl. Diese kann als „Echtzeit“ PCR (online PCR) verfolgt werden.

Exemplarisch für alle durchgeführten Real-Time-PCR-Läufe ist in der Abb. 4.3 die Auswertung der Real-Time-PCR über die „Fit Points“-Methode dargestellt. Diese Methode kommt vor allem dann zum tragen, wenn die Quantifizierung in einem Kopienbereich von weniger als 1000 Kopien erfolgt.



**Abb. 4.3: „Analysis Mode“ Auswertung über die „Fit Points“-Methode.**

Oberes Fenster:

Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl während einer Real-Time-PCR mit der Darstellung der „Noise Band“.

Unteres Fenster:

Standardkurve dargestellt als Logarithmus der Kopienzahl über die Zykluszahl. Angabe der Steigung; Schnittpunkt mit der Y-Achse und des PCR-Fehlers.

Aus dem „Analysis Modul“ der LightCycler Software kann aus der Steigung der Geraden (Y-Achse) im weiteren die PCR-Effizienz berechnet werden. Hierbei wird der Schnittpunkt der log-linearen Phase mit der „Noise Band“ festgelegt. Dieser Schnittpunkt wird als  $C_T$ -Wert angegeben und bezeichnet den Punkt, an dem ein PCR-Signal klar vom Hintergrund getrennt werden kann. Aus der Steigung der linearen Regression über die Auftragung der  $C_T$ -Werte gegen den dekadischen Logarithmus der Kopienzahl lässt sich die PCR-Effizienz nach folgender Formel errechnen:

$$\text{PCR-Effizienz} = \log_{10}^{1/\text{Steigung der linearen Regression (Slope)}}$$

Die optimale PCR-Effizienz liegt zwischen 1,8 und 2,0. In dem abgebildeten PCR-Lauf liegt sie bei 1,8.

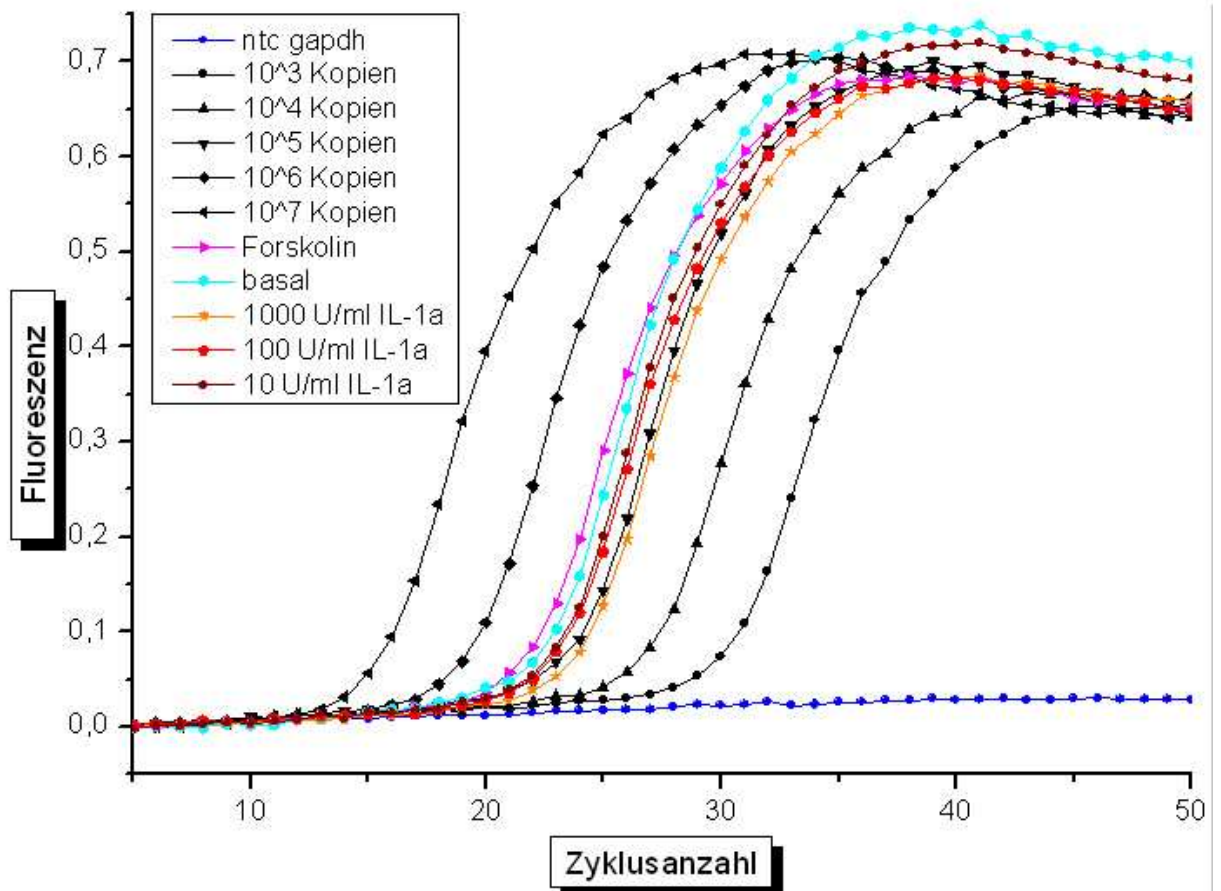
Ein weiterer Parameter, als Maß für die Qualität der Real-Time-PCR, ist der PCR-Fehler ("error"). Im Falle einer optimalen PCR sollte er kleiner 0,3 sein. In dem abgebildeten PCR-Lauf beträgt er 0,04.

## 4.2 Darstellung der Stimulationskurven IL-1 $\alpha$ und IL-2

Nachfolgend sind die Stimulationskurven eines ausgewählten Real-Time-PCR Laufes dargestellt. Zur Quantifizierung der Symportexpression führten wir eine Normalisierung der hNIS-PCR Resultate auf das "house keeping"-Gen GAPDH durch.

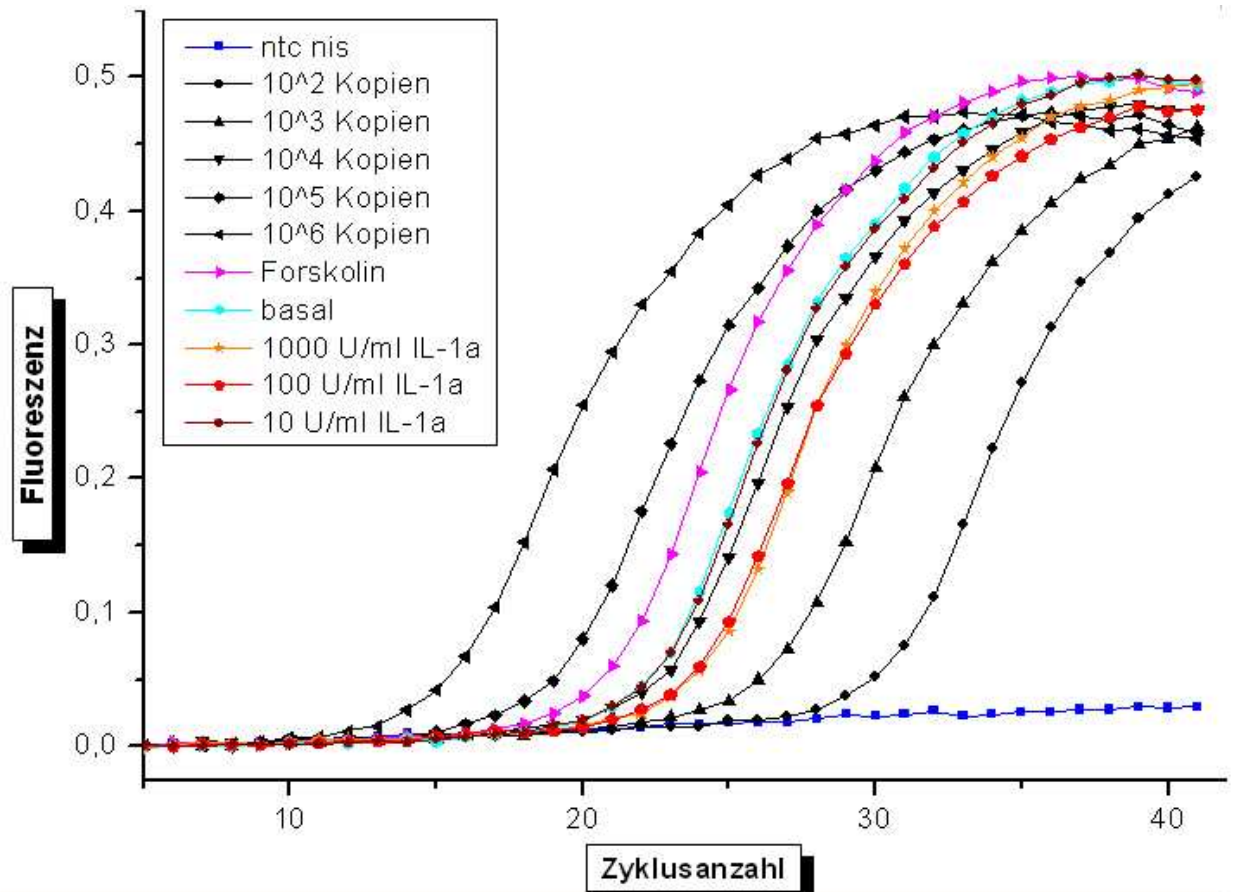
Aus insgesamt 14 Läufen wurden die Kopienzahlen ermittelt und unter Beziehung auf eine Million GAPDH-Kopien die Gesamtmengen an hNIS errechnet. Die Ergebnisse wurden statistisch ausgewertet und gemäss dem Abschnitt 4.3 zusammengefasst.

#### 4.2.1 Stimulationen GAPDH und NIS mit IL-1 $\alpha$



**Abb. 4.4:** Stimulationen GAPDH mit IL-1 $\alpha$ .

Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl während einer Real-Time-PCR. Die GAPDH-Standardkurve umfasst  $10^7$  bis  $10^3$  Kopien. ntc ist die mitgeführte Wasserkontrolle. Die Stimulationen für den Basalwert, 10 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml von IL-1 $\alpha$ , sowie von der Positivkontrolle Forskolin liegen um den Bereich von  $10^5$  GAPDH-Standard-Kopien.



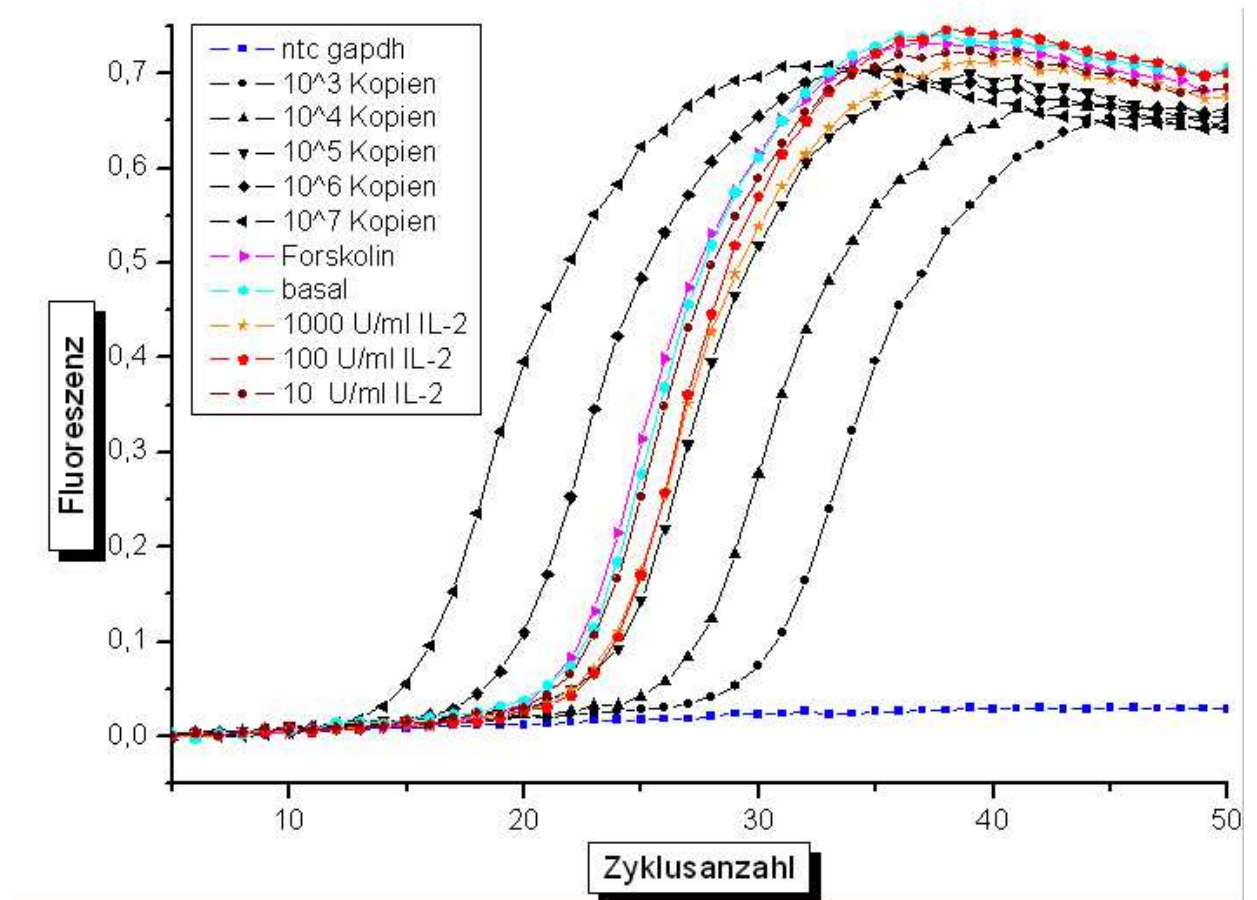
**Abb. 4.5: Stimulationen hNIS mit IL-1 $\alpha$ .**

Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl. Die hNIS-Standardkurve umfasst  $10^6$  bis  $10^2$  Kopien. ntc ist die mitgeführte Wasserkontrolle.

Die Stimulationen für den Basalwert, 10 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml von IL-1 $\alpha$ , sowie von der Positivkontrolle Forskolin liegen um den Bereich von  $10^4$  hNIS-Standard-Kopien.



### 4.2.1 Stimulationen GAPDH und NIS mit IL-2



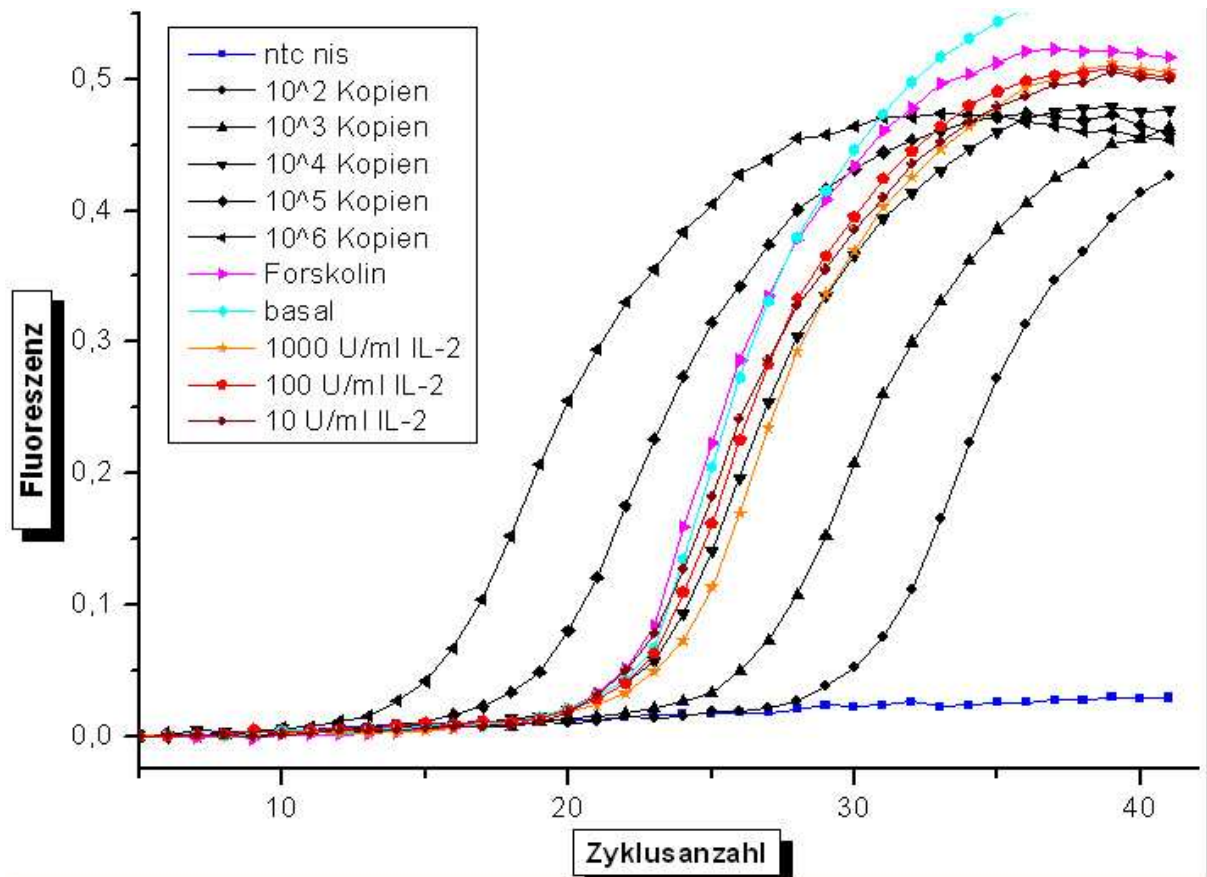
**Abb. 4.6: Stimulationen GAPDH mit IL-2.**

Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl. Die GAPDH-Standardkurve umfasst  $10^7$  bis  $10^3$  Kopien.

ntc ist die mitgeführte Wasserkontrolle.

Die Stimulationen für den Basalwert, 10 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml von IL-2, sowie von der Positivkontrolle Forskolin liegen zwischen den Bereich von  $10^6$  und  $10^5$  GAPDH-Standardkopien.





**Abb. 4.7: Stimulationen hNIS mit IL-2.**

Dargestellt ist die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zykluszahl. Die hNIS-Standardkurve umfasst  $10^6$  bis  $10^2$  Kopien.

ntc ist die mitgeführte Wasserkontrolle.

Die Stimulationen für den Basalwert, 10 U/ml, 100 U/ml, 1000 U/ml von IL-1 $\alpha$ , sowie von der Positivkontrolle Forskolin liegen um den Bereich von  $10^4$  hNIS-Standard-Kopien.

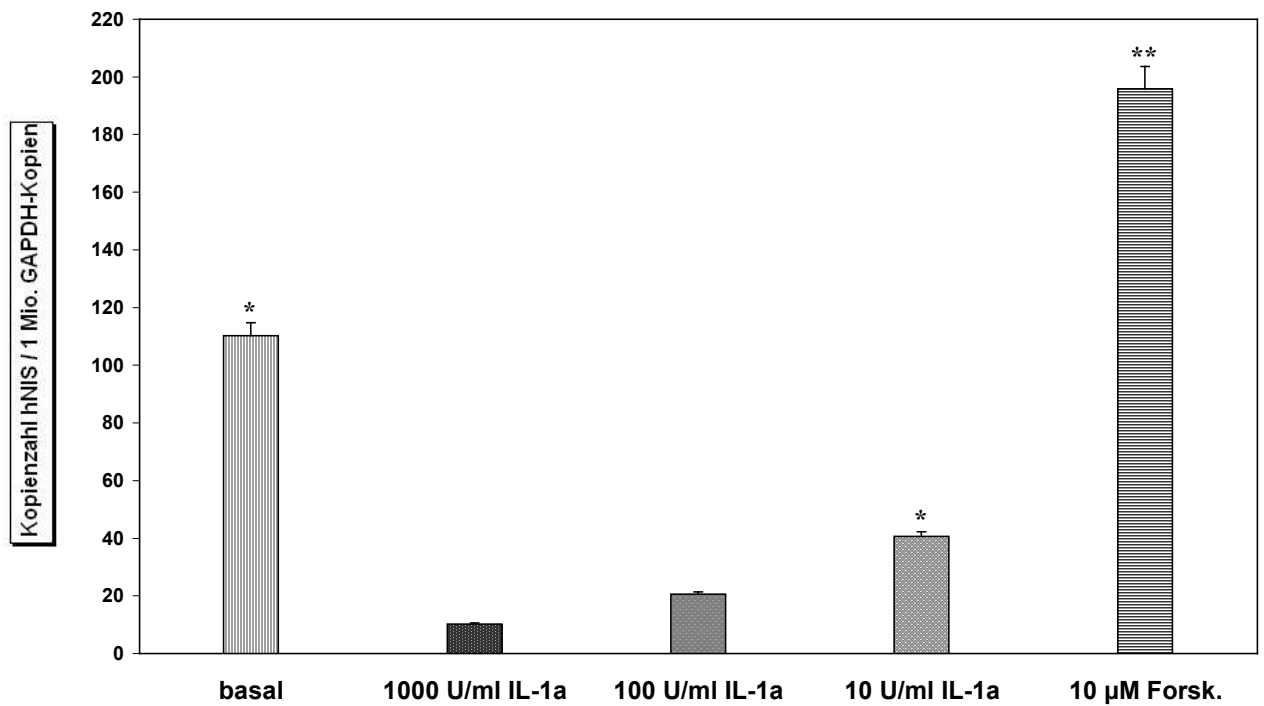
### 4.3 Der Einfluß der Interleukine 1 $\alpha$ und 2 auf die hNIS-Expression

Nach Auswertung der Real-Time-PCR-Läufe mit 14 frisch operierten euthyreoten Strumen, die parallel mit IL-1 $\alpha$  und IL-2 stimuliert wurden, kann als Ergebnis formuliert werden, dass die hNIS-Expression nach Zugabe von IL-1 $\alpha$  und IL-2 inhibiert wird.

Für die bessere Erfassung der Inhibitionseffekte wurden die Zellen für 24h mit bTSH vorinkubiert. bTSH bindet an seinen spezifischen TSH-Rezeptor und bewirkt intrazellulär die Freisetzung von cAMP, welches die Energie für den Symporter bereitstellt.

Die Downregulation wurde nach 48 Stunden Stimulation untersucht; bei beiden Interleukinen folgt sie einer Konzentrationsabhängigkeit (s. Abb. 4.8, 4.9, 4.10). Während die Zugabe von 10 U/ml IL-1 $\alpha$  die Expression des hNIS bezogen auf den Basalwert um 60,3 % reduziert, so beträgt sie bei 100 U/ml IL-1 $\alpha$  81,4 % und bei 1000 U/ml 90,9 %. Für IL-2 findet sich nach Zugabe von 10 U/ml eine 64,7 % Reduktion, bei 100 U/ml eine 75,1 %, und bei 1000 U/ml eine 80,1 % Reduktion.

