

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Einfluss von δ -Jodlaktone im Vergleich zu Jod und Jodid auf die Proliferation
von Mamma- und Schilddrüsen-Karzinom Zelllinien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Birgit Ander
aus
Augsburg

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Roland Gärtner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Carsten Otto

Prof. Dr. Christine Spitzweg

Priv. Doz. Dr. Irmela Jeremias

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2011

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

The role of iodine and δ -iodolactone on growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells.

R. Gärtner, B.Ander, P.Rank

Hormones (Athens). 2010 Jan-Mar;9(1):60-66

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Roland Gärtner für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas, für die gute Betreuung, die wertvollen Diskussionen und die geistigen Anregungen mit denen er mir bei der Ausarbeitung der Dissertation zur Seite stand.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Petra Rank bedanken, die mich in die Tüchen der Laborarbeit einführte und für eine stets angenehme Atmosphäre bei der Durchführung der Versuche sorgte.

Nicht zuletzt vielen Dank an meinen Freund, Axel Geiger, meine Familie und Freunde, die ganz individuell ihren Beitrag zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	4
Inhaltsverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	8
1. Einleitung	11
1.1. Zusammenhang zwischen Schild- und Brustdrüse	11
1.1.1. Jodstoffwechsel in der gesunden Schild- und Brustdrüse.....	12
1.1.2. Der NIS in Schilddrüsen- und Mammakarzinomen	15
1.2. Wichtige Signaltransduktionswege in der Schilddrüsen- und Brustdrüsenzelle für die Proliferation	16
1.2.1. Das Adenylatcyclase-System	17
1.2.2. Das Phospholipase C-System	18
1.3. Das Mammakarzinom	19
1.3.1. Epidemiologie und Ernährung.....	19
1.3.2. Risikofaktoren	20
1.4. Apoptoseinduktion in der Schild- und Brustdrüse	21
1.5. Die Wachstumsregulation	23
1.5.1. Wachstumsfaktoren	23
1.5.2. Jodid versus Jod.....	25
1.5.3. Die diagnostische und therapeutische Bedeutung des NIS	26
1.6. Östrogen und Progesteron.....	28
1.7. Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7.....	29
1.8. Zielsetzung der Arbeit	29
2. Materialien und Methoden	30
2.1. Materialien	30
2.1.1. Zelllinien.....	30
2.1.2. Kulturmedien.....	32
2.1.3. Geräte.....	33
2.1.4. Arbeitsmaterial.....	33
2.1.5. Substanzen.....	34
2.1.6. Herstellung der Puffer und Lösungen	35
2.2. Methoden.....	36
2.2.1. Allgemeine Arbeitsbedingungen	36
2.2.2. Kultivierung.....	37

2.2.3. Zellspaltung.....	37
2.2.4. Zellzählung	37
2.2.5. Zellzählung mit MTT Assay.....	38
2.2.6. Vitalfärbung.....	39
2.2.7. Kryokonservierung	39
2.2.8. Auftauen der Zellen	39
2.2.9. Herstellung von Jodlaktone.....	40
2.2.10. Mitochondrial Potential Assay (Apoptosenachweis).....	41
3. Versuchsdurchführung.....	42
3.1. Jod-Aufnahme der MCF-12A und MCF-7	42
3.2. Redifferenzierungsversuch mit tRA bei MCF-12A und MCF-7	43
3.3. Einfluss von E2, FK und PE auf MCF-7 und MCF-12A.....	44
3.4. Einfluss von CT auf MCF-12A.....	45
3.5. Einfluss von KI, LL und JL auf MCF-12A, MCF-7 und SD-CA	45
3.6. Einfluss von Rosiglitazone auf MCF-7	46
3.7. Vergleich von MCF-12A und MCF-7	47
4. Statistische Auswertung	47
5. Ergebnisse.....	48
5.1. Einfluss von KI, LL und JL auf MCF-7 im Vergleich zu MCF-12A.....	48
5.2. Apoptoseinduktion durch KI, LL und JL bei MCF-7 und MCF-12A.....	57
5.3. Einfluss von Modulatoren des PKA-Pathways auf MCF-7 und MCF-12A	60
5.3.1. Einfluss von FK auf MCF-7 und MCF-12A.....	60
5.3.2. Einfluss von CT auf MCF-12A	63
5.4. Einfluss von PE auf MCF-7 und MCF-12A.....	65
5.5. Redifferenzierungsversuch mit tRA, Rosiglitazone und E2	68
5.5.1. Redifferenzierungsversuch mit tRA	68
5.5.2. Redifferenzierungsversuch mit Rosiglitazone	71
5.5.3. Redifferenzierungsversuch mit E2	73
5.6. Einfluss von KI, LL und JL auf SD-CA.....	80
5.6.1. Einfluss von KI, LL und JL auf 8505 C	80
5.6.2. Einfluss von KI, LL und JL auf B-CPAP	82
5.6.3. Einfluss von KI, LL und JL auf FTC	84
6. Diskussion	86
6.1. Diskussion der Ergebnisse.....	86

6.1.1. Einfluss von KI, LL und JL auf MCF-7 im Vergleich zu MCF-12A.....	86
6.1.2. Apoptose induziert durch KI, LL und JL bei MCF-7 und MCF-12A	87
6.1.3. Einfluss von FK auf MCF-7 und MCF-12A.....	88
6.1.4. Einfluss von CT auf MCF-12A	88
6.1.5. Einfluss von PE auf MCF-7 und MCF-12A.....	89
6.1.6. Redifferenzierungsversuch mit tRA	90
6.1.7. Redifferenzierungsversuch mit Rosiglitazone	91
6.1.8. Redifferenzierungsversuch mit E2	91
6.1.9. Einfluss von KI, LL und JL auf SD-CA	92
6.2. Diskussion der Fehlerquellen.....	94
7. Zusammenfassung.....	95
8. Abbildungsverzeichnis	97
9. Tabellenverzeichnis	98
10. Lebenslauf	99
11. Literaturverzeichnis	100

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylatcyclase
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Akt	Gen für PKB
APAF-1	Apoptotic protease activating factor 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Protein der Bcl-2 Familie
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium-Ion
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
c-myc	celluläres myc (=Onkogen)
CREB	cAMP response element-binding protein
CT	Choleratoxin
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DIDS	4,4'-Diisothiozyanatstilben-2,2'-Disulfonsäure
DCIS	Ductal Carcinoma in Situ
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12)
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	17 β -Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ER	Östrogenrezeptor
Erb 1/2/3/4	= HER 1/2/3/4 (die Rezeptoren der EGFR-Familie)
ERK	extracellular-signal-regulated kinase, =MAPK
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma

Fas	TNF receptor superfamily
FasL	Fas ligand
FK	Forskolin
FKS	Fetales Kälberserum
FRTL	Fisher rat thyroid line
HC	Hydrocortison
HER1/2/3/4	human epidermal growth factor receptor 1/2/3/4
hNIS	humaner NIS
HOI	Hypoiodige Säure
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IL-1/6	Interleukin-1/6
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
JL	Jodlakton
kDa	Kilodalton
KI	Kaliumjodid
LL	Lugol'sche Lösung
M	Mol
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCF-7	Mammakarzinom Zelllinie
mg NIS	mammary gland NIS, Brustdrüsen-NIS
MMI	Methimazol
MPA	Mitochondrial Potential Assay
MW	Mediumwechsel
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
PBS	Phosphatpuffer
PDS	Pendrin
PE	Phorbol ester
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C

PLC	Phospholipase C
PLC- γ 1	Phospholipase C- γ 1
PR	Progesteron
Raf	rat fibrosarcoma
RAR	retinoic acid receptor
Ras	rat sarcoma
SD-CA	Schilddrüsenkarzinomzellen
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
tRA	all-trans-Retinsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
ZZ	Zellzählung

1. Einleitung

Die hemmende Wirkung von Jodid auf die Funktion, das Wachstum und die Apoptose von Schilddrüsenzellen ist hinreichend belegt. Aufgrund zahlreicher Zusammenhänge zwischen der Schild- und Brustdrüse soll in dieser Arbeit die Wirkung von Jod und Jodid auf die Proliferation von Brustkrebszellen untersucht werden. Ziel der Arbeit ist es, die Wirkung von Jod und Jodid auf die Proliferation von Mammakarzinom- und Schilddrüsenkarzinomzellen zu vergleichen.

1.1. Zusammenhang zwischen Schild- und Brustdrüse

In zahlreichen epidemiologischen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen Schilddrüsenkrebs und Brustkrebs bestätigt. Schon im Jahre 1896 deutete Beatson auf einen Zusammenhang zwischen Brust- und Schilddrüsenkrebs hin (Beatson 1896).

Seitdem konnte in vielen Studien eine Verbindung von Brustkrebs Hyperthyreose, Hypothyreose, der Thyroxin Ersatztherapie und Thyreoiditis aufgezeigt werden (Smyth 1997). Während der Jodmangel in Verbindung mit Brustkrebs gebracht werden kann, wird von einigen Autoren [Eskin, Smyth] die ausreichende Jodversorgung mit der Prävention der Brustkrebsentstehung und möglicherweise Progression in Zusammenhang gebracht (Eskin 1977; Smyth 2003). Eine erhöhte Brustkrebsinzidenz wurde in Gebieten mit Jodmangelversorgung festgestellt, wohingegen in Gegenden mit ausreichender Jodversorgung (Japan, Ostasien) eine etwa fünffach niedrigere Inzidenz festgestellt wird (Eskin 1977).