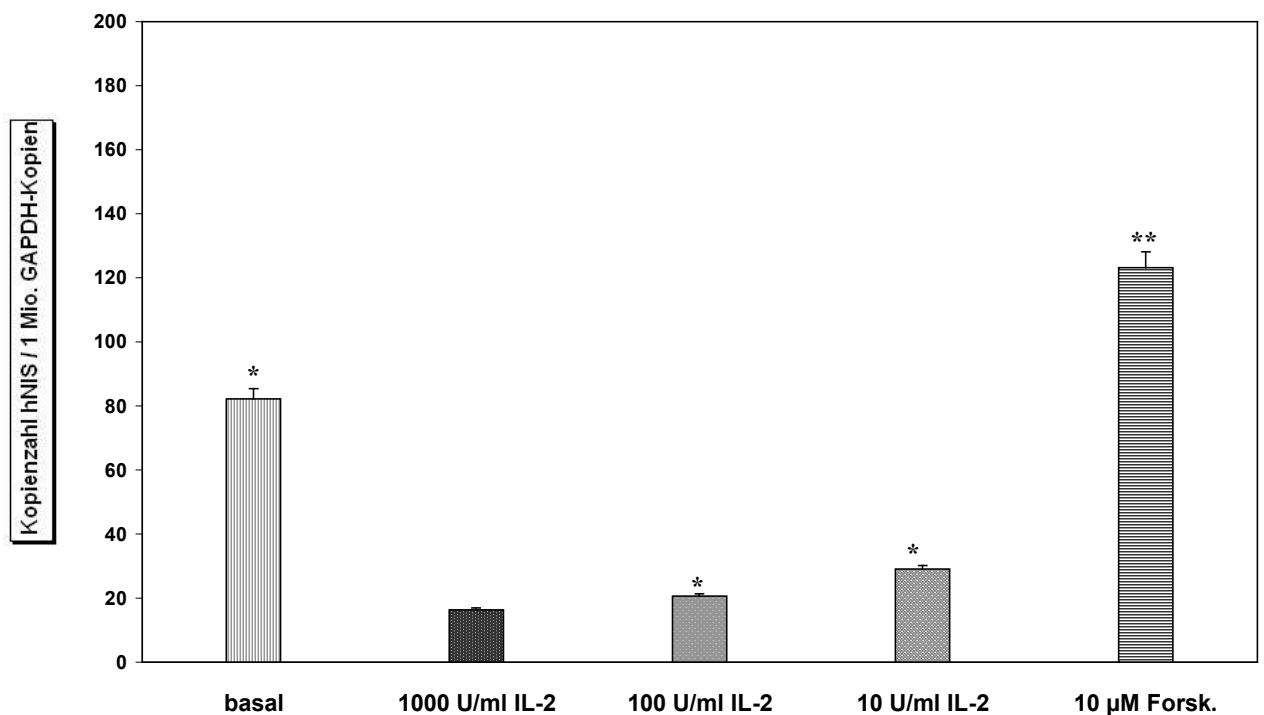
Die Positivkontrolle in unseren Stimulationsversuchen zur Untersuchung der Wirkungsweise der potenten Inhibitoren IL-1 $\alpha$  und IL-2 ist Forskolin. Dieses stimuliert über die Adenylatcyclase-cAMP-Kaskade die Expressierung des TSH-Rezeptors und führt somit zu einer erhöhten Expression des humanen Symporters. In unseren Versuchen wählten wir eine Dosierung von 10  $\mu$ M. Bei dieser Dosierung hat sich in den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Wagner/Seissler mit menschlichen Thyreozyten und in der Literatur mit FRTL-5 Zellen (Ajjan et al, 1998a) die maximale Stimulation gezeigt. Eine Erhöhung der Dosierung führt zu einer Sättigung der humanen Symporter-Expression. In unseren Stimulationsversuchen erreichten wir eine Hochregulation des hNIS von bis zu 80% gegenüber dem Basalwert, dies entspricht einem Stimulationsfaktor von 1,8.



**Abb.4.8: Inhibition der hNIS -Expression nach Zugabe von IL-1 $\alpha$ .**

Angegeben ist die hNIS-Kopienzahl bezogen auf 1 Mio. GAPDH-Kopien (n = 14);

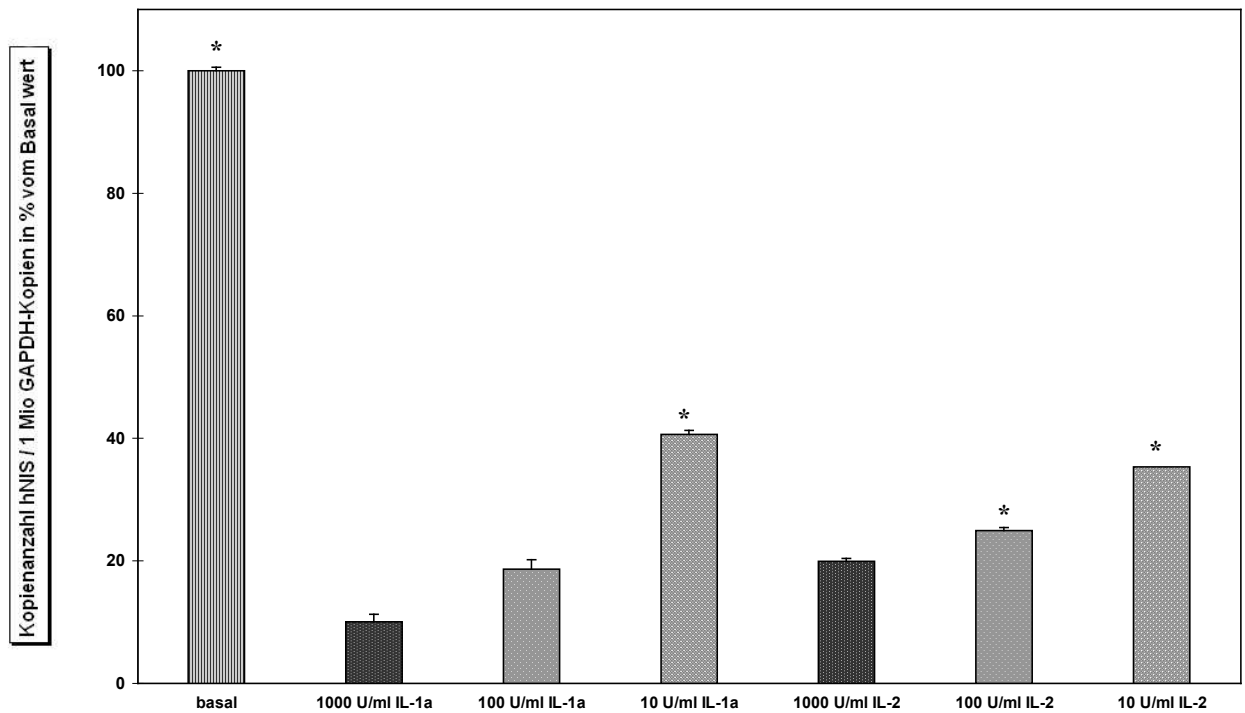
\* p < 0,05 vs. Basalwert, \*\* p < 0,005 vs. Basalwert



**Abb.4.9: Inhibition der hNIS -Expression nach Zugabe von IL-2.**

Angegeben ist die hNIS-Kopienzahl bezogen auf 1 Mio. GAPDH-Kopien (n = 14);

\* p < 0,05 vs. Basalwert, \*\* p < 0,005 vs. Basalwert



**Abb.4.10: Inhibition der hNIS-Expression nach Zugabe von IL-1 $\alpha$  bzw. IL-2.**

Angegeben sind die mRNA-Werte des hNIS in % vom Basalwert (n = 14);  
\* p < 0,05 vs. Basalwert.

## 5 Diskussion

Im Jahr 1996 wurde von Dai *et al.* das Gen des sogenannten „Natrium-Jodid-Symporters“ (NIS) kloniert. NIS ist als integrales Membranprotein mit 13 Transmembrandomänen in der basolateralen Membran der Schilddrüsenfollikelzellen verankert und ermöglicht den Jodidtransport in die Schilddrüse, welches für die Schilddrüsenhormonsynthese T3 und T4 bereitgestellt werden muß. Die treibende Kraft für diesen Transport entgegen seines elektrochemischen Gradienten ins Zellinnere wird durch eine Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase aufrecht erhalten. Bereits vor der Klonierung des NIS-Gens wurde die Regulation des Jodidtransportes in die Schilddrüse intensiv untersucht.

Aufgrund der wichtigen Rolle des Symporters in der Physiologie der Schilddrüse haben viele Autoren die Hypothese aufgestellt, daß eine Veränderung der NIS-Expression bzw. Funktion, infolge von Mutationen, Ursache eines breiten Spektrums an Schilddrüsenerkrankungen sein könnte. Schon vor der Klonierung des hNIS wurden 37 Fälle von Hypothyreosen (aus 22 Familien) einem Defekt in der Jodidaufnahme zugeschrieben (Matsuda *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 1983). Nach der Klonierung des humanen NIS konnten 6 unterschiedliche Mutationen der Keimbahn identifiziert werden, die zu einer gestörten Jodidaufnahme führten (Fujiwara H. *et al.*; 1997; Matsuda *et al.*, 1997; Pohlenz *et al.*, 1997; Pohlenz *et al.*, 1998). In nicht verwandten Familien wurden Substitutionen von einem einzelnen Nukleotid (T354P) innerhalb der neunten transmembranen Domäne gefunden (Fujiwara *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1998). Diese Erkenntnis deutet darauf hin, daß eine Mutation an dieser Stelle zum Funktionsverlust führen könnte. Im Falle von homozygot auftretenden Mutationen, manifestiert sich das klinische Bild der Hypothyreose besonders ausgeprägt (Fujiwara *et al.*, 1997; Pohlenz *et al.*, 1997; Matsuda *et al.*, 1997). Von den Autoren wurde beschrieben, daß Patienten bei einer sehr hohen Jodidversorgung euthyreot werden. Dies kann darauf hindeuten, dass Kompensationsmechanismen einen Jodidtransport ermöglichen (Pohlenz *et al.*, 1997); auf zellulärer Ebene ist der Mechanismus

zellulärer Ebene ist der Mechanismus dafür bisher unbekannt. Matsuda *et al.* beschrieben 1997 in einer der erkrankten Schilddrüsen eine gesteigerte Expression der NIS mRNA. Daher wurde diskutiert, daß das mutierte NIS eine Restfunktion hat und eine Überexpression des NIS-Proteins zu einer ausreichenden Jodidaufnahme führen kann (Matsuda *et al.*, 1997).

Seit der Klonierung des NIS-Gens und der Verfügbarkeit von NIS-Antikörpern sind Untersuchungen zur NIS-Expression in verschiedenen benignen und malignen Schilddrüsengeweben möglich. Normales Schilddrüsengewebe zeigt eine heterogene NIS-Expression an der basolateralen Membran einzelner Schilddrüsenfollikelzellen. Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus Basedow zeigt eine um den Faktor 3 bis 4 gesteigerte basolaterale NIS Expression in nahezu allen Schilddrüsenfollikeln entsprechend der klinischen Beobachtung einer diffus erhöhten Radiojodaufnahme bei florider Basedow-Hyperthyreose (Saito *et al.*, 1997a; Joba *et al.*, 1999). Die Hashimoto-Thyreoiditis (HT) zeigt ein niedrigeres NIS-Expressionsniveau mit ähnlicher Verteilung wie in der normalen Schilddrüse, wobei NIS-exprimierende Zellen auffallend häufig in der Nähe von lymphozytäre Infiltraten lokalisiert sind (Caillou *et al.*, 1998). NIS ist auch als mögliches Antigen bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (autoimmune thyroid disease; AITD); vor allem bei der Hashimoto-Thyreoiditis und beim Morbus Basedow untersucht worden. AITD sind durch Antikörper gegen Thyreoglobulin (TG), Schilddrüsenperoxidase (TPO) und den TSH-Rezeptor (TSHR) charakterisiert. In Knotenstrumen ist die NIS-Expression ebenfalls heterogen, aber höher als im normalen Schilddrüsengewebe (Lazar *et al.*, 1999).

In autonomen Adenomen der Schilddrüse mit erhöhtem Technetium-Uptake ist die NIS-Expression lokal vermehrt, während kalte Schilddrüsenknoten mit vermindertem Technetium-Uptake den NIS kaum exprimieren (Spitzweg *et al.*, 1998). Mittels RT-PCR wurden von Arhuri und Mitarbeitern (1998) gutartige Schilddrüsenknoten auf die Expression der NIS mRNA untersucht. Alle autonomen Adenome und 10 von 11 kalten Knoten exprimierten das NIS-Gen. Eine Quan-

tifizierung wurde in dieser Studie nicht durchgeführt. Hingegen quantifizierten Deleu und Mitarbeiter die NIS mRNA in autonomen Adenomen im Vergleich zum paranodulären Gewebe. Die Expression ist in Thyreozyten aus autonomen Adenomen 5,6 mal stärker als in Thyreozyten aus dem umliegenden Gewebe (Deleu *et al.*, 2000). Untersuchungen an heißen und kalten Schilddrüsenknoten zeigten eine verminderte wachstumshemmende Wirkung von appliziertem Jod auf kalte Schilddrüsenknoten, die nur eine geringe NIS-Expression aufwiesen. Die wachstumshemmende Wirkung von Jod auf Schilddrüsenknoten dürfte demnach zumindest teilweise vom NIS-Expressionsniveau abhängen (Derwahl *et al.*, 1998).

Ein Vergleich der Expression der NIS-mRNA zwischen benignen „kalten“ Knoten und normalem Schilddrüsengewebe wurde von der Gruppe von Filetti (1999) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß die Expression der NIS-mRNA in den „kalten“ Knoten 2 bis 700 mal niedriger als in normalen Schilddrüsengewebe war.

Eine ähnlich aufgebaute Studie (Neumann *et al.*, 2000) fand die Expression der NIS mRNA in „kalten“ Knoten 20 mal niedriger als im umliegenden Gewebe. Auf Proteinebene wurde die Expression des NIS von einer französischen Arbeitsgruppe mittels Immunohistochemie untersucht (Caillou *et al.*, 1998). Während in Schnitten aus normal speichernder Struma nodosa mehr Zellen sich positiv darstellten, waren die Zellen aus „kalten“ Knoten entweder negativ oder nur geringfügig positiv für das NIS-Protein.

Aufgrund der Tatsache, daß ein funktionsfähiges NIS die Grundvoraussetzung für eine effiziente Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen und ihren Metastasen mittels Radiojod darstellt, wurden auch Schilddrüsenkarzinome auf die Expression von NIS untersucht. Northern Blot und RT-PCR Untersuchungen haben gezeigt, dass in entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe die Expression von NIS deutlich reduziert ist. Die verminderte NIS Expression wird als Grund für die verminderte Radiojodaufnahme in entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen angesehen (Arturi *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 1998). An-

dererseits beschrieben Saito und Mitarbeiter (1998) bei japanischen papillären Schilddrüsenkarzinomen eine vermehrte NIS-mRNA und -Proteinexpression im Vergleich zu normalem Schilddrüsengewebe.

Der Natrium-Jodid-Symporter bildet die Grundlage einiger diagnostisch relevanter Schilddrüsentests (Radiojodaufnahme- und Perchlorat-Test) sowie der Schilddrüsenszintigraphie. Aufgrund seiner Eigenschaft, Jod aus dem Blut in die Schilddrüse zu transportieren, ist der Symporter Grundlage für die hochwirksame und routinemäßig zum Einsatz kommende Radiojodtherapie bei benignen und malignen Schilddrüsenerkrankungen. Der therapeutische Nutzen der Radiojodtherapie von Schilddrüsenkarzinomen und ihren Metastasen ist dabei entscheidend von der Jodaufnahme und damit von dem charakteristischen Expressionsmuster eines funktionsfähigen Symporters abhängig. In verschiedenen Tumorzellmodellen wurde das NIS-Gen für Gentherapieexperimente benutzt (Shimura *et al.*, 1997; Mandell *et al.*, 1999). Das NIS-Gen der Ratte wurde in Krebszellen aus Melanomen, Ovarialkarzinomen und Kolonkarzinomen transfiziert, die dann mit  $^{123}\text{I}$  behandelt wurden: *in vitro* wurde eine signifikante selektive Reduktion der Tumormasse erreicht (Mandell *et al.*, 1999). Diese Experimente zeigten, dass das NIS-Protein neben der Schilddrüse auch in anderen Organen exprimiert wird. Die hochspezialisierte Jodidpumpe tritt außer in der Schilddrüse auch in Speicheldrüsen, in der Magenmukosa, im Kolon und in den Ovarien auf. In diesen Organen findet eine geringfügige Jodidaufnahme statt, aber keine Organifizierung von Jodid (Spitzweg *et al.*, 1998). Klonierung und Charakterisierung des NIS-Gens eröffnen daher die Möglichkeit, über den experimentellen Einbau des Transportproteins thyreoidale und auch nicht thyreoidale Tumoren mittels Radiojodtherapie zu behandeln. Durch gezielten NIS-Genstransfer kann in Tumorzellen eine Radiojodakkumulation induziert und mit der dadurch möglichen Radiojodtherapie eine sichere und im Rahmen von Schilddrüsenerkrankungen heute routinemäßig eingesetzte Behandlungsmöglichkeit geschaffen werden (Spitzweg *et al.*, 1998, 1999d, 2001a, 2001c).



Um mit dem Natrium-Jodid-Symporter eine gentherapeutische Behandlung zu ermöglichen, müssen zuvor unter anderem funktionelle Stimulatoren und Regulatoren der NIS-Expression genauer untersucht werden.

Der größte Teil der bis dato verfügbaren Daten über die Stimulation und Regulation des NIS stammen jedoch aus Versuchen mit primären Zellkulturen oder Zelllinien der Ratte, insbesondere aus FRTL-5 Zelllinien und Tumorzelllinien.

Das primäre Ziel der vorliegenden Arbeit liegt nun darin, die bekannten Ergebnisse, insbesondere die Regulation der Genexpression des Symporters durch Interleukine, dahingehend zu untersuchen, ob diese auch auf humane Thyreozyten übertragen werden können. Zum ersten Mal ist es in der vorliegenden Arbeit gelungen, das Expressionsverhalten des humanen NIS unter Einfluß der Interleukine 1 $\alpha$  und 2 aus frisch operativ entferntem euthyreoten Strumagewebe zu untersuchen. Um das Wachstum der Schilddrüse besser zu verstehen, wurden *in vitro* Modelle entwickelt. Vorteil dieser Modelle ist, daß man das Kultursystem soweit simplifizieren kann, daß einzelne Schritte einer Wachstumsregulation erkennbar sind; ein Nachteil ist, daß man die gewonnene Erkenntnis nicht ohne weiteres auf die *in vivo* Situation übertragen kann.

Das Wachstum der Thyreozyten unterscheidet sich in der Zellkultur vom Thyreozytenwachstum im physiologischen System. Es muß berücksichtigt werden, daß Thyreozyten in einer gesunden Schilddrüse die Fähigkeit aufweisen, sich 5 bis 15 mal zu teilen, während dies Thyreozyten in Zellkultur nur 3 bis 5 mal tun (Coclet *et al.*, 1989). Um das Problem der kurzen Lebensdauer und der arbeitsaufwendigen Gewinnung der Thyreozyten zu umgehen, wurde die FRTL-5-Zelllinie entwickelt (Ambesi-Impiombato *et al.*, 1980), die als Modell differenzierter Schilddrüsenzellen dient. Es handelt sich hierbei um eine Zelllinie, die aus einer Rattenschilddrüse hervorgegangen ist und viele Funktionen differenzierter Schilddrüsenzellen, wie Thyreoglobulinsynthese und die Fähigkeit zur Jodidaufnahme besitzt. FRTL-5-Zellen exprimieren zelleigene TSH-Rezeptoren und die Proliferation dieser Zellen ist TSH-abhängig.

Die *in vitro* Perfusion und das „Slide“-System sind den *in vivo* Bedingungen am ähnlichsten, obwohl auch hier die neurologischen und parakrinen Regulationen nicht intakt sind. Die kurze Lebensdauer der Zellen macht diese differenzierten Systeme für längere Experimente unbrauchbar (Übersicht bei Dumont *et al.*, 1992). Eine andere wichtige Methode besteht in der Isolierung von Follikeln. Wenn die folliculäre Struktur während der Kultur erhalten bleibt, wird der physiologische interzelluläre Kontakt aufrechterhalten. Ein Teil der Basalmembran umgibt die Follikel und die Polarität der Zellen wird bewahrt. Diese Zellen können ohne Serum gehalten werden und zeigen ohne Stimulus kein Wachstum. Eine dreidimensionale Follikelstruktur kann sich unter bestimmten Kulturbedingungen neu bilden, z.B. bei Kultur in Kollagen-Matrix (Bidey und Tomlinson, 1988). Eine andere Methode um die Polarität der Zellen aufrechtzuerhalten ist die Zweiabteil-Kulturkammer, wo die apikalen und basalen Oberflächen der Zellen unterschiedlichen Medien ausgesetzt werden können (Mauchamp *et al.*, 1987).

Thyreozyten können als primäre Zellkulturen im Monolayer wachsen. Um eine solche Kultur anzulegen, werden sie mit Kollagenase und Dispase vom Gewebe als Follikel oder Halbfollikel gelöst, haften an der Kulturschalen und wachsen aus der Follikelstruktur als Monolayer, wenn das Kulturmedium fötales Kälberserum enthält. Ohne Serum sind diese Zellen nicht lebensfähig (Roger *et al.*, 1984).

Das Wachstum der Thyreozyten kann mittels TSH stimuliert werden. TSH gilt als der wichtigste physiologische Regulator der Schilddrüse (Dumont *et al.*, 1971). Eine Stimulierung mit TSH führt in Schilddrüsenfollikeln der meisten untersuchten Spezies, auch der des Menschen, zu einer verstärkten DNA-Synthese und Proliferation (Ambesi-Imbombato *et al.*, 1980; Roger *et al.*, 1988). Während in nahezu allen Kultursystemen, die Monolayer-Kulturen von isolierten Thyreozyten als *in vitro*-Modell verwenden, TSH die Proliferationsrate der Thyreozyten steigert, ist dies in Systemen, die Follikelsegmente oder intakte Follikel verwenden, nicht der Fall (Gaertner *et al.*, 1992). Bei der Stimulierung von normalen Schilddrüsenzellen mit TSH wird

auch die Differenzierung der Zellen aufrechterhalten und die Expression von schilddrüsen-spezifischen Genen wie Schilddrüsen-Peroxidase und Thyreoglobulin gesteigert; außerdem verstärkt die Stimulierung mit TSH die Jodidaufnahme (Ambesi-Impiombato *et al.*, 1980; Chazenbalk *et al.*, 1987; Raspe *et al.*, 1995). Die Daten über die Effekte von Jodid auf das Wachstum der Schilddrüse sind noch umstritten. Während die meisten Studien (Übersicht in Dugrillon und Gärtner, 1992) eine Verminderung der Zahl lebender und proliferierender Zellen nach Stimulation mit Jodid demonstrieren, konnten andere Studien keinen Beweis für eine Wachstumshemmung erbringen (Gerber *et al.*, 1981). Die wachstumsregulierende Wirkung kann sich jedoch nur entfalten, wenn Jodid in der Zelle aufgenommen wird und organifiziert wird (Many *et al.*, 1992).

Um mögliche Inhibitionseffekte besser erfassen zu können, wurden die Thyreozyten mit bTSH für 24 Stunden vorinkubiert. Das hNIS-Expressionsverhalten in Abhängigkeit von IL-1 $\alpha$  und IL-2 Stimulation ist von uns mittels quantitativer Real-Time PCR auf cDNA-Ebene erfasst worden. Konventionelle semiquantitative RT-PCR-Methoden wie die kompetitive PCR bzw. Quantifizierungen durch Kombination mit Blot-Verfahren sind zeitaufwendig, arbeitsintensiv und erfordern weitere post-PCR-Schritte, welche die Gefahr einer Kontamination erhöhen (Nitsche *et al.*, 1999). Quantitative Real-Time PCR ist schneller, reproduzierbarer und genauer als die konventionelle semiquantitative PCR (Altria *et al.*, 1996; Seissler *et al.*, 2000, Bustin *et al.*, 2000). Das Arbeiten mit toxischen (z.B. Acrylamiden, Ethidiumbromid) oder radioaktiven Substanzen ist bei der quantitativen Real-Time PCR im Vergleich zur herkömmlichen Gelelektrophorese nicht mehr notwendig. Noch während der Amplifizierung erfolgt der direkte Nachweis der PCR-Produkte. Der Beginn der exponentiellen Produkt-Zunahme (loglineare Phase der PCR), der als crossing point bezeichnet wird, ist der anfänglichen PCR-Zielproduktmenge proportional (Pfaffl *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2001). Die Real-Time PCR benötigt keine post-PCR-Schritte, wodurch das Kontaminationsrisiko deutlich reduziert wird. Die Zyklusdauer ist rela-

tiv kurz, da die Amplifizierung in speziell angefertigten Glaskapillaren erfolgt, welche schnelle Temperaturänderungen ermöglichen. Durch die Minimierung der Denaturierungs- und Amplifizierungszeit wird die Schnelligkeit, Spezifität und Effizienz der Reaktion verbessert. Der Nachteil ist jedoch die schwierige Handhabung der leicht zerbrechlichen Glaskapillaren und der geringe Platz von nur 32 Proben pro Lauf. In dieser Arbeit wurde als Real-Time-PCR-Gerät der LightCycler der Firma Roche Diagnostics verwendet. Es wurden die für dieses Gerät vom Hersteller empfohlenen Fluoreszenz-Detektionsmethoden mit Fluorophor-markierten Hybridisierungssonden (Hybridisierungsproben, kurz HybProbes) verwendet. Diese Detektionsmethode hat den Vorteil, dass man gegenüber anderen Methoden (wie z.B. mit dem SYBR Green-System) ein höheres Maß an Spezifität erreicht, indem man zusätzlich sequenzspezifische Detektionsformate verwendet.