Klinisch konnte ein Zusammenhang zwischen Schilddrüsen-Funktionsstörungen und dem Mammakarzinom gezeigt werden (Smyth 2003; Vorherr 1987; Smyth, Smith et al. 1996).

Aber die Hypothese, dass das Mammakarzinom auf der Basis einer Hypothyreose mit Ovarialinsuffizienz und relativem Hyperöstrogenismus entsteht, konnte klinisch nicht bestätigt werden (Vorherr 1987).

Es konnte jedoch ein Zusammenhang zwischen Jodmangelstrumen und der Inzidenz von Brustkrebs gezeigt werden. Dies führte zu der Annahme, dass ähnliche endokrine oder lokale Wachstumsstimuli wie für die Schilddrüse auch eine Wirkung auf die Brustdrüse ausüben könnten (Smyth, Smith et al. 1996).

Überdies konnte gezeigt werden, dass das Mammakarzinom mit einer Veränderung der Schilddrüsenparameter TSH (Thyreoid-stimulierendes Hormon), T3 und T4

einhergehen kann. Ein erniedrigter T₃- und ein erhöhter TSH-Spiegel zeigte, dass Brustkrebspatientinnen häufig eine Schilddrüsenunterfunktion haben (Rose and Davis 1979). In einer Studie auf Hawaii konnte gezeigt werden, dass ein verminderter Serum-T₄-Spiegel mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko korreliert (Thomas, Bulbrook et al. 1986).

1.1.1. Jodstoffwechsel in der gesunden Schild- und Brustdrüse

Die aktive Aufnahme von Jod aus der Blutbahn entgegen einem Konzentrationsgradienten in die Schilddrüsenzelle wird über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) vermittelt (Dohan, De la Vieja et al. 2003). Diese aktive Jod-Aufnahme ist jedoch nicht Schilddrüsen-spezifisch (Spitzweg, Joba et al. 1998).

Andere Gewebe wie z.B. die Speicheldrüse, die Brustdrüse und die Magenschleimhaut können ebenfalls aktiv Jod über NIS aufnehmen (Kilbane, Ajjan et al. 2000).

Mittels Ganzkörperszintigraphie konnte gezeigt werden, dass Jod aktiv in die Brustdrüse aufgenommen wird (Hammami and Bakheet 1996). Dabei wird Jod nur in gesunde laktierende Brustdrüsen und bei etwa 70% der Mammakarzinome aktiv aufgenommen, nicht jedoch in gesunde nicht laktierende Mammæ (Tazebay, Wapnir et al. 2000).

Jod ist essentiell für die Synthese der Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ und eine ausreichende Jodversorgung ist daher notwendig für die Aufrechterhaltung einer normalen Schilddrüsenfunktion.

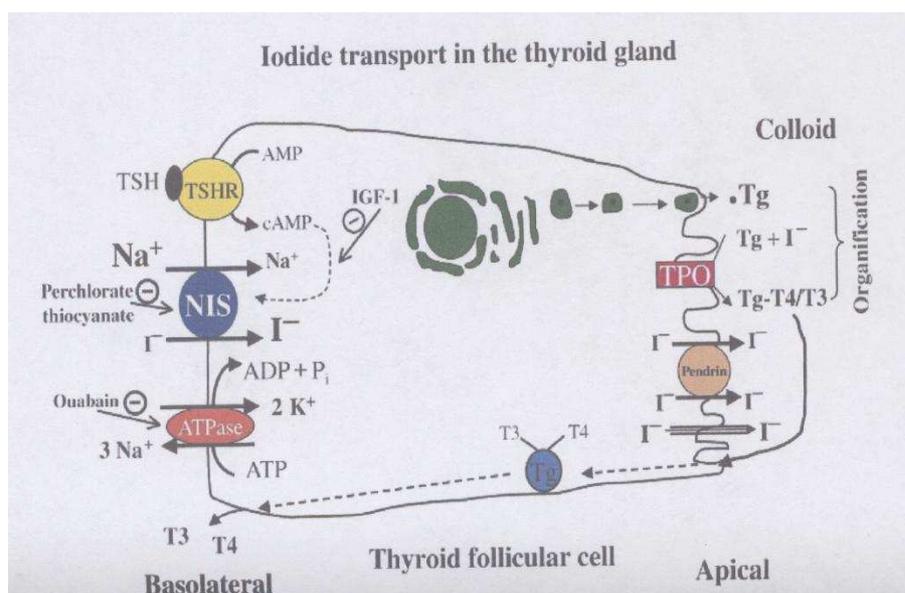


Abbildung 1 (Knostman, Cho et al. 2004): Die Jodid-Aufnahme in die Zelle

Der Natrium-Jodid-Symporter (NIS) ist auf der basolateralen Membran der Schilddrüsenfollikel lokalisiert und vermittelt die Jodanreicherung aus der Blutbahn in die Schilddrüsenfollikel (Dai, Levy et al. 1996). Bei dem NIS handelt es sich um ein membranständiges Glykoprotein, das aus 13 transmembranären Domänen besteht, und ein extrazelluläres Amino- und ein interzelluläres Carboxylende aufweist (Spitzweg and Morris 2002). In gesundem Schilddrüsengewebe transportiert der NIS zwei Natrium- und ein Jodid-Ion entgegen dem elektrochemischen Gradienten. Dieser ins Zellinnere gerichtete Natrium-Gradient wird durch die Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten und treibt den Jodid-Transport an. Über den aktiven Jodid-Transport entsteht ein Jodkonzentrationsgradient zwischen der intrazellulären und der extrazellulären Jodkonzentration im Verhältnis von 30:1. Über Ouabain, einem Hemmer der Natrium-Kalium-ATPase, wird die Jodid-Aufnahme in die Schilddrüsenfollikel gehemmt (Eggo, Bachrach et al. 1986). Daneben wird die Jodid-Aufnahme über NIS kompetitiv durch Thiocyanat und Perchlorat gehemmt (Carrasco 1993).

Das Jodid wird über den AIT (apikaler Jodid-Transporter), das Pendrin (Chlorid-Ionen Symporter) an der apikalen Membran der Schilddrüsenfollikel aktiv in das Schilddrüsenkolloid transportiert.

Seit Jahrzehnten weiß man, dass der Jodid-Transport von TSH über einen Adenylatcyclase-cAMP Signalweg reguliert wird. Heute weiß man, dass TSH die NIS-Gen- und Proteinexpression stimuliert, und daher unter TSH mehr Jod aufgenommen wird (Spitzweg and Morris 2002).

Als Inhibitoren der NIS-Expression und -Funktion konnten unter anderem TGF- β , TNF- α , INF- γ , IL-1 und IL-6 gefunden werden (Spitzweg, Joba et al. 1998). Außerdem konnte in FRTL-5 Zellen gezeigt werden, dass Ceramide und die Sphingomyelinase die NIS-mRNA-Expression herunter regulieren (Pekary and Hershman 1998).

Des Weiteren kann Jodid selbst zu einer Hemmung der NIS-Gen- und Proteinexpression führen, was in einer Studie an FRTL-5 Zellen von Spitzweg et al. im Jahre 1999 gezeigt wurde. So führt die Inkubation der Zellen mit Kaliumjodid zu einer erniedrigten NIS-mRNA und somit zu einer erniedrigten Jodid-Anreicherungsaktivität (Spitzweg, Joba et al. 1998). Dies konnte auch in einer in vivo Studie an Ratten belegt werden, in welcher die Jodgabe mit einer verminderten NIS-mRNA und NIS-Proteinsynthese korrelierte (Eng, Cardona et al. 1999). Eine weitere

Studie an schwangeren Ratten zeigte, dass ein Jodid Mangel die NIS-mRNA-Expression im Sinne eines adaptiven Mechanismus induziert. Jedoch genügte das nicht, um ein normales Niveau an NIS in der fetalen Schilddrüse zu erreichen (Schroder-van der Elst, van der Heide et al. 2001).

Neben seiner Schlüsselrolle in der Schilddrüsenphysiologie bildet NIS die Grundlage für die diagnostische Schilddrüsenzintigraphie und die Radiojod-Therapie in gut- und bösartigem Schilddrüsengewebe. Das Radiojod dient der Zerstörung der hyperthyreoten Schilddrüsengewebe z.B. bei der Basedow-Krankheit und der Therapie von Schilddrüsenkarzinomen und ihren Metastasen (Dohan, De la Vieja et al. 2003).

Die Klonierung des NIS-Gens im Jahre 1996 stellte einen Durchbruch in der NIS-Forschung dar und ermöglichte, die Rolle des NIS in thyreoidalen und extrathyreoidalen Geweben zu verstehen (Spitzweg and Morris 2002).

Bei dem humanen NIS-Gen, welches auf Chromosom 19p12-13 lokalisiert ist, handelt es sich um ein Glykoprotein aus 643 Aminosäuren mit einer molekularen Masse von etwa 90kDa. Die kodierende Region von hNIS, welche den Code für die mRNA beinhaltet, besteht aus 15 Exons und 14 Introns (Smanik, Ryu et al. 1997).

Der Vergleich von hNIS und dem Natrium-Jodid-Symporter der Ratten zeigte einen hohen Grad an Homologie. Im Jahre 2001 gelang die Klonierung des Brustdrüsen-NIS bei Mäusen. Man hat zudem große Mengen an Mäuse-NIS-mRNA in der Schilddrüse, dem Magen und der laktierenden Brustdrüse gefunden (Perron, Rodriguez et al. 2001).

Der Brustdrüsen-NIS wird ebenso wie der Schilddrüsen-NIS auf der basolateralen Membran der Zellen (Alveolarzellen) exprimiert (Spitzweg, Joba et al. 1998).

Im Gegensatz zur Schilddrüse, ist die Jodid-Aufnahme in der Brustdrüse nur während der Schwangerschaft und Laktation physiologisch. Über den Brustdrüsen-NIS wird Jodid aktiv in der Muttermilch angereichert. Das Jodid in der Muttermilch dient dem Neugeborenen zur Synthese der Schilddrüsenhormone. Die Expression des Brustdrüsen-NIS in laktierenden Mammae und die fehlende Expression in nicht laktierenden Brustdrüsen führte zur Annahme, dass Hormone, welche die aktive Laktation bewirken, die Expression von Brustdrüsen-NIS und deren Aktivität stimulieren. In einer Studie von Rillema et al. führte beispielsweise eine Kombination aus Östrogen, Oxytocin und Prolaktin an ovariektomierten Mäusen zu einer maximalen NIS-Expression (Dohan, De la Vieja et al. 2003).

Die Alveolarzellen konzentrieren das Jodid in der Milch dabei um ein sechs- bis fünfzehnfaches im Vergleich zu der Plasma-Jodid-Konzentration, wobei ein Teil des gespeicherten Jodids von Peroxidasen in den Alveolarzellen und im benachbarten Lumen organifiziert wird. Die Jodierung der Tyrosylreste des Caseins oder die Jodanbindung an andere Milchproteine entspricht dabei der Peroxidase-Aktivität (Strum 1978).

Die NIS-Expression in den meisten Mammakarzinomen könnte für die adjuvante Therapie von großer Bedeutung sein, insbesondere wenn es möglich wäre über eine Stimulation der NIS-Expression die Wirksamkeit einer Radiojod-Therapie zu erhöhen (Kogai, Taki et al. 2006).

1.1.2. Der NIS in Schilddrüsen- und Mammakarzinomen

Etwa 80% aller Schilddrüsenkarzinome sind papilläre Schilddrüsenkarzinome. Dies sind differenzierte Karzinome, die von den Follikelzellen abstammen und die Fähigkeit der Jod-Aufnahme nicht verloren haben. Daher ist eine Radiojod-Therapie mit ^{131}I bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen möglich.

Das radioaktive ^{131}I wird aktiv über den NIS sowohl in gesunde als auch differenzierte Schilddrüsenkarzinomzellen transportiert.

Über das TSH kann die NIS-Gen-Expression und die Jodid-Aufnahme auch bei Karzinomzellen gesteigert werden (Fenton, Marion et al. 2008). Somit ermöglicht die NIS vermittelte Jodidanreicherung eine bildgebende Diagnostik z.B. mittels Schilddrüsenszintigraphie. Wenn hinreichend Radiojod im Tumor angereichert wird, kann eine effektive Therapie erzielt werden (Mazzaferri and Robyn 1996).

Dagegen profitieren Patienten mit einer ungenügenden NIS-Expression in den Tumorzellen und damit einer verringerten Radiojod-Aufnahmefähigkeit nicht von der Radiojod-Therapie.

Der NIS-Mangel der malignen Schilddrüsenzellen beruht entweder auf einem Defekt des Membran-Targeting in die Plasmamembran oder auf einem Mechanismus der zu einem Zurückhalten des NIS in der Plasmamembran führt. Deshalb ist das NIS-Targeting in die Plasmamembran das vorwiegende Therapieziel, womit eine gesteigerte Wirksamkeit der Radiojod-Therapie (^{131}I) in Schilddrüsentumoren mit verminderter Jodid-Aufnahmefähigkeit erzielt werden soll. Eine maximale endogene oder exogene TSH-Stimulation ist deshalb für die diagnostische und therapeutische Anwendung von Radiojodid erforderlich (Spitzweg and Morris 2002).

Im Gegensatz zur konstitutiven NIS-Expression der Schilddrüse wird das Brustdrüsen-NIS in der gesunden Brustdrüse nur während der späten Gestationsphase und Laktation exprimiert.

Grundsätzlich ist wichtig, dass der normale Schwellenwert an zirkulierenden Östrogenen überschritten wird, damit eine optimale Brustdrüsen-NIS-Expression erreicht werden kann.

Ferner exprimierten über 80% der menschlichen Brustkrebsgewebeproben einen Brustdrüsen-NIS verglichen mit keiner Brustdrüsen-NIS-Expression des normalen, nicht laktierenden Brustdrüsengewebes (Tazebay, Wapnir et al. 2000).

In einigen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die all-trans-Retinsäure eine erhöhte NIS-Expression in Schilddrüsenkarzinomzellen bewirken kann, und dies wurde auch in der Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 gezeigt (Kogai, Schultz et al. 2000). Durch die gesteigerte NIS-Expression der MCF-7 Zellen konnte der therapeutische Effekt von ^{131}I in vitro verbessert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das synthetische Glucocorticoid Dexamethason in Kombination mit der all-trans-Retinsäure einen additiven Effekt auf die NIS-Expression bei MCF-7 Zellen hat, welche zu einer signifikanten Jodakkumulation und damit einem besseren zytotoxischen Effekt von ^{131}I führte (Kogai, Kanamoto et al. 2004; Kogai, Kanamoto et al. 2005; Unterholzner, Willhauck et al. 2006).

Der additive Effekt von Dexamethason auf eine all-trans-Retinsäure induzierte NIS-Expression und die signifikante Jodanreicherung konnte auch in vivo an MCF-7 Xenotransplantaten in Nacktmäusen belegt werden (Willhauck, Sharif-Samani et al. 2008).

Die Erforschung der Regulation und Beeinflussung der NIS-Expression und NIS Funktion in Mammakarzinomen ist im Bezug auf die mögliche adjuvante Therapie mittels Radiojod von grundlegender Bedeutung.

1.2. Wichtige Signaltransduktionswege in der Schilddrüsen- und Brustdrüsenzelle für die Proliferation

Peptidhormone binden an Rezeptoren der Membran-Außenseite. Die Ligandenbindung bewirkt im Zellinneren eine Signalkette deren Ziel die Aktivierung bzw. Hemmung der Sekretion, des Metabolismus, des Wachstums oder der Differenzierung sein kann.

Bei diesen G-Protein vermittelten Signalwegen kommt es je nach Spezifität entweder zu einer Aktivierung der Phospholipase A oder zu einer Aktivierung der Phospholipase C. Diese Enzyme münden in zwei unterschiedliche Signaltransduktionswege, wobei die Phospholipase A vorwiegend die spezifische Funktion und den Metabolismus, die Phospholipase C die Proliferation reguliert.

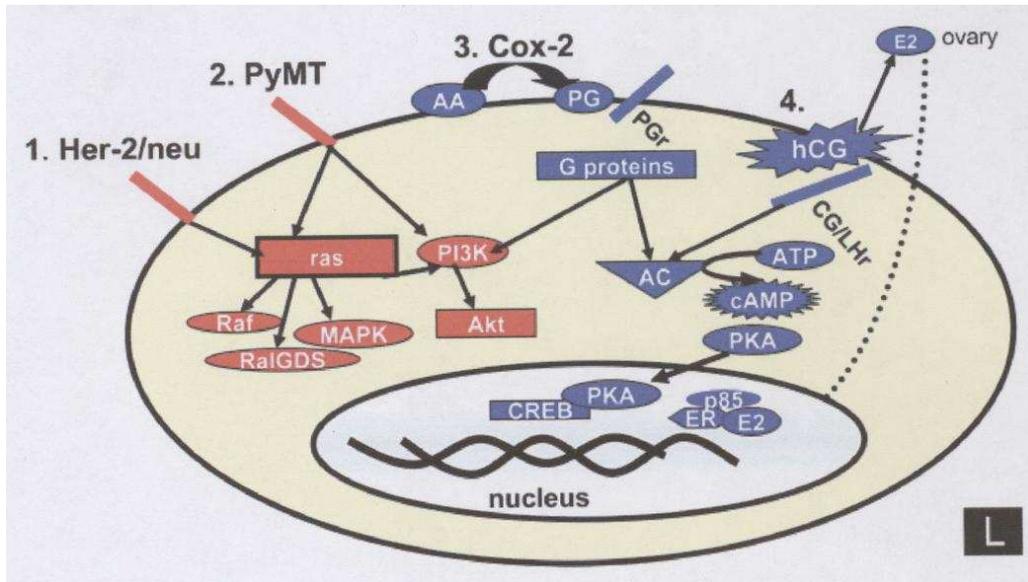


Abbildung 2 (Knostman, Cho et al. 2004): PKA und PI3K Signaltransduktion

1.2.1. Das Adenylatcyclase-System

Schon 1972 wurde gezeigt, dass die Wirkungen einiger Hormone über die Aktivierung der Adenylatcyclase (AC) vermittelt werden (Sutherland 1972).