Zur Quantifizierung der Symporterexpression führten wir eine Normalisierung der hNIS-PCR Resultate auf das "house keeping"-Gen GAPDH durch. GAPDH ist für die durchgeführten Experimente am besten geeignet, da das Genprodukt konstitutiv exprimiert wird und kaum durch Regulationsmechanismen beeinflusst wird.

GAPDH als "house keeping"-Gen ist insbesondere für solche Experimente geeignet, in denen stimulatorische bzw. inhibitorische Einflüsse untersucht werden soll (Gorzelniaik *et al.*, 2001). Die verschiedenen frisch operierten Gewebe zeigten eine basale hNIS-Expression, die sich in einem Kopienbereich von 123-476 Kopien/ $10^6$  GAPDH-Kopien bewegten. Der unterschiedliche mRNA-Gehalt ist am ehesten auf lokale Inhomogenitäten des Schilddrüsengewebes zurückzuführen. Bei einer Vorinkubation mit 10 mU/ml bTSH für 24 Stunden wurde für die geplanten Suppressionsversuche die maximale Expressionsrate beobachtet. Die Positivprobe Forskolin hatte bei unseren Versuchen eine maximale Expressionsrate bei 10  $\mu$ M. Diese Daten korrelieren mit den Stimulationsversuchen von Kogai *et al.*, 1997 und Ajjan *et al.*, 1998a.

Das von der Hypophyse gebildete Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) ist der wichtigste Modulator, der den Jodidtransport über den Adenylatcyclase-cAMP-Weg stimuliert. Die Behandlung von Ratten-Schilddrüsenzellen mit TSH und cAMP *in vitro* stimuliert, neben dem Jodidtransport auch die NIS-Gen- und Proteinexpression (Kogai *et al.*, 1997). Adenosin scheint über den Weg des TSH-Stimulation als ein Aktivator der NIS-Expression eine Bedeutung zu besitzen (Harii *et al.*, 1999). Unter Umgehung des Rezeptors und des G-Proteins aktiviert Forskolin (aus der Wurzel von *Coleus Forskohlii*) direkt die katalytische Untereinheit der Adenylatzyklase und steigert damit die Produktion von cAMP und hNIS. Das Schilddrüsengewebe von Patienten mit Morbus Basedow zeigt im Vergleich zu normalen Schilddrüsengewebe etwa eine 3 bis 4-fach erhöhte hNIS-RNA- und Protein-Expression. Als Ursache der NIS-Expressions-Stimulation werden pathologische TSH-Rezeptor-stimulierende Antikörper, die über den TSH-Rezeptor wiederum die cAMP-Produktion erhöhen, vermutet (Saito *et al.*, 1997). Die gesteigerte NIS-Expression als Voraussetzung für die erhöhte Schilddrüsenhormonsynthese stellt somit einen wichtigen Mechanismus in der Pathogenese der Immunhyperthyreose dar.

Prolaktin, ein Peptidhormon aus dem Hypophysenlappen, fördert die Milchsekretion in den Mammae. Die Förderung der Milchsekretion manifestiert sich sowohl in der Vermehrung des Mammagewebes als auch in der erhöhten Milchproduktion. Prolaktin stimuliert NIS, welches auch im Brustgewebe vorzufinden ist. Dieser wichtige Regulationsmechanismus sorgt für eine ausreichende Jodidanreicherung in der Muttermilch (Rillema *et al.*, 2000).

Bei Ratten wird die NIS-Proteinexpression in der laktierenden Brustdrüse durch Saugen stimuliert, nach 24h verschwindet dieser Effekt wieder. Das durch Saugen freigesetzte Peptidhormon Oxytocin aus dem Hypophysenhinterlappen scheint somit ebenfalls das NIS-Expressionsniveau in der laktierenden Brustdrüse zu regulieren. (De la Vieja *et al.*, 1997).

Neben den erwähnten NIS-Stimulatoren wurden mittlerweile auch einige Inhibitoren der Expression des Symportes identifiziert.

Der transformierende Wachstumsfaktor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) ist als potenter Inhibitor von Wachstum und DNA-Synthese in Schilddrüsenzellen bekannt. Er fungiert als Signalvermittler bei der Entstehung euthyreoter Strumen und des „euthyroid sick syndrome“. TGF- $\beta$ 1 hat eine suppressive Wirkung auf die NIS-Expression und Jodidaufnahme in Schilddrüsenzellen von Ratten (FRTL-5 Zellen) (Kawaguchi *et al.*, 1997). Der Signaltransduktionsweg hierfür ist bisher unbekannt. In einer Vorarbeit von S. Wagner (Wagner *et al.*, 2002) konnte diese Reduktion der NIS-Expression am humanen NIS bestätigt werden. Die Inhibition folgt einer Konzentrationsabhängigkeit und bewirkt bei 1 ng/ml auf  $1 \times 10^6$  Zellen/2 ml Medium mit einer Reduktion der NIS-Expressionsrate auf 73% der basalen Rate. Der nach Endotoxinstimulation von Makrophagen gebildeter Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) aktiviert die Granulozyten zur Phagozytose-Reaktion und Eikosanoidbildung. Er wird insbesondere bei autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen freigesetzt. TNF- $\alpha$  besitzt wie TGF- $\beta$ 1 die Fähigkeit der konzentrationsabhängigen NIS-Expressions-Reduktion in Schilddrüsenzellen von FRTL-Zellen (Ajjan *et al.*, 1998a; Pekary *et al.*, 1998). Auch diese Befunde konnten von S. Wagner (Wagner *et al.*, 2002) an humanen Thyreozyten bestätigt werden. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), das von antigenstimulierten T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen gebildet wird, reduziert die NIS-Expression ebenfalls in FRTL-5 Zellen (Ajjan *et al.*, 1998a). Weitere NIS-Expressionsinhibitoren an FRTL-5 Zellen sind Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Interleukin-6 (IL-6) (Spitzweg *et al.*, 2000b). T<sub>3</sub> und Dexamethason inhibieren die NIS-Expression und die Jodaufnahmefähigkeit in FRTL-5 Zellen (Spitzweg *et al.*, 2000a). Dieser Effekt könnte eventuell den Erfolg der Kortikosteroidbehandlung bei der amiodaroninduzierten Thyreoiditis, dem eine jodinduzierte Schädigung von Schilddrüsenfollikeln zugrunde liegt, erklären. Thyreoglobulin scheint über den Mechanismus des negativen Feedback im Sinne einer Autoregulation die Supprimierung der TSH-induzierte NIS-Promoter-Aktivität zu bewirken. Hierzu sind Experimente mit ei-

ner reduzierten NIS-RNA- und Proteinexpression *in vitro*, sowie die Jodaufnahmeaktivität *in vitro* und *in vivo* durchgeführt worden (Spitzweg *et al.*, 2000a). Ceramid und Sphingomyelinase, wichtige Faktoren in der Pathogenese des „euthyroid sick syndrome“, der Thyreoiditis vom Typ de Quervain und der altersassoziierten Hypothyreose reduzieren die NIS-Expression in FRTL-Zellen (Spitzweg *et al.*, 2000b). Furlanetto *et al.*, 1999 zeigten, dass Östradiol eine Proliferation der FRTL-5 Zellen bewirkt, die NIS-RNA-Expression jedoch inhibiert.

Die Interleukine IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 stimulieren die Aktivierung und anhaltende Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, ICAM-2, ELAM-1, VCAM-1, LFA-3 und CD<sub>44</sub>, die bei der Rekrutierung bestimmter Makrophagen- und T-Zell-Populationen in das Schilddrüsengewebe von Bedeutung sind (Heufelder *et al.*, 1997). Patienten mit immunologisch aktivem M. Basedow weisen häufig erhöhte Serumkonzentrationen des zirkulierenden interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) auf (Heufelder *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997).

Zur IL-1 Familie gehören die beiden Agonisten (IL1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) und der IL-1 Rezeptor-Antagonist IL-1-Ra. IL1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind essentielle Mediatoren von entzündlichen Reaktionen. Dabei reagieren sie mit anderen Zytokinen synergistisch oder antagonistisch (Bendtsen, 1994). Fast jedes Gewebe und Organsystem steht unter den Einflüssen von IL1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Ein Ungleichgewicht in diesem sensiblen Zytokinsystem spielt nicht nur eine Rolle bei entzündlichen Erkrankungen, sondern auch in der Pathogenese von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen. Viele widersprüchliche Ergebnisse sind zum Einfluss von IL-1 auf das Wachstum von Thyreozyten publiziert worden. Dabei ist von wesentlicher Bedeutung, welche Kultivierungsmethoden, Wachstumsbedingungen und Zellarten bei den jeweiligen Experimenten gewählt wurden. IL-1 scheint sowohl inhibitorische, als auch stimulatorische Effekte auf das Thyreozyten-Wachstum zu besitzen. Die meisten Autoren demonstrierten eine vermehrten Einbau von (<sup>3</sup>H)-Thymidin in Thyreozyten von Patienten

mit Morbus Basedow (Kawabe *et al.*, 1989; Yamashita *et al.*, 1989) unter Stimulation mit rekombinanten humanen IL-1 $\alpha/\beta$  (rhIL-1 $\alpha/\beta$ ). Diese Ergebnisse sind auch bei den FRTL-5 Zellen bestätigt worden (Mine *et al.*, 1987; Zeki *et al.*, 1991). Eine Inhibition des Wachstums von Schilddrüsen-Karzinomzellen unter dem Einfluß von rekombinantem humanem IL-1  $\alpha/\beta$  zeigten einen zytotoxischen Einfluß von IL-1 $\beta$  auf Pankreas  $\beta$ -Zellen, während Thyreozyten nicht zytotoxisch reagieren (Kimura *et al.*, 1992; Zeki *et al.*, 1993 und Yip *et al.*, 1995, Bendtzen, 1988). Ohne zytotoxischen Einflüsse auf das Wachstum verändert IL-1 $\alpha$  die tight junctions Proteine zwischen den Thyreozyten (Nilsson *et al.*, 1998). IL-1 $\beta$  inhibiert die Funktion von TSH-stimulierten Thyreozyten *in vitro* (Rasmussen *et al.*, 1997). IL-1 $\alpha/\beta$  inhibiert die Genexpression von Thyreoglobulin (TG) (Yamashita *et al.*, 1989), von Schilddrüsenperoxidase (TPO) (Ashizawa *et al.*, 1989), von I 5' deiodinase (Pekary *et al.*, 1994), und zuletzt auch den NIS (Ajjan *et al.*, 1998a). Ajjan untersuchte den Einfluß von IL-1 $\alpha$  (TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) auf die NIS Genexpression von FRTL-5 Zellen mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR. IL-1 $\alpha$  inhibiert die NIS-Genexpression von basal und TSH-stimulierten FRTL-5-Zellen. Die Inhibition erfolgt konzentrationsabhängig und bewirkt bei 1000 U/ml IL-1 $\alpha$  eine 65-80 % Downregulation der NIS-Genexpression. Durch rhIL-1-Ra können diese Einflüsse aufgehoben werden, da rhIL-1-Ra den IL-1 Rezeptor besetzt, ohne jedoch die Signalkaskade zu aktivieren (Rasmussen *et al.*, 1997). Der IL-1 Rezeptor wurde von Kasai *et al.*, 1990 in kultivierten Schweine-Thyreozyten, von Svenson *et al.*, 1991 in menschlichen Sekundärkulturen nachgewiesen. Prostaglandin E<sub>2</sub>, welches einen direkten Einfluß auf die entzündlichen Reaktionen besitzt, wird durch rhIL-1 $\alpha/\beta$  in Thyreozyten vermindert ausgeschüttet (Kawabe *et al.*, 1989; Kasai *et al.*, 1990). Jedoch kommt es bei exogen zugeführten Prostaglandinen oder durch Indometacin (einem Cyclooxygenase-Hemmer, durch den die Prostaglandin-Synthese katalysiert wird) zu einer fehlenden Hemmung des Signaltransduktionsweges der IL-1-Rezeptor Stimulation (Kennedy & Jones, 1991). Die intrazellulären second messenger cAMP und cGMP scheinen im Signaltransduktionsweg des IL-1 Re-



zeptors eine wichtige Rolle zu spielen (Rasmussen *et al.*, 1997). Das Stickoxid (NO), ein potenter Stimulator von cGMP, wird durch IL-1  $\alpha/\beta$  in menschlichen Thyreozyten stimuliert (Rasmussen *et al.*, 1994; Kasai *et al.*, 1995). Der Einfluß von IL-2 auf Schilddrüsenzellen ist bisher noch sehr wenig untersucht worden. Lediglich die Arbeitsgruppe um Schumm-Draeger (1992) demonstrierten eine Hypothyreoseentwicklung in xenotransplantierten menschlichen Schilddrüsenngewebe nach Gabe von IL-2. Da IL-2 durch infiltrierende T-Lymphozyten produziert wird, scheint es aufgrund dessen eine große Rolle in der Modulation von Autoimmunprozessen, insbesondere der Hashimoto-Thyroiditis und des Morbus Basedow, zu spielen.