Die AC ist ein Enzym, welches ATP unter Pyrophosphat-Abspaltung in das cyclische AMP (cAMP) umwandelt. Über eine Erhöhung des cAMP-Spiegels kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase A (Krstic, Sovilj et al.). Die PKA besteht aus vier Untereinheiten, aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen. Ein erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel führt dazu, dass die cAMP-Moleküle an die regulatorische Untereinheit der PKA binden und deren katalytische Untereinheit phosphoryliert. Die phosphorylierte katalytische Untereinheit wandert dann zum Zellkern und phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie das CREB und den CRE-Modulator (Kawasaki, Springett et al. 1998).

Der PKA-Signalweg fördert die Liganden-abhängige Aktivierung des nukleären Östrogenrezeptors ER α in Brustdrüsenzellen (Lamb, Ladha et al. 2000).

In MCF-7 Zellen führt die Aktivierung der PKA zu einem veränderten Agonist/Antagonist-Verhältnis der Antiöstrogene (Fujimoto and Katzenellenbogen 1994).

Die Aktivierung des PKA-Signalwegs schützt den ER α vor Östrogen induziertem Abbau und fördert die ER-Protein Stabilität (Tsai, Katzenellenbogen et al. 2004).

Die aktivierte PKA hemmt also die Brustkrebs-Proliferation und das Östrogen regulierte Zellwachstum (Fontana, Miksis et al. 1987; Zivadinovic, Gametchu et al. 2005) Der genaue Mechanismus mit dem die PKA das ER α -positive Brustkrebswachstum hemmt, bleibt jedoch unklar.

Forskolin, ein Terpen wirkt ebenfalls über die Adenylatcyclase und führt zu einer gesteigerten Zelldifferenzierung, nicht aber Proliferation. Al-Dhaheiri et al. zeigten, dass Forskolin das Östrogen-abhängige Wachstum der MCF-7 supprimierte. Somit wurde die antiproliferative Wirkung des aktivierten PKA-Signalwegs bewiesen. Über die cAMP-Aktivierung durch Forskolin ist aber eine signifikant höhere Jodid-Aufnahme in MCF-7 Zellen zu erzielen. Diese kann mittels Stimulierung mit Prolaktin, Insulin, IGF-1 oder IGF-2 noch um ein Vielfaches gesteigert werden (Arturi, Ferretti et al. 2005; Al-Dhaheiri and Rowan 2007).

1.2.2. Das Phospholipase C-System

Die Phospholipase C (PLC) kann über zwei unterschiedliche Reaktionswege aktiviert werden: Einerseits kann ein G-Protein vermittelter Signalweg für die Stimulierung des Enzyms verantwortlich sein und andererseits können Wachstumsfaktoren, wie PDGF über Tyrosinkinaserzeptoren die PLC aktivieren (Noh, Shin et al. 1995).

Die PLC- γ 1 spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in die sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerin und führt entsprechend zu einer Calcium-Mobilisierung und Aktivierung der Proteinkinase C. Die PLC- γ 1 Tyrosin Phosphorylierung folgt dieser Wechselwirkung mit aktivierten EGF und erbB2 Rezeptoren in vivo, die die enzymatische Aktivität stimulieren (van der Geer, Hunter et al. 1994). Arteaga et al. zeigten, dass PLC- γ 1 in Brusttumorgewebe in höheren Niveaus exprimiert wurde als in normalen Gewebe (Arteaga, Johnson et al. 1991). Darüber hinaus war die PLC- γ 1 in den meisten überexprimierenden Tumoren am Tyrosin-Rest phosphoryliert und dies korrelierte mit der hohen Anzahl an EGF-Rezeptoren bzw. erbB2. Die Bedeutung der PLC- γ 1-Überexprimierung in Brustkrebsgewebe bleibt unklar, da Studien über die Rolle dieses Enzyms in der Wachstumsfaktor-stimulierten Proliferation zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt haben. Zusätzlich reguliert die PLC- γ 1 die zytoskelettale Reorganisation und die Zellmotilität. Chen et al. zeigten dass die Aktivierung der PLC- γ 1 für eine EGF-vermittelte Motilität, aber nicht für eine Mitoseinduktion notwendig ist. Folglich könnte

eine Überexprimierung dieses Enzyms auch das Eindringen in die Zelle und Metastasen beeinflussen (Chen, Gupta et al. 1994; Kairouz and Daly 2000). Phorbolster wirken fördernd auf das Tumorstadium, da sie eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Diacylglycerinen aufweisen und die PKC direkt aktivieren können (Maemura, Iino et al. 1998). Die PKC bewirkt über die Ras-Raf-ERK-Kaskade eine Zellproliferation, indem die Transkription aktiviert wird. δ -Jodlaktone können diese PKC-Aktivität hemmen (Dugrillon and Gartner 1995).

1.3. Das Mammakarzinom

1.3.1. Epidemiologie und Ernährung

Die Inzidenz von Mammakarzinomen ist regional unterschiedlich. Während westliche Industrienationen, insbesondere Nordeuropa und Nordamerika, eine hohe Brustkrebs-Prävalenz aufweisen, ist diese in weniger industrialisierten Nationen und Asien niedriger. Für diese unterschiedliche Prävalenz scheint neben genetischen und Umweltfaktoren sowie Stillzeit auch die Ernährungsgewohnheiten eine Rolle zu spielen. Eine fettreiche Ernährung erhöht das Brustkrebsrisiko und eine fettarme Ernährung, wie sie traditionell in Japan besteht, erniedrigt das Brustkrebsrisiko. In Ländern wie Griechenland, Italien und Spanien ist die Mortalitätsrate trotz fettreicher Ernährung relativ niedrig, was vermutlich an der mediterranen Kost, die reich an gesunden einfach gesättigten Fettsäuren ist, liegt (Mettlin 1999).

Dies konnten internationale Studien belegen. Studien an Tier und Mensch zeigten, dass eine hohe Aufnahme von ω -6 Fettsäuren die Entwicklung von Brust- und Colonkarzinomen fördert. Ein Anstieg der oxidativen DNA-Schäden und Effekte auf die Zellproliferation, den freien Östrogenspiegel und den Hormonstoffwechsel konnten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu haben ω -3 Fettsäuren, die beispielsweise aus Fischöl gewonnen werden, einen protektiven Effekt auf die Brustkrebsentstehung. Diese scheinen die Krebsentstehung zu verhindern, indem sie die PKC-Aktivität und somit die Zellproliferation beeinflussen.

Das Fett aus Fisch und Fischöl ist reich an ω -3 Fettsäuren (Eicosapentaen- und Docosahexaensäure) und schützt vor Brustkrebs. Dies ist mit der niedrigen Brustkrebsinzidenz der Eskimos und japanischen Fischer vereinbar, die trotz hohem Fettanteil der Ernährung eine niedrige Rate an Brust- und Colonkrebs verzeichnen (Bartsch, Nair et al. 1999). Auch in einem Mäusemodell konnte gezeigt werden, dass eine ω -3-Fettsäure-reiche Ernährung mit einem verringerten Wachstum der

Brustkrebszellen und Metastasen und einer gesteigerten Apoptoserate korreliert (Connolly, Gilhooly et al. 1999).

Die Wirkung von Sojabohnen auf das Brustkrebsrisiko wird kontrovers diskutiert.

Die in Sojabohnen enthaltenen Isoflavone haben eine Östrogen-ähnliche chemische Struktur und binden und aktivieren vor allem die ER β -Rezeptoren. Sie besitzen jedoch auch nicht-hormonelle Anteile, welche mit einer Hemmung des Krebszellwachstum assoziiert werden.

Neben den positiven Effekten der Isoflavone zeigen in vitro und Tierstudien einen wachstumsstimulierenden Effekt von Genistein auf Östrogen-sensitive Tumoren (Messina, McCaskill-Stevens et al. 2006).

Neuerdings nimmt man an, dass die traditionelle japanische Ernährung, welche reich an jodhaltigen Meeresalgen ist, das Brustkrebsrisiko verringert. Diese Hypothese ist im Einklang mit der relativ niedrigen Brustkrebsrate in Japan und dem steigenden Risiko bei Japanerinnen, die emigrieren oder eine westliche Ernährungsweise bevorzugen. Der wesentliche Unterschied in der Ernährung beruht auf der täglichen Jod-Aufnahme, welche bei den Japanerinnen im Milligramm- und bei westlichen Frauen im Mikrogramm-Bereich liegt (Smyth 2003).

Im Tierversuch ist gezeigt worden, dass eine ausreichende Jodzufuhr für die normale Brustdrüsenentwicklung nötig ist. Ratten mit einem Jodmangel zeigten atypische und dysplastische Veränderungen des Mammagewebes. Mittels Perchlorat, einem kompetitiven Hemmer des Jodtransports, welcher den Jodmangel verstärkt, können weitere Veränderungen der Brustdrüse hervorgerufen werden (Eskin, Shuman et al. 1975). Diese Veränderungen sind jedoch über eine optimale Jodzufuhr umkehrbar. Im Tierversuch konnten DMBA-induzierte Tumoren bei Ratten über eine Ernährung mit Algenextrakt reduziert werden. Diese Algenextrakte sind Bestandteil der traditionellen japanischen Ernährung (Funahashi, Imai et al. 1999).

Da die jodreiche Ernährung der Japanerinnen offensichtlich zu einem verringerten Brustkrebsrisiko führt, ist die Erforschung der Mechanismen, die eventuell ein Mammakarzinom bei hoher Jodversorgung verhindern können, extrem wichtig.

1.3.2. Risikofaktoren

Es wurde hinreichend belegt, dass genetische Faktoren, die Ernährung, die Umwelt und der Lebensstil eine wichtige Rolle in der Ätiologie des Brustkrebses spielen.

Nur etwa 1-2% des Mammakarzinoms ist genetisch bedingt. Frauen mit einer Keimbahnmutation auf den Genen BRCA1 und BRCA2 haben ein 65% und 45%iges Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken (Antoniou, Pharoah et al. 2003).

Das Brustkrebsrisiko ist altersabhängig und steigt vom 30. bis zum 50. Lebensjahr sehr an. Diese Altersabhängigkeit könnte auf die akkumulierenden DNA-Schäden während eines Lebens zurückzuführen sein. Ebenso von hoher klinischer Relevanz sind Amplifikationen von Onkogenen, wie z.B. des HER-2/neu- und des EGF-Rezeptor-Gens (Cabioglu, Gong et al. 2007).

Außerdem geht ein erhöhter Östrogenspiegel mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einher (Takatani, Okumoto et al. 1989). Dies konnte anhand von Nagetierstudien verdeutlicht werden, wo eine Stimulation mit diesen Hormonen zu einem Anstieg der Mammatumoren führte. Die Abnahme des zirkulierenden Östrogenniveaus z.B. durch die Menopause könnte der Grund dafür sein, dass die Brustkrebsinzidenz nach dem 50. Lebensjahr sinkt (Ronckers, Erdmann et al. 2005).

Ebenso führen orale Kontrazeptiva zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko. Die Einnahme von oralen Kontrazeptiva über mehr als 5 Jahre bedingt einen Anstieg des Brustkrebsrisikos (Tessaro, Beria et al. 2001). Eine Hormonersatztherapie geht ebenfalls mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einher. Dabei steigt das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, bei einer Hormonersatztherapie pro Jahr um 10% (Bernstein 2006). Das Stillen führt zu einem verringerten Brustkrebsrisiko. Dabei gilt: Je länger die Mutter ihren Säugling stillt, desto größer ist der Schutz vor einem Mammakarzinom. Dies konnte auch in Entwicklungsländern verdeutlicht werden, wo eine kurze Stillperiode eine erhöhte Brustkrebsinzidenz bedingt (2002).

Auch die Ernährung scheint das Mammakarzinomrisiko wesentlich zu beeinflussen, wie bereits im Kapitel 1.2.1 dargestellt.

1.4. Apoptoseinduktion in der Schild- und Brustdrüse

Schon lange ist bekannt, dass Jod in der Lage ist das Wachstum von Schilddrüsenzellen zu hemmen und darüber hinaus Apoptose zu induzieren (Dugrillon and Gartner 1995; Langer, Burzler et al. 2003). Neuerdings konnte nun nachgewiesen werden, dass maligne Brustdrüsenzellen offenbar ähnlich durch Jod beeinflusst werden können wie epitheliale Schilddrüsenzellen (Arroyo-Helguera, Anguiano et al. 2006).

Die Apoptose, der programmierte Zelltod, nimmt im Bezug auf die Tumorentstehung eine zentrale Rolle ein. Es handelt sich um einen Energie-abhängigen Mechanismus zur Eliminierung von Zellen mit einer Fehlentwicklung oder irreparablen genetischen Schäden. Eine fehlerhafte Apoptose führt zusammen mit einer erhöhten Zellproliferation folglich zu Hyperplasien und auch Neoplasien (Zhivotovsky and Orrenius 2003).

Maligne entartete Zellen haben sich von der Abhängigkeit vieler Überlebensfaktoren und von der restringierenden Zellkommunikation befreit. Durch die vermehrte Expression von anti-apoptotischen Proteinen, wie Bcl-2 oder Mutation wachstumsregulierender Gene, wie p53, scheinen sie eine Art Apoptoseresistenz zu erwerben (McDonnell, Troncoso et al. 1992).

Man kann zwei Wege der Apoptoseauslösung unterscheiden, den extrinsischen Weg, der Caspase-abhängig über eine Aktivierung von bestimmten Membranrezeptoren geschieht und den mitochondrialen, intrinsischen Weg. Während der extrinsische Weg über Glucocorticoide, T3, Progesteron und Wachstumsfaktoren wie EGF, IGF und sogenannte death factors aus der Gruppe der TNF ausgelöst werden, wird der intrinsische Weg durch oxidativen Stress, Hypoxie, Bestrahlung oder toxische Substanzen ausgelöst (Nagata 1997; Kiess and Gallaher 1998).

Desweiteren kann p53, auch der Wächter des Genoms genannt, Caspase-unabhängig die Apoptose einer Zelle induzieren, wenn eine DNA-Schädigung vorliegt (Lebedeva, Su et al. 2003).

Die unterschiedlichen Auslöser der Apoptose münden jedoch in einer gemeinsamen Endstrecke, der Aktivierung der Caspasen (Wyllie 1997).

Der extrinsische Weg wird wie oben beschrieben über die Bindung eines Liganden (FasL, TNF- α) an einen Rezeptor (Fas, TNFR) ausgelöst. Über die Rekrutierung eines Adaptermoleküls erfolgt die Bildung des Apoptosoms. Die Caspase 8 kann die Caspase 3 direkt aktivieren und dadurch die Caspase-Kaskade auslösen.

Beim intrinsischen Weg kommt es über eine Erhöhung der Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran zu einer Freisetzung von proapoptotischen Faktoren, wie Cytochrom c und AIF in das Cytoplasma. Über die Bindung von Cytochrom c und dATP an APAF-1 kommt es zu einer Konformationsänderung des APAF-1, welche eine Anbindung der Procaspase 9 zulässt. Das gebildete Apoptosom, die aktive Form der Caspase 9, führt zu einer Aktivierung der Caspase-Kaskade.

Über sogenannte Effektor-Caspasen, hauptsächlich Caspase 3, 6 und 7 kommt es zur Induktion des programmierten Zelltodes (Kroemer, Galluzzi et al. 2007).

In Schilddrüsenfollikeln konnte bereits gezeigt werden, dass Jodid auch in normalen epithelialen Thyreozyten eine Apoptose induzieren kann. Methimazol (MMI) hebt die Jodid-Wirkung auf, was darauf hindeutet, dass die Peroxidaseaktivität Voraussetzung für die Jodid-Wirkung und den apoptotischen Effekt ist (Langer, Burzler et al. 2003; Gartner, Rank et al. 2010).

Bei den MCF-7 Zellen scheint die Jod-induzierte Apoptose unabhängig von Caspasen abzulaufen. Jod führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, zur Umverteilung des AIF aus dem Mitochondrium in den Zellkern und zu einem geringeren zellulären Thiol-Gehalt. Insgesamt scheint der Caspase-unabhängige Weg hauptsächlich in den Mitochondrien stattzufinden (Shrivastava, Tiwari et al. 2006).

Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um Ablauf der Apoptose in den Mammakarzinomzellen besser zu verstehen.

Zusammengefasst hat das Jod einen antiproliferativen und apoptotischen Effekt auf Brustkrebszellen und bewirkt den Zelltod über die Apoptoseinduktion.

Nicht Jod selbst, sondern die aus der Arachidonsäure der Zellmembran in Gegenwart von Jod entstehenden Jodlaktone (Boeynaems and Hubbard 1980) hemmen in vitro die Thyreozytenproliferation und induzieren Apoptose (Langer, Burzler et al. 2003; Lehmann, Rank et al. 2006).

Dies ist offenbar vergleichbar mit dem Effekt von Jod auf MCF-7 Zellen. An MCF-7 Zellen konnte gezeigt werden, dass die Apoptoseinduktion Caspase-unabhängig geschieht, wobei es zu einer Aktivierung von Bax, Umverteilung von AIF von den Mitochondrien in den Zellkern und Thiol-Armut kommt (Shrivastava, Tiwari et al. 2006). Jedoch müssen die genauen Signalwege des Jodtransports, des Jodmetabolismus und die nachgeschalteten Signalwege noch aufgeklärt werden.

1.5. Die Wachstumsregulation

1.5.1. Wachstumsfaktoren

TSH ist für die Differenzierung der Schilddrüsenzellen und die Kontrolle der Schilddrüsenhormonsekretion von Bedeutung. TSH kann über die Bindung an den TSH-Rezeptor einen G-Protein vermittelten Signalweg aktivieren. Die TSH-Bindung an den Rezeptor bewirkt eine strukturelle Änderung des Rezeptors und aktiviert das

gebundene G-Protein, welches seinerseits die Adenylatcyclase aktiviert und eine cAMP-Erhöhung bewirkt. Außerdem kann die TSH-Bindung an den Rezeptor eine Phosphatidylinositol/ Ca^{2+} Signalkaskade einleiten, welche die Phospholipase C aktiviert. Die Wirkung von TSH auf die Zellproliferation über die cAMP-Signalkaskade ist umstritten.