Die supprimierte NIS-Expression bei der Hashimoto-Thyroiditis ist am ehesten auf den Einfluß von Zytokinen, die stark an der Pathogenese beteiligt sind, zurückzuführen (Spitzweg *et al.*, 2000b und 2002). Die erhöhte NIS-Expression beim M. Basedow wird durch die TSH-Rezeptorstimulierenden Antikörper erklärt. Die Inhibition der NIS-Expression beim M. Basedow durch die Zytokine findet ihren Ausdruck in der fehlenden Korrelation zwischen dem TSH-Rezeptor-Antikörper Konzentration und den klinischen Symptomen einer Hyperthyreose (Spitzweg *et al.*, 1999d und 2000b).

Das Anliegen dieser Arbeit war es, die IL-1 $\alpha$  Dosis-abhängige Downregulation der NIS-Expression an humanen Thyreozyten zu überprüfen und den Einfluß von IL-1 $\alpha$  bzw. IL-2 an humanen Thyreozyten genauer zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von IL-1 $\alpha$  und IL-2 die Expression des humanen NIS deutlich reduziert wird. Dabei folgt die Inhibition einer Konzentrationsabhängigkeit. Die Downregulation wurde nach einer 48-stündigen Stimulation untersucht. IL-1 $\alpha$  vermag bei einer Dosierung von 10 U/ml die Expression des hNIS um 60,3 %, bei 100 U/ml um 81,4 % und bei 1000 U/ml um 90,9 % zu reduzieren. Die suppressive Wirkung von IL-1 $\alpha$  auf die NIS-Expression in der Studie von Ajjan *et al.*, 1998a an FRTL-5 Zellen können somit auch auf der Ebene von humanen Thyreozyten bestätigt werden. Durch die Zugabe von IL-2 findet sich bei 10 U/ml eine 64,7 %, bei 100 U/ml eine 75,1

%, und bei 1000 U/ml eine 80,1 % Reduktion der hNIS Expression. Diese Befunde korrelieren sehr gut mit den Ergebnissen von Schumm-Draeger et al. (1992), bei denen durch IL-2 eine Hypothyreose in xenotransplantierten menschlichen Schilddrüsengewebe hervorgerufen wurde. Die geringere Inhibition von IL-2 gegenüber IL-1 $\alpha$  in höherer Dosierung kann eventuell mit dadurch erklärt werden, dass IL-1 $\alpha$  die Expression von Rezeptoren aktiviert, ohne die das IL-2 weniger effektiv in Aktion treten kann (Plaetinck *et al.*, 1990; Falk *et al.*, 1989). Die Signaltransduktionswege von IL- $\alpha$  und IL-2 sind bisher unbekannt.

Somit spielen die Interleukine 1 $\alpha$  und 2 nicht nur in der pathophysiologischen Regulation der Schilddrüse eine Rolle, sondern sind auch an der physiologischen Regulation der Schilddrüsenfunktion beteiligt. Ausdruck findet dies in der Beeinflussung der NIS-Expression. Die Fähigkeit der Schilddrüsenfollikelzellen selbst IL-1 sowie andere Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone zu bilden und zu binden ermöglicht der Schilddrüse eine komplizierte Wechselwirkung zwischen immunkompetenten Zellen, Thyreozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und extrazellulären Matrixkomponenten. Welche genauere Bedeutung die beiden untersuchten Interleukine mit ihrer Suppression der hNIS-Expression in der Pathogenese von thyroidalen und extrathyroidalen Erkrankungen besitzen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

## 6 Zusammenfassung

**Untersuchung des Einflusses von Interleukin-1 $\alpha$  und Interleukin-2 auf die Expression des humanen Natrium-Jodid-Symporter (hNIS) in primären humanen Thyreozytenkulturen mittels der quantitativen Real-Time-PCR**

**Van-Dung Dan BUI**

### **Zielsetzung:**

Die selektive Aufnahme von Jod in die Schilddrüse erfolgt über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS). Seit der Klonierung des humanen NIS-Gens im Jahre 1996 ist es möglich, Expressionsstudien hinsichtlich der Regulation des hNIS durchzuführen. Die meisten Daten über das Expressionsverhalten des NIS sind jedoch bisher überwiegend in Ratten- und Karzinomzelllinien untersucht worden. Das Ziel dieser Dissertation ist es zu überprüfen, inwieweit die Ergebnisse der NIS-Expression unter Einfluß von IL-1 $\alpha$  auf primäre humane Thyreozytenkulturen aus operativ entfernten euthyreoten Struma colloidosa Gewebe ohne weiteres übertragen werden kann. Darüber hinaus soll die Frage geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß IL-2, dessen Auswirkungen auf den Symporter bis dato noch nicht untersucht worden sind, einen Einfluss auf die Expression des humanen NIS hat.

### **Methodik:**

Das Expressionsverhalten des hNIS in Abhängigkeit von IL-1 $\alpha$  und IL-2 soll auf cDNA-Ebene mittels der quantitativen Real-Time-PCR Methode untersucht werden. Zur Quantifizierung der Symporterexpression erfolgt eine Normalisierung der hNIS-PCR-Resultate auf das Haushaltsgen GAPDH. Als Quantifizierungs-Messprinzip wählten wir die Nachweismethode mittels Hybridisierungsproben, die Detektion basiert auf dem Fluoreszenzresonanzenergietransfer-Prinzip.

### **Ergebnisse:**

Die Expression des hNIS wird nach Zugabe von IL-1 $\alpha$  und IL-2 inhibiert. Die Suppression wurde nach 48 Stunden Stimulation untersucht, bei beiden Interleukinen folgt sie einer Konzentrationsabhängigkeit. Während die Zugabe von 10 U/ml IL-1 $\alpha$  die Expression des hNIS um 60,3 % reduziert, so beträgt sie bei 100 U/ml IL-1 $\alpha$  81,4 % und bei 1000 U/ml 90,9 % vom Basalwert. Im Falle von IL-2 findet sich bei 10 U/ml eine 64,7 %, bei 100 U/ml eine 75,1 %, und bei 1000 U/ml eine 80,1 % Inhibition.

### **Schlussfolgerung:**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\alpha$  eine konzentrationsabhängige Inhibition auf die NIS-Expression an primären humanen Thyreozytenkulturen bewirkt. Somit kann der vom Rattensymporter bekannte Einfluß jetzt auch auf menschliche Thyreozyten übertragen werden. Erstmals kann ein konzentrationsabhängiger Inhibitionseffekt von IL-2 auf NIS, in unserem Fall sogar auf den humanen Symporter nachgewiesen werden. Die Tatsache, daß bei Autoimmunerkrankungen eine gesteigerte Zytokinproduktion vorliegt, zeigt die wichtige Beziehung zur veränderter NIS-Expression beim M. Basedow bzw. Hashimoto-Thyroiditis. Entsprechend der klinischen Beobachtung und der Radionuklidanreicherung besitzt das Schilddrüsengewebe von Morbus Basedow-Patienten ein erhöhtes NIS-Expressionsniveau, während im Gegensatz dazu die NIS-Expression im Schilddrüsengewebe bei Hashimoto-Thyroiditis Patienten reduziert ist. Die erhöhte NIS-Expression beim Morbus Basedow wird durch TSH-Rezeptorstimulierende Antikörper hervorgerufen. Die NIS-Inhibition durch IL-1 $\alpha$  und IL-2 könnte eine Bedeutung bei der Hypothyreosesentwicklung bei der Hashimoto-Thyroiditis haben. hNIS kommt auch extrathyroidal, wie z.B. in der Brustdrüse, Prostata und Lunge vor. Durch gezielten NIS-Gentransfer kann hNIS prinzipiell auch bei nicht-thyroidalen Malignomen einer Radiojodtherapie zugänglich gemacht werden. Besonders in Bezug auf künftige Studien für den Einsatz von hNIS in einer gentherapiebasierten Radiojodtherapie für die Behandlung von extrathyroidalen Tumorerkrankungen kann die vorgelegte Arbeit Grundlagen liefern.

## 7 Literaturverzeichnis

**Ajjan RA, Findlay C, Metcalfe RA, Watson PF, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP.** 1998c The modulation of the human sodium iodide symporter activity by Graves' disease sera. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 1217-21.

**Ajjan RA, Kamaruddin NA, Crisp M, Watson PF, Ludgate M, Weetman AP.** 1998b Regulation and tissue distribution of the human sodium iodide symporter gene. *Clin Endocrinol* **49(4)**: 517-23.

**Ajjan RA, Watson PF, Findlay C, Metcalfe RA, Crisp M, Ludgate M, Wheetman AP.** 1998a The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity. *J Endocrinol* **158**: 351-58.

**Altria KD.** 1996 Optimization of precision in quantitative analysis. *Methods Mol Biol* **52**: 61-70.

**Ambesi-Impiombato FS, Parks LA, Coon HG.** 1980 Culture of hormone-dependent functional epithelial cells from rat thyroids. *Proc Natl Acad Sci USA* **77(6)**: 3455-59.

**Arturi F, Russo D, Schlumberger B, Du Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chiefari E, Suarez HG, Filetti S.** 1998 Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 2493-96.

**Ashizawa K, Yamashita S, Tobinaga T, Nagayama Y, Kimura H, Hirayu H, Izumi M, Nagataki S.** 1989 Inhibition of human thyroid peroxidase gene expression by interleukin 1. *Acta Endocrinol* **121(4)**: 465-69.

**Bendtzen K.** 1988 Interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in infection, inflammation and immunity. *Immunol Lett* **19(3)**: 183-91.

**Bendtzen K.** 1994 Cytokines and natural regulators of cytokines. *Immunol Lett* **43(1-2)**: 111-23.

**Bidart JM, Mian C, Lazar V, Russo D, Filetti S, Caillou B, Schlumberger M.** 2000 Expression of pendrin and the pendred syndrome (PDS) gene in human thyroid tissues. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 2028-33.

**Bidey SP und Tomlinson S.** 1988 The regulation and integration of thyroid follicular differentiation and function. *Clin Endocrinol* **28**: 423-44.

**Brix TH, Kyvik KO, Hedegüs L.** 1999 Major role of genes in the etiology of simple goiter in females: a population based twin study. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 3071-75.

**Bustin SA.** 2000 Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* **25**: 169-93.

**Caillou B, Troalen F, Baudin F, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM.** 1998 Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter distribution in human thyroid tissue: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Invest* **83(11)**: 4102-06.

**Caplin BE, Bernhard PS, Wittwer CT.** 1999 The most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* **1**: 5-8.

**Carrasco N.** 1993 Iodide transport in the thyroid gland. *Biochem Biophys Acta* **1154**: 65-82.

**Cavalieri R.** 1997 Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid* **7(2)**: 177-81.

**Chambard M, Verrier B, Gabrion J, Mauchamp J.** 1983 Polarization of thyroid cell culture: evidence for the basolateral localization of the iodide pump and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex. *J Cell Biol* **96**: 1172-77.