Autokrin und parakrin wirkende Wachstumsfaktoren wie IGF-1, EGF, bFGF und endogene Jodid-abhängige Mechanismen sind für die Wachstumsregulation der Schilddrüsenzellen von Bedeutung (Farid, Shi et al. 1994).

Das IGF-1 wird autokrin nach TSH-Stimulation neu synthetisiert und freigesetzt und induziert die Zellproliferation (Hofbauer, Rafferzeder et al. 1995).

Dahingegen hemmt TGF- β 1 die Thyreozytenproliferation (Morris, Ranganathan et al. 1988; Gartner, Schopohl et al. 1997).

Auch Jod ist an der Autoregulation der Schilddrüse beteiligt und vermittelt eine Wachstumshemmung der Schilddrüse, z.B. über eine cAMP-Erniedrigung.

Überschüssiges Jodid hemmt die Jodid-Aufnahme und -Organifizierung und verringert die Protein- und RNA-Biosynthese sowie die Hormonsekretion.

IGF-1, das EGF, das bFGF und das TGF- β sind die wichtigsten intrathyreoidalen Wachstumsfaktoren (Gartner 1992). Diese werden jedoch auch in anderen epithelialen Organen gebildet (van der Laan, Freeman et al. 1995).

EGF und TGF- α sind sehr spezifische Wachstumsfaktoren der Mamma, sie fördern die Brustdrüsenentwicklung und die Differenzierung (Forsyth 1991).

Der EGF, ein Polypeptid aus 53 Aminosäuren, kann die Proliferation und Differenzierung von einer Vielzahl an Zellen beeinflussen. EGF kann das Wachstum von normalen Mammaepithelien und humanen Brustkrebszellen in vitro stimulieren. Die EGF-Rezeptoren wurden auf vielen Brustkrebszelllinien nachgewiesen (Klijn, Berns et al. 1992). Der menschliche EGF-Rezeptor (HER1) ist der Prototyp einer Familie die aus folgenden vier Mitgliedern besteht: EGF-Rezeptor/HER1, neu/erbB2/HER2, erbB3/HER3 und erbB4/HER4. Velu et al. zeigte, dass Zellen, die HER1 überexprimieren, transformiert werden, wenn sie in der Anwesenheit von EGF gezüchtet werden. Etwa 30% der Brusttumoren exprimieren HER1, wobei diese Überexprimierung mit einem Verlust der Östrogenempfindlichkeit und einer schlechteren Prognose einhergeht (Biscardi, Ishizawa et al. 2000).

TGF- α , ein Polypeptid aus 50 Aminosäuren, ist strukturell und biologisch dem EGF homolog und bindet kompetitiv an denselben Rezeptor (Snedeker, Brown et al. 1991).

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Stimulation der Mammaepithelien mit EGF und TGF- α mit einer erhöhten Mitoserate der Zellkultur verknüpft ist (Normanno and Ciardiello 1997).

1.5.2. Jodid versus Jod

Jodid wird während der Schwangerschaft in der Brustdrüse gespeichert und soll das Neugeborene mit Jod versorgen, damit sich dessen Schilddrüsenhormone normal entwickeln (Carrasco 1993).

Die laktierende Mamma nimmt das Jodid über den Natrium-Jodid-Symporter (NIS) in das Zellinnere auf, wo es durch die Laktoperoxidase (LPO) zum Jod oxidiert und an Casein gebunden wird. Dieses erscheint später zusammen mit dem freien Jod in der Muttermilch. Es findet jedoch auch eine Jodid-Aufnahme außerhalb der Schwangerschaft statt, mit dem Unterschied, dass das Jodid über das Pendrin (Jodid-Transporter) aufgenommen wird (Aceves, Anguiano et al. 2005).

Die Aufnahme des Jods erfolgt nicht, wie die Aufnahme des Jodids, über NIS oder Pendrin (PDS) sondern, da es fettlöslich ist, über eine erleichterte Diffusion. Dass es sich um zwei getrennte Aufnahmemechanismen handeln muss, erkannte man an folgenden Unterschieden: Während die Jodid-Aufnahme länger andauert und NIS-abhängig ist, ist die Jod-Aufnahme ein kurzfristiger, NIS-unabhängiger Prozess. Auch unterschiedliche Werte der Michaelis-Menten Konstante K_M und der maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit v_{max} konnten beobachtet werden. Dabei wurde eine hohe Affinität ($K_m = 0.91 \mu M$) und hohe maximale Umsetzungsgeschwindigkeit ($V_{max} = 1.13 \text{ pmol/min pro } 10^4 \text{ Zellen}$) bei der Jod-Aufnahme gemessen, verglichen mit einer niedrigen Affinität und hohen maximalen Umsetzungsgeschwindigkeit ($K_m = 21.9 \mu M$ und $V_{max} = 2.17 \text{ pmol/min pro } 10^4 \text{ Zellen}$) der Jodid-Aufnahme (Kogai, Schultz et al. 2000).

Die Jod-Aufnahme verläuft NIS-, PDS- und Energie-unabhängig, aber Proteinsynthese-abhängig und hat einen Sättigungscharakter ($>5 \mu M$), wie eine Studie von Arroyo-Helguera et al. zeigt (Arroyo-Helguera, Anguiano et al. 2006).

Bei normalen Rattenbrustdrüsen- und Tumorzellen erfolgte eine Jod-Aufnahme trotz Anwesenheit von Kaliumperchlorat ($KClO_4$), einem Hemmer des Natrium-Jodid-Symporters, und DIDS, einem PDS-Hemmer (Garcia-Solis, Alfaro et al. 2005).

Da weder KClO_4 noch DIDS die Jod-Aufnahme in den MCF-7 hemmten, wurde geschlossen, dass NIS und PDS nicht an dem Jod-Aufnahmemechanismus beteiligt sein können. Nach der Jod-Aufnahme kommt es zur kovalenten Bindung des Jods an Lipide und Proteine, wodurch die antiproliferative Wirkung des Jods ausgelöst wird.

So löste auch die Stimulation der MCF-7 Zellen mit Jod und δ -Jodlaktone eine signifikante Hemmung der Proliferation aus und nicht etwa eine KI-Substitution (Arroyo-Helguera, Anguiano et al. 2006).

Ebenso wurde an Schilddrüsenzellen bestätigt, dass das Jodid erst mit Hilfe der Peroxidasen zu Jod oxidiert werden muss und dass das Jod die cytotoxische Wirkung aufwies (Ekholm and Bjorkman 1997).

In Bezug auf die Brustdrüsen führte ein Jodmangel zu Veränderungen der Struktur und der Funktion, was an menschlichen und an Rattenbrustdrüsenzellen gezeigt werden konnte. Außerdem wies man nach, dass Jod effektiver als Jodid zu einer Abnahme der duktaalen Hyperplasien und perilobularen Fibrosen führt (Ghent, Eskin et al. 1993; Eskin, Grotkowski et al. 1995).

Folglich hatte auch nur die chronische Jod-Gabe und nicht die Jodid-Gabe einen antineoplastischen Effekt auf die Brustkrebsentstehung (Garcia-Solis, Alfaro et al. 2005).

1.5.3. Die diagnostische und therapeutische Bedeutung des NIS

Die Rolle von Jod bei der Prävention von Brustdysplasien und Hyperplasien wurde von Eskin et al. bereits 1970 untersucht (Eskin 1970). Im Jahre 2000 beobachteten Kilbane et al., dass der Jodgehalt im Brustkrebsgewebe signifikant niedriger war als im normalen Gewebe. Man schloss, dass die NIS-hemmenden Antikörper, die man in den Seren der Brustkrebspatienten fand, eine gestörte Jodid-Aufnahme bewirkten und somit zur Entwicklung des Brustkrebses führten (Kilbane, Ajjan et al. 2000).

Tazebay et al. identifizierten und beschrieben das Brustdrüsen-NIS (mg NIS). In Western Blot Analysen wurde das mg NIS als Einzelstrang Bande mit der Molekülmasse von ca. 75kDa detektiert. Im Gegensatz zur Expression von NIS in der Schilddrüse, wird das mg NIS nur während der Schwangerschaft und der Laktationsperiode exprimiert. Hormone, die in den Prozess der aktiven Laktation involviert sind, stimulieren dabei die mg NIS-Expression und dessen funktionale Aktivität. So ist eine Mindestanzahl an zirkulierenden Östrogenen für die optimale mg NIS-Expression in der laktierenden Mamma notwendig. Eine Kombination aus Östrogen, Prolaktin und Oxytocin, was der Hormonzusammensetzung bei der

Schwangerschaft entspricht, führte zu der höchsten mg NIS-Expression in ovariektomierten Mäusen (Tazebay, Wapnir et al. 2000).

Rillema et al. erreichten eine maximale NIS-Expression im Brustdrüsengewebe kultivierter Mäuse durch die gleichzeitige Behandlung mit den laktogenetischen Hormonen Insulin, Cortisol und Prolaktin (Rillema, Yu et al. 2000; Rillema, Williams et al. 2002).

Das Radiojod kann aufgrund der Jod-Anreicherung in der Schilddrüse bei der Diagnose von Schilddrüsenknoten eingesetzt werden.