**Chazenbalk G, Magnusson RP, Rapoport B.** 1987 Thyrotropin stimulation of cultured thyroid cells increases steady state levels of the messenger ribonucleic acid for thyroid peroxidase. *Mol Endocrinol* **1(12)**: 913-17.

**Cho JY, Leveille R, Kao R, Rousset B, Parlow AF, Burak WE Jr, Mazzaferri EL, Jhiang SM.** 2000 Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter expression in mammary glands. *J Clin Endocrinol Metab* **85(8)**: 2936-43.

**Coclet J, Foureau F, Ketelbant P, Galand P, Dumont JE.** 1989 Cell population kinetics in dog and human adult thyroid. *Clin Endocrinol* **31(6)**: 655-65.

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

**De la Vieja A, Dohan O, Levy O, Carrasco N.** 2000 Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. *Phys Rev* **80(3)**: 1083-1105.

**De Silva DR, Herrmann M, Tabiti K, Wittwer C.** 1998 Rapid genotyping and quantification on the LightCycler with hybridisation probes. *Biochemica Information* **102**: 9-12.

**Deleu S, Allory Y, Radulescu A, Pirson I, Carrasco N, Corvilain B, Salmon I, Franc B, Dumont JE, Van Sande J und Maenhaut C.** 2000 Characterization of autonomous thyroid adenoma: metabolism, gene expression, and pathology. *Thyroid* **10(2)**: 131-40.

**Derwahl M, Studer H.** 1998 Pathogenesis and treatment of multinodular goiter. *Endocrinol* **127(5)**: 2104-10.

**Derwahl M, Studer H.** 2000 Multinodular goitre: "much more to it than simply iodine deficiency". *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **14(4)**: 577-600.

**Dinarello CA.** 1994 The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *FASEB J* **8(15)**: 1314-25.

**Dohan O, De la Vieja A, Carrasco N.** 2000 Molecular study of the sodium-iodide symporter (NIS): a new field in thyroidology. *Trends Endocrinol Metab* **11(3)**: 99-104.

**Dugrillion A, Gärtner R.** 1992 The role of iodine and thyroid cell growth. *Thyroid* **4**: 31-36.

**Dumont JE.** 1971 The action of thyrotropin on thyroid metabolism. *Vitam Horm* **29**: 287-412.

**Dumont JE, Lamy F, Roger P, Maenhaut C.** 1992 Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Am Phys Soc* **92**: 667-87.

**Eisenberg SP, Evans RJ, Arend WP, Verderber E, Brewer MT, Hannum CH, Thompson RC.** 1990 Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist. *Nature* **343**: 341-46.

**Endo T, Kogai T, Nakazoto M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T.** 1996 Autoantibody against Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochem Biophys Res Commun* **224(1)**: 92-95.

**Eng PHK, Cardona GR, Fang SL, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE.** 1999 Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter (NIS) mRNA and protein. *Endocrinol* **140(8)**: 3404-10.

**Eskandari S, Loo DDF, Dai G, Levy O, Wright EM, Carrasco N.** 1997 Thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter: mechanism, stoichiometry, and specificity. *J Bio Chem* **272**: 27230-38.

**Falk W, Mannel DN, Darjes H, Krammer PH.** 1989 IL-1 induces high affinity IL-2 receptor expression of CD4-8- thymocytes. *J Immunol* **143(2)**: 513-17.

**Filetti S, Bidart JM, Arturi F, Caillou B, Russo D, Schlumberger M.** 1999 Sodium/iodide symporter: a key transport system in thyroid cancer cell metabolism. *Eur J Endocrinol* **141(5)**: 443-57.

**Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Mikai K, Takai SI, Amino N.** 1997 Congenital hypothyroidism caused by a mutation in the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter. *Nat Genet* **16**: 124-25.

**Fujiwara H, Tatsumi K, Miki K, Harada T, Okada S, Nose O, Kodama S, Amino N.** 1998 Recurrent T354P mutation of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in patient with iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* **83**: 2940-43.

**Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameso JL.** 1999 Estradiol increases proliferation and downregulates the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinol* **140**: 5705-11.

**Gaertner R.** 1992 Thyroid growth in vitro. *Exp Clin Endocrinol* **100**: 32-35.

**Gerber H, Studer H, Conti A, Engler H, Kohler H, Haeberli A.** 1981 Reaccumulation of thyroglobulin and colloid in rat and mouse thyroid follicles during intense thyrotropin stimulation. A clue to the pathogenesis of colloid goiters. *J Clin Invest* **68(5)**: 1338-47.

**Gorzelnia K, Janke J, Engeli S, Sharma AM.** 2001 Validation of endogenous controls for gene expression studies in human adipocytes and preadipocytes. *Horm Metab Res* **33(10)**: 625-27.

**Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC.** 1990 Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* **343(6256)**: 336-40.

**Harii N, Endo T, Ohmori M, Onaya T.** 1999 Extracellular adenosine increases Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene expression in rat thyroid FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol* **157(1-2)**: 31-39.

**Heufelder AE.** 1997 Retro-orbital autoimmunity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* **11(3)**: 499-520.

**Heufelder AE, Bahn RS.** 1993 Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) in sera of patients with Graves' ophthalmopathy and thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* **92(2)**: 296-302.

**Jenkins JK, Malyak M, Arend WP.** 1994 The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils. *Lymphokine Cytokine Res* **13**: 47-54.

**Jhiang SM, Cho JY, Ryu KY, De Young BR, Smanik PA, McCaughy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL.** 1998 An immunohistochemical study of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinol* **139**: 4416-19.

**Joba W, Spitzweg C, Schriever K, Heufelder AE.** 1999 Analysis of human sodium/iodide symporter, thyroid transcription factor-1, and paired-box-protein-8 gene expression in benign thyroid diseases. *Thyroid* **9**: 455-66.

**Kasai K, Hiraiwa M, Emoto T, Kuroda H, Hattori Y, Mochizuki Y, Nakamura T, Shimoda S.** 1990 Presence of high affinity receptor for interleukin-1 (IL-1) on cultured porcine thyroid cells. *Horm Metab Res* **22(2)**: 75-79.

**Kawabe Y, Eguchi K, Shimomura C, Mine M, Otsubo T, Ueki Y, Tezuka H, Nakao H, Kawakami A, Migita K, et al..** 1989 Interleukin-1 production and action in thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **68(6)**: 1174-83.



**Kawaguchi A, Ikeda M, Endo T, Kogai T, Miyzaki A, Onaya T.** 1997 Transforming growth factor-beta1 supresses thyrotropin-induced Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter messenger RNA and protein levels in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* **7(5)**: 789-94.

**Kennedy RL, Jones TH.** 1991 Cytokines in endocrinology: their roles in health and in disease. *J Endocrinol* **129(2)**: 167-78.

**Kimura H, Yamashita S, Namba H, Tominaga T, Tsuruta M, Yokoyama N, Izumi M, Nagataki S.** 1992 Interleukin-1 inhibits human thyroid carcinoma cell growth. *J Clin Endocrinol Metab* **75(2)**: 596-602.

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

**Lazar V, Bidart JM, Caillou B, Mahe C, Lacroix L, Filetti S, Schlumberger M.** 1999 Expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene in human thyroid tumors: a comparison study with other thyroid-specific genes. *J Clin Endocrinol Metab* **84(9)**: 3228-34.

**Lee S, Felts KA, Parry GC, Armacost LM, Cobb RR.** 1997 Inhibition of 5-lipoxygenase blocks IL-1 beta-induced vascular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells. *J Immunol* **158(7)**: 3401-07.

**Levy O, Ginter CS, Carrasco N.** 1998 N-linked glycosolation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS): implication for its secondary structure model. *J Biol Chem* **273**: 22657-63.

**Loppnow H, Libby P.** 1990 Proliferating of interleukin 1-activated human vascular smooth muscle cells secrete copious interleukin 6. *J Clin Invest* **85(3)**: 731-38.

**Loppnow H, Werdan K, Reuter G, Flad HD.** 1998 The interleukin-1 and interleukin-1 converting enzyme families in the cardiovascular system. *Eur Cytokine Netw* **9(4)**: 675-80.

**Mandell RB, Mandell LZ, Link CJr.** 1999 Radioisotope concentrator gene therapy using sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res* **59**: 661-68.

**Many MC, Mestdagh C, van den Hove MF, Deneff JF.** 1992 In vitro study of acute toxic effects of high iodide doses in human thyroid follicles. *Endocrinol* **131(2)**: 621-30.

**Matsuda A, Kosugi S.** 1997 A homozygous missense mutation of the sodium/iodide symporter gene causing iodide transport defect. *J Clin Endocrinol Metab* **82**: 3966-71.

**Mauchamp J, Chambard M, Verrier B, Gabrion J, Chabaud O, Gerard C, Penel C, Pialat B, Anfosso F.** 1987 Epithelial cell polarization in culture: orientation of cell polarity and expression of specific functions, studied with cultured thyroid cells. *J Cell Sci Suppl* **8**: 345-58.

**Mine M, Tramontano D, Chin WW, Ingbar SH.** 1987 Interleukin-1 stimulates thyroid cell growth and increases the concentration of the c-myc proto-oncogene mRNA in thyroid follicular cells in culture. *Endocrinol* **120(3)**: 1212-4.

**Nilsson M, Husmark J, Bjorkman U, Ericson LE.** 1998 Cytokines and thyroid epithelial integrity: interleukin-1 $\alpha$  induces dissociation of the junctional complex and paracellular leakage in filter-cultured human thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **83(3)**: 945-52.

**Nitsche A, Steuer N, Schmidt CA, Landt O, Siegert W.** 1999 Different real-time PCR formats compared for the quantitative detection of human cytomegalovirus DNA. *Clin Chem* **45(11)**: 1932-37.

**Paire A, Bernier-Valentin F, Selmi-Ruby S, Rousset B.** 1997 Characterization of the rat thyroid iodide transporter using anti-peptide antibodies. Relationship between its expression and activity. *J Biol Chem* **272(29)**: 18245-9.

**Paschke R, Neumann S.** 2001 Sodium/iodide symporter mRNA expression in cold thyroid nodules. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **109(1)**: 45-46.

**Pekary AE, Berg L, Santini F, Chopra I, Hershman JM.** 1994 Cytokines modulate type I iodothyronine deiodinase mRNA levels and enzyme activity in FRTL-5 rat thyroid cells. *Mol Cell Endocrinol* **101(1-2)**: R31-5.

**Pekary AE, Hershman JM.** 1998 Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells. *Endocrinol* **139(2)**: 703-12.

**Perron B, Rodriguez AM, Leblanc G, Pourcher T.** 2001 Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues. *J Endocrinol* **170(1)**: 185-96.

**Pfaffl M.** 2000 Development and validation on an externally standardised quantitative insulin-like growth factor-1 RT PCR using LightCycler SYBR Green I technology. *Biochem Biophys Acta* **3**: 13-16.

**Pinke LA, Dean DS, Bergert ER, Spitzweg C, Dutton CM, Morris JC.** 2001 Cloning of the mouse sodium iodide symporter. *Thyroid* **11(11)**: 1087.

**Plaetinck G, Combe MC, Corthesy P, Sperisen P, Kanamori H, Honjo T, Nabholz M.** 1990 Control of IL-2 receptor-alpha expression by IL-1, tumor necrosis factor, and IL-2. Complex regulation via elements in the 5' flanking region. *J Immunol* **145(10)**: 3340-47.

**Pohlenz J, Rosenthal I, Weiss RE, Refetoff S.** 1997 Hypothyroidism due to iodide trapping defect caused by mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) gene. *Thyroid* **7(1)**: 108.

**Pohlenz J, Rosenthal IM, Weiss RE, Jhiang SM, Burant C, Refetoff S.** 1998 Congenital hypothyroidism due to mutations in the sodium/iodide symporter. Identification of a nonsense mutation producing a downstream cryptic 3' splice site. *J Clin Invest* **101(5)**: 1028-35.

**Rasmussen AK, Diamant M, Blichert-Toft M, Bendtzen K, Feldt-Rasmussen U.** 1997 The effects of interleukin-1beta (IL-1beta) on human thyrocyte functions are counteracted by the IL-1 receptor antagonist. *Endocrinol* **138(5)**: 2043-48.

**Raspé E, Costagliola S, Ruf J, Mariotti S, Dumont JE, Ludgate M.** 1995 Identification of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> cotransporter as a potential autoantigen in thyroid autoimmune disease. *Eur J Endocrinol* **132**: 399-405.