Es könnte jedoch auch bei der Diagnostik und Therapie des Mammakarzinoms Anwendung finden, da es zur funktionellen mg NIS-Expression in nicht laktierenden Mäusen mit Brustadenokarzinom kam. In diesen Mäusen konnte entweder ein aktiviertes Ras-Onkogen (c-Ha-ras) oder eine Überexprimierung des Neu-Onkogens (c-Erb2) festgestellt werden. In einer weiteren Studie wurde die mg NIS-Expression in menschlichen Brustgewebeproben untersucht. 87% der invasiven Karzinome und 83% der DCIS wiesen eine mg NIS-Expression auf, wohingegen nur 23% der nicht-tumorartigen Proben das mg NIS exprimierten. Das häufige Vorkommen des mg NIS bei bösartigen Transformationen in menschlichem Brustgewebe weist auf einen potentiellen diagnostischen Wert hin (Tazebay, Wapnir et al. 2000).

Kogai et al. beobachteten nach einer Retinsäure-Behandlung von MCF-7 Zellen eine erhöhte NIS-Gen-Expression und eine gesteigerte Radiojod-Aufnahme. Die Retinsäure könnte über eine Hemmung des Zellzyklus und die Apoptoseinduktion, eine wichtige Rolle bei der Behandlung von unterschiedlichen Krebsarten spielen. In den ER-Rezeptor-positiven MCF-7 Zellen wurde eine bis zu 9,4fache Steigerung der Jodid-Aufnahme durch die all-trans-Retinsäure-Behandlung beobachtet. Durch die Stimulierung der Jodid-Aufnahme mittels unterschiedlicher Retinsäureverbindungen, folgte man, dass die Jodid-Aufnahme Retinsäure-Rezeptor vermittelt ist. Im Gegensatz dazu bewirkte die Retinsäure-Behandlung in der ER-negativen Zelllinie MCF-12A keine Induktion der Jodid-Aufnahme, was darauf hindeutete, dass die Retinsäure-vermittelte Stimulation der Jodid-Aufnahme zellselektiv ist. Außerdem führte die all-trans-Retinsäure-Behandlung zu einer selektiven Zelltoxizität des ¹³¹Jods in den MCF-7 Zellen. Dies führte erneut zur Annahme, dass die Stimulierung der Radiojod-Aufnahme über die systemische Retinsäure-Behandlung eine Möglichkeit der bildlichen Darstellung und der Therapie beim Brustkrebs sein könnte (Kogai, Schultz et al. 2000).

1.6. Östrogen und Progesteron

Der Östrogenrezeptor ist ein sehr aussagekräftiger Marker bei der Bestimmung der Prognose und der Empfindlichkeit des Brustkrebses gegenüber einer Hormontherapie. Auch der Progesteronrezeptor ist ein häufig verwendeter Marker, jedoch ist dieser weniger etabliert (Payne, Bowen et al. 2008).

Der Östrogenrezeptor ist wesentlich für die Tumorgenese und über endokrine Botenstoffe für die Hemmung der Karzinogenese. Die Hemmung des Östrogenrezeptors kann dabei entweder direkt über schwache Östrogen Agonisten oder indirekt über eine Blockierung der Östrogensynthese aus Androgenen (Dunnwald, Rossing et al. 2007) erfolgen. Die Östrogen-Exposition ist ein bekannter Risikofaktor für die Brustkrebsentstehung (Colditz 1998). Dieses Hormon wirkt über die Östrogenrezeptoren, von welchen es zwei Subtypen, ER α und ER β , gibt (Nilsson, Makela et al. 2001). Die ER sind Transkriptionsfaktoren, welche die Wirkungen von Östrogen vermitteln. Diese Rezeptoren binden in gleichem Ausmaß an Östradiol, jedoch mit unterschiedlicher Affinität und an andere Liganden, wodurch sich unterschiedliche Antworten ergeben (Watanabe, Inoue et al. 1997; Barkhem, Carlsson et al. 1998). Während viele klinische Daten über den ER α existieren, ist nur wenig über die Funktion des ER β bekannt (Payne, Bowen et al. 2008).

Progesteron wird mit einem funktionierenden ER-Signalweg verbunden (Horwitz, Koseki et al. 1978). PR-positive-Tumoren reagieren wahrscheinlich eher auf Tamoxifen (Ravdin, Green et al. 1992).

Über den Östrogen-Signalweg beeinflusst Jod vermutlich die Physiologie der Brust und die Brustkrebsprogression. An Rattenbrustgewebe mit Jodmangel stellte man eine veränderte Anzahl an Östrogenrezeptoren fest. Daraus folgte man, dass Jod eine erhöhte ER α -Synthese bewirkt. Über Tumortransplantationen in Mäuse konnte man zeigen, dass Östrogen-abhängige Tumoren im Gegensatz zu Östrogen-unabhängigen Tumoren eine gesteigerte Anreicherung an radioaktivem Jod aufwiesen. Zelltypen, welche durch den Jodmangel hervorgerufen wurden, konnten über eine Östrogen-Addition noch verschlimmert werden. Genaue molekulare Interaktionen zwischen Jod und Östrogen in der Brust müssen noch geklärt werden (Stoddard, Brooks et al. 2008).

1.7. Die Mammakarzinomzelllinie MCF-7

Die Zellen der MCF-7 Mammakarzinomzelllinie stammen von einem Adenokarzinom der Mamma und wurden aus einem Pleuraerguss einer 69-jährigen Patientin gewonnen. Bei dem Tumor handelt es sich um ein metastasiertes Mammakarzinom nach Bestrahlungs- und Hormontherapie (Soule, Vazquez et al. 1973). Aufgrund der hohen Steroid- und Peptidhormonrezeptorkonzentration hat sich diese Zelllinie als besonders geeignet erwiesen, um die Hormonsensitivität von menschlichen Mammakarzinomzellen zu studieren. Die MCF-7 Zellen weisen eine hohe Anzahl von ER- und PR-Rezeptoren auf und wachsen sowohl in vivo als auch in vitro E2 abhängig (Clarke, Skaar et al. 1994).

So wurde über eine Stimulation mit 17β -Östradiol ein starkes Wachstum induziert, was in vitro als auch bei einem Tumor in Nacktmäusen in vivo belegt werden konnte (Freter, Lippman et al. 1988).

Grund für dieses Wachstum ist zumindest teilweise die Produktion autokriner Wachstumsfaktoren. Sowohl ein TGF- α ähnliches Peptid, das an den EGF-Rezeptor bindet als auch die TGF- α -mRNA-Expression sind unter Östradiol Stimulation erhöht (Bates, Davidson et al. 1988). Zusammenfassend konnte ein Anstieg des Phosphatidylinositol-Metabolismus (Freter, Lippman et al. 1988) eine vermehrte Progesteronrezeptoranzahl (Horwitz and McGuire 1980) sowie eine vermehrte Nukleinsäure-Synthese (Bronzert, Monaco et al. 1981) bewiesen werden.

Hemmend wirkt auf die MCF-7 Zelllinie das Antiöstrogen Tamoxifen, was aus einer Studie aus dem Jahre 1976 hervorgeht. Dieser hemmende Effekt von Tamoxifen konnte wiederum mittels Östrogen rückgängig gemacht werden (Lippman, Bolan et al. 1976).

Dass die MCF-7 Zellen nicht mit tierischen Zellen verunreinigt sind, konnte anhand cytogenetischer Studien belegt werden (Levenson and Jordan 1997). Ebenso belegen das Chromosomenmuster, die Oberflächenantigenität und das Molekulargewicht der ribosomalen RNA die Reinheit der MCF-7 Zelllinie.

1.8. Zielsetzung der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Jod, Jodid und δ -Jodlaktone auf die Zellproliferation der Schilddrüsen- und Mammakarzinomzellen zu untersuchen. Dazu wurden Versuche an folgenden Zelllinien durchgeführt:

papilläre Schilddrüsenkarzinomzellen (B-CPAP),

anaplastische Schilddrüsenkarzinomzellen (8505 C),
follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen (FTC),
normale Brustdrüsenzellen (MCF-12A),
Mammakarzinomzellen (MCF-7).

Außerdem wurde untersucht, ob bei den Mammakarzinomzellen eine Redifferenzierung, also eine vermehrte Jod-Aufnahme mit all-trans-Retinsäure, erreicht werden kann.

Des Weiteren wurde die Aufnahme von Jodid (KI) und molekularem Jod (Lugol'sche Lösung) in MCF-12A und MCF-7 gemessen.

Folgende Versuche wurden hierfür durchgeführt:

- Jod-Aufnahme der MCF-12A und MCF-7 Zellen
- Redifferenzierungsversuch mit all-trans-Retinsäure bei MCF-12A und MCF-7
- Einfluss von E2, Forskolin und Phorbol ester auf die Zellproliferation der MCF-7 und MCF-12A
- Einfluss von Cholera toxin auf die Zellproliferation der MCF-12A
- Vergleich des Einflusses von Jodid, Jod und Jodlaktone auf die Zellproliferation von gesunden Mammazellen (MCF-12A), MCF-7 und Schilddrüsenkarzinomzellen (SD-CA)
- Einfluss von Rosiglitazone auf die Zellproliferation der MCF-7 Zellen
- Vergleich der gesunden Mammazellen (MCF-12A) und MCF-7 Zellen

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zelllinien

Gesunde Brustdrüsenzellen MCF-12A

Die MCF-12A wurden von der Firma ATCC bezogen (Produkt-Code: CRL-10782; Ampuke Passage No. 54). Es wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml mit ca. 71% lebenden Zellen geliefert.