**Reschini E, Catania A, Ferrari C, Bergonzi M, Paracchi A, Raineri P.** 1993 Comparison of pertechnetate and radioiodine thyroid scintiscans in thyroid disease. *J Nucl Biol Med* **37(1)**: 12-17.

**Rillema JA, Yu TX, Jhiang SM.** 2000 Effects of prolactin on sodium iodide symporter expression in mouse mammary gland explants. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**: E769-E772.

**Rodriguez AM, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart JM, Pourcher T.** 2002 Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* **87(7)**: 3500-03.

**Roger PP, Dumont JE.** 1984 Factors controlling proliferation and differentiation of canine thyroid cells cultured in reduced serum conditions: effects of thyrotropin, cyclic AMP and growth factors. *Mol Cell Endocrinol* **36(1-2)**: 79-93.

**Roger PP, Rickaert F, Huez G, Authelet M, Hofmann F, Dumont JE.** 1988 Microinjection of catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase triggers acute morphological changes in thyroid epithelial cells. *FEBS Lett* **232(2)**: 409-13.

**Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Maramatsu A, Onaya T.** 1998 Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest* **101**: 1296-1300.

**Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazoto M, Kogai T, Onaya T.** 1997a Increased expression of the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in cultures human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* **82(10)**: 3331-36.

**Saito T, Endo T, Nakazoto M, Kogai T, Onaya T.** 1997b Thyroid-stimulating-hormone induced down-regulation of thyroid transcription factor 1 in rat thyroid FRTL-5 cells. *Endocrinol* **138(2)**: 602-06.

**Schumm-Draeger PM, Wenisch HJ, Usadel KH.** 1992 In vivo effects of TSH receptor antibodies in xenotransplanted human thyroid tissue. *Exp Clin Endocrinol* **100(1-2)**: 41-44.

**Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karninski LP.** 1999 The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet* **21**: 440-43.

**Seissler J, Wagner S, Schott M, Lettmann M, Feldkamp J, Scherbaum WA, Morgenthaler NG.** 2000 Low frequencies of autoantibodies to the human Na(+)/I(-) symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab* **85(12)**: 4630-34.

**Shen DH, Kloos RT, Mazzaferi EL, Jhiang SM.** 2001 Sodium iodide symporter in health and disease. *Thyroid* **11(5)**: 415-25.

**Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T.** 1997 Iodide uptake and experimental <sup>131</sup>I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene. *Endocrinol* **138(10)**: 4493-96.

**Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mezzoferrri EL, Jhiang SM.** 1996 Cloning of the human sodium iodide transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **226**: 339-45.

**Spitzweg C, Dietz AB, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CY, Morris JC.** 2001a In vivo sodium iodide symporter gene therapy of prostate cancer. *Gene Ther* **8(20)**: 1524-31.

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

**Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris LC.** 2001c The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab* **86**: 3327-35.

**Spitzweg C, Heufelder AE.** 1997 Update on the thyroid sodium iodide symporter: a novel thyroid antigen emerging on the horizon. *Eur J Endocrinol* **137(1)**: 22-3.

**Spitzweg C, Heufelder AE.** 1999a Der Natrium-Jodid-Symporter der Schilddrüse. *Dtsch Med Wschr* **124**: 1077-84.

**Spitzweg C, Heufelder AE, Morris JC.** 2000a Thyroid iodine transport. *Thyroid* **10**: 321-30.

**Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE.** 1998 Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissue and its cloning of its complementary deoxyribonucleic acid from salivary gland, mammary gland and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab* **83(5)**: 1748-52.

**Spitzweg C, Joba W, Heufelder AE.** 1999b Expression of thyroid-related genes in human thymus. *Thyroid* **9**: 133-41.

**Spitzweg C, Joba W, Morris JC, Heufelder AE.** 1999c Regulation of sodium iodide symporter gene expression in FRTL-5 rat thyroid cells. *Thyroid* **9(8)**: 821-30.

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

**Spitzweg C, Morris JC.** 2000b The immune response to the iodide transporter. *Endocrinol Metab Clin North Am* **29**: 389-98.

**Spitzweg C, Morris JC.** 2002 The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications. *Clin Endocrinol* **57(5)**: 559-74.

**Svenson M, Kayser L, Hansen MB, Rasmussen AK, Bendtzen K.** 1991 Interleukin-1 receptors on human thyroid cells and on the rat thyroid cell line FRTL-5. *Cytokine* **3(2)**: 125-30.

**Tazebay UH, Wapnir IL, Levy O, Dohan O, Zuckier LS, Zaho QH, Feng HD, Amenta PS, Fineberg S, Pestell RG, Carrasco N.** 2000 The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. *Nat Med* **6**: 871-78.

**Theze J.** 1999 The cytokine network and immune functions. *Oxford University Press, NY* : .

**Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, Miot F.** 1997 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* **131**: 195-203.

**Wagner S, Aust G, Schott M, Scherbaum WA, Feldkamp J, Seissler J.** 2002 Regulation of sodium-iodide-symporter gene expression in human thyrocytes measured by real-time polymerase chain reaction. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **110(8)**: 398-402.

**Weetman AP, McGregor AM.** 1996 Autoimmune thyroid disease: Further developments in our understanding. *Endocrinol Rev* **15**: 788-830.

**Wolff J.** 1983 Congenital goiter with defective iodide transport. *Endocrinol Rev* **4**: 240-54.

**Wolff j, Chaikoff IL.** 1948 Plasma inorganic iodide as homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem* **174**: 555-64.

**Wolff j, Chaikoff IL, Goldberg RC, Meier JR.** 1949 The temporary nature of the inhibitory action of excess iodide on organic iodide synthesis in the normal thyroid. *Endocrinol* **45**: 504-13.

**World Health Organization.** 1996 Iodine deficiency disorders. *WHO Fact Sheet No. 121*: .

**Yamashita S, Kimura H, Ashizawa K, Nagayama Y, Hirayu H, Izumi M, Nagataki S.** 1989 Interleukin-1 inhibits thyrotrophin-induced human thyroglobulin gene expression. *J Endocrinol* **122(1)**: 177-83.

**Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Van der Putten K, McCaughan G, Eris JM, Bishop GA.** 2001 Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol* **79**: 213-21.

**Yip I, Pang XP, Berg L, Hershman JM.** 1995 Antitumor actions of interferon-gamma and interleukin-1 beta on human papillary thyroid carcinoma cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* **80(5)**: 1664-69.

**Zeki K, Azuma H, Suzuki H, Morimoto I, Eto S.** 1991 Effects of interleukin 1 on growth and adenosine 3',5'-monophosphate generation of the rat thyroid cell line, FRTL-5 cells. *Acta Endocrinol* **124(1)**: 60-66.

**Zeki K, Nakano Y, Inokuchi N, Watanabe K, Morimoto I, Yamashita U, Eto S.** 1993 Autocrine stimulation of interleukin-1 in the growth of human thyroid carcinoma cell line NIM 1. *J Clin Endocrinol Metab* **76(1)**: 127-33.

## 8 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name: BUI, Van-Dung Dan  
Anschrift: Hülsmannstraße 17, App.: 28  
45355 Essen  
Tel.: 0179 / 3281555  
e-mail: vandungdanbui@gmx.de  
Geburtsdatum/-ort: 15. Mai 1972 in Vung Tau / Vietnam  
Familienstand: ledig  
Konfession: römisch-katholisch  
Nationalität: deutsch

### Schulbildung

1980-1985 Grundschule in Solingen  
1985-1993 Gymnasium in Solingen / Abitur

### Studium

1993-1995 Vorkl. Studienabschnitt an der Ernst-Moritz-  
Arndt Universität Greifswald  
1995-2000 Klinischer Studienabschnitt an der GHS Essen

### Berufslaufbahn

2000-2001 AiP in der Klinik für Endokrinologie an der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
2001-2003 AiP und Assistenzarzt in der Inneren Klinik des  
Krankenhauses Philipusstift Essen  
seit 2004 Assistenzarzt in der Inneren Klinik des  
St. Johannes-Hospital Duisburg

Essen, 07.10.2004  
Van-Dung Dan BUI



## 9 Danksagung

Für die Vergabe des Dissertationsthemas möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr.med. J. Feldkamp bedanken.

Meinen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. W. A. Scherbaum für die Möglichkeit, meine Arbeit als AiP in seiner Abteilung durchführen zu können.

Für die intensive Unterstützung, kritische Diskussion und die Begleitung bei der Durchführung der Experimente gilt mein Dank Frau Dr. rer. nat. S. Wagner.

Ganz großen Dank gilt für meine Eltern, ohne die mir das Studium der Medizin nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank geht an meinen Freund Kai Bittner und meine Freundin Kerstin Kim für die unermüdliche moralische und fachliche Unterstützung.

## 10 Anhang

Tabelle A:

SD-Nr.	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	MW	SD
basal	127,41	126,83	126,75	80,48	130,91	84,51	92,81	85,61	159,99	130,24	79,14	95,70	102,70	156,92	112,86	26,62
1000 U IL-1a	11,46	12,56	12,91	6,34	12,36	8,18	8,41	7,96	14,92	9,67	5,23	9,78	11,23	13,67	10,33	2,76
100 U IL-1a	21,41	22,84	21,97	13,58	22,64	15,24	16,06	17,24	33,02	25,64	15,04	18,90	19,60	32,96	21,15	5,88
10 U IL-1a	51,33	49,56	51,46	27,98	53,72	34,64	34,51	35,81	71,23	49,51	30,62	34,52	39,23	69,51	41,59	13,17
10 µM Forsch.	223,53	230,76	226,49	143,42	229,91	150,74	165,71	150,46	283,61	227,68	137,16	166,90	195,80	279,03	200,80	47,37
SD-Nr.	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	MW	SD
basal	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	-
1000 U IL-1a	8,99	9,90	10,19	7,88	9,44	9,68	9,06	9,30	9,33	7,42	6,61	10,22	10,93	8,71	9,12	1,12
100 U IL-1a	16,80	18,01	17,33	16,87	17,29	18,03	17,30	20,14	20,84	19,69	19,00	19,75	19,08	21,00	18,64	1,39
10 U IL-1a	40,29	39,08	40,59	34,77	41,04	40,99	37,19	41,83	44,52	38,01	38,69	36,07	38,20	44,30	39,68	2,72
10 µM Forsch.	175,48	181,94	178,70	178,21	175,63	178,37	178,55	175,74	177,26	174,82	173,31	174,40	190,65	177,82	177,92	4,13

Tabelle B:

SD-Nr.	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	MW	SD
basal	128,22	50,24	84,77	75,26	37,37	121,58	121,00	64,04	95,56	65,35	86,54	41,48	123,90	78,42	83,84	29,82
1000 U IL-2	25,34	9,82	16,12	15,32	7,42	23,42	24,57	13,46	21,14	13,31	17,11	7,78	24,99	14,28	16,72	6,06
100 U IL-2	32,38	12,36	21,41	18,12	9,41	30,82	30,54	15,21	24,87	18,01	21,31	9,34	30,08	19,82	20,98	7,61
10 U IL-2	45,29	17,58	30,87	26,97	13,27	42,91	42,15	22,13	33,01	24,92	30,12	14,58	45,22	26,03	29,65	10,60
10 µM Forsch.	192,43	77,35	128,35	112,59	56,36	177,91	182,30	96,73	148,33	99,72	126,85	59,63	189,84	118,89	126,23	44,93
SD-Nr.	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	MW	SD
basal	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	-
1000 U IL-2	19,76	19,55	19,02	20,36	19,86	19,26	20,31	21,02	22,12	20,37	19,77	18,76	20,17	18,21	19,89	0,94
100 U IL-2	25,25	24,60	25,26	24,08	25,18	25,35	25,24	23,75	26,03	27,56	24,63	22,52	24,28	25,27	24,93	1,11
10 U IL-2	35,32	34,99	36,41	35,83	35,51	35,30	34,84	34,66	34,54	38,13	34,51	35,15	36,50	33,19	35,34	1,12
10 µM Forsch.	150,08	153,95	151,40	149,59	150,82	146,34	150,66	151,06	155,22	152,59	146,58	143,76	153,22	151,60	150,49	3,02

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen angefertigt habe.

Essen, Februar 2004