Mammakarzinomzellen MCF-7 Zellen (alt)

Die MCF-7 Zellen wurden freundlicherweise von der Frauenklinik (Labor 126), Maistraße, München zur Verfügung gestellt.

Mammakarzinomzellen MCF-7 Zellen (vom 10.10.06)

Die MCF-7 Zellen wurden bei der Firma ATCC bezogen (Produkt-Code: HTB 22; Ampule Passage No. 146). Die 5×10^6 Zellen waren zu ca. 77% lebend.

Die Ampulle wurde ca. zwei Minuten vorsichtig im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut.

Danach wurden 5ml eiskaltes Fetales Kälberserum (FKS) zugefügt und die Zellsuspension bei 800U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und das Pellet in frischem Medium gelöst. Die MCF-7 Zellen wurden in eine 25cm² Flasche gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Schilddrüsenkarzinomzellen FTC 133 (vom 27.03.07)

Die Zelllinie stammt aus einer Lymphknotenmetastase eines metastasierten follikulären Schilddrüsenkarzinoms. Die Zellen tragen intakte EGF- und TSH-Rezeptoren und können Thyreoglobulin bilden (Goretzki, Frilling et al. 1990).

Die Schilddrüsenkarzinomzellen wurden freundlicherweise von PD Dr. Hoang-Vu, Halle, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in 250ml DMEM/F12 Medium mit 10% FKS geliefert. Das Medium wurde auf 20ml abgegossen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die FTC Zellen wurden weiterhin mit DMEM/F12 Medium und 10% FKS stimuliert. Sie wurden in 7ml Flaschen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Schilddrüsenkarzinomzellen 8505C (vom 27.03.07)

Die Zelllinie stammt aus einem undifferenzierten Schilddrüsenkarzinom. Der Primärtumor wies einen hohen Anteil undifferenzierter Zellen, aber auch papilläre Strukturen auf (Ito, Seyama et al. 1993).

Die Schilddrüsenkarzinomzellen wurden ebenfalls von PD Dr. Hoang-Vu, Halle, zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in 250ml DMEM/F12 Medium mit 10% FKS geliefert. Das Medium wurde auf 20ml abgegossen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die 8505C Zellen bekamen weiterhin DMEM/F12 Medium mit 10% FKS, wurden in 20ml Flaschen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Schilddrüsenkarzinomzellen B-CPAP (vom 27.03.07)

Die Zelllinie wurde aus dem Primärtumor eines metastasierenden papillären Schilddrüsenkarzinoms gewonnen (Fabien, Fusco et al. 1994).

Auch diese Schilddrüsenkarzinomzellen wurden von PD Dr. Hoang-Vu, Halle zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in 250ml DMEM/F12 Medium mit 10% FKS geliefert. Das Medium wurde auf 20ml abgegossen und im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die B-CPAP Zellen erhielten nach dem Zellsplit RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, wurden in 20ml Flaschen gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.1.2. Kulturmedien

Medium für die MCF-12A Zelllinie

Das Wachstumsmedium für die MCF-12A Zellen wurde entsprechend der Beschreibung der Firma ATCC® hergestellt. Das RPMI 1640 Medium enthielt bereits Glutamin und NaHCO₃, Glucose (1g/l) und eine Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung der Fa. Gibco, bestehend aus Penicillin (10000U/ml), Streptomycin (10000µl/ml) und Amphotericin B (25µg/ml) in 0,85% Saline gelöst, wurden ergänzt. Danach wurde das Medium mit EGF (20ng/ml), Cholera toxin (100ng/ml), Insulin (0,01 mg/ml) und Hydrocortison (500ng/ml) versehen. Dieses Medium wurde als Wachstumsmedium und zum Waschen der Zellen beim Zellsplit verwendet.

FKS wurde erst später beigefügt, jeweils 10% zu den Flaschen und 5% zu den Platten.

Medium für die MCF-7 Zelllinie

Entsprechend der Produktbeschreibung der Firma ATCC® wurde das Medium hergestellt. Dem RPMI 1640 Medium wurden zusätzlich Glucose (1g/l) und die Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung, wie bei den MCF-12A beschrieben, zugefügt. Dieses Medium wurde als Wachstumsmedium und zum Waschen der Zellen beim Zellsplit verwendet. FKS wurde erst später zugegeben, jeweils 10% zu den Flaschen und 5% zu den Platten. Außerdem wurde zu den Flaschen jeweils 0,01mg/ml Insulin hinzugefügt.

Medium für die FTC und 8505C Zelllinie

Das DMEM/F12 Medium der Firma Sigma enthielt bereits 15mM HEPES, NaHCO₃, L-Glutamin und Pyridoxin. In das Medium wurden Glucose (1g/l) und die Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung wie oben beschrieben sowie 10% FKS zugefügt.

Medium für die B-CPAP Zelllinie

Das DMEM/F12 Medium der Firma Sigma enthielt bereits 15mM HEPES, NaHCO_3 , L-Glutamin und Pyridoxin. Dem Medium wurden Glucose (1g/l) und die Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung wie oben beschrieben zugefügt und 10% FKS dazu gegeben.

Die B-CPAP erhielten anfangs DMEM/F12 Medium und später RPMI 1640 Medium mit 10% FKS. Dem RPMI 1640 Medium wurden zusätzlich Glucose (1g/l) und die Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung, wie bei den MCF-12A beschrieben, zugefügt.

2.1.3. Geräte

Coulter Electronics Ltd., Dunstable Bedfordshire, England

Coulter Counter, Modell Sampling Stand II

Coulter Multisizer

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Mikro 24-28

Universal 30 RF

Napco, Portland, Oregon, USA

CO_2 -Inkubator

Nikon, Tokio

Inverses Fluoreszenzmikroskop Diaphot TMD

Lichtmikroskop TMS

Uniequip, München

Laminar Air Flow UV UB 1200

2.1.4. Arbeitsmaterial

Costar, Corning, NY, USA

24-Well-Platten

Kulturflaschen, hydrophil (75cm², 250ml)

Eppendorf, Hamburg

Concentrator 3301 (Vakuumzentrifuge)

Pipetten

Pipettenspitzen

Greiner

50ml Zentrifugiergefäße (Blue Cap)

Heraeus, Hanau

hydrophobe Petri-Perm-Schalen

Nunc

Cryo Tube Vials (1,8ml)

2.1.5. Substanzen

Coulter Electronics Ltd., Krefeld

Coulter Clenz, Reinigungslösung

Gibco BRL/ invitrogen, Karlsruhe

Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung, L-Glutamin, FKS, PBS-Puffer,

Trypsin-EDTA (10x)

J.T. Baker, Deventer, Holland

Isotone Lösung

Merck, Darmstadt

H₂O₂, KI, D(+) Glucose

Novo Nordisk, Mainz

Insulin Novo Actrapid

R&D systems, Minneapolis, USA

De Psipher Mitochondrial Potential Assay-kit

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Trypsin

Serva, Heidelberg

Acridinorange, Ethidiumbromid

Sigma, Taufkirchen

BSA (98%), Cholera-toxin, DMSO, EDTA, EGF, Hydrocortison, RPMI 1640, DMEM/F12

2.1.6. Herstellung der Puffer und Lösungen

TRIS-EDTA Puffer für die Zellzählung

TRIS (1M; ~34ml) und EDTA (Titriplex III; 9,3g) wurden auf 1l PBS aufgefüllt, wobei der pH=8,0 erreicht werden sollte.

Trypsin-EDTA für die Zellzählung

400ml PBS und 1g EDTA (Titriplex III) sollten durch Zugabe von 1N NaOH auf den pH=7,4 eingestellt werden. Danach wurden 100ml Trypsin Lösung (Fa. Roche) zugefügt und die entstandene 500ml Lösung steril filtriert. Es entstand eine 10-fache Lösung mit 0,5% Trypsin und 0,2% EDTA.

Für die Zellzählung wurde die 10x-Lösung im Verhältnis 1:4 weiter verdünnt und enthielt folglich 0,125% Trypsin und 0,05% EDTA.

PBS/ BSA

BSA (1mg/1ml) wird im PBS-Puffer 1:100 verdünnt (1ml BSA+ 99ml PBS)

EGF

0,2mg EGF wurden in 20ml PBS/BSA gelöst, woraufhin man eine 10 μ g/1ml-Stocklösung erhielt. Diese wurde 1:500 in die Flasche verdünnt, um die gewünschte Konzentration von 20ng/ml zu bekommen.

Insulin

Das Insulin Actrapid enthält 40U/ml und wurde 1:1,6 in PBS/BSA auf die Stocklösung von 1mg/ml verdünnt (z.B. 10ml Actrapid und 6ml PBS/BSA).

Diese wurde 1:100 in die Flasche weiter verdünnt, was zu einer 0,01mg/ml-Konzentration führte.

Hydrocortison

Von einem Gramm Hydrocortison (89%) der Fa. Sigma (89%) wurden 5 mg in 100ml PBS/BSA gelöst, um auf die Stocklösung von 50 μ g/ml zu kommen. Diese wurde dann 1:100 in die Flasche verdünnt, was eine Konzentration von 500ng/ml ergab.

Choleratoxin

Das Choleratoxin von der Fa. Sigma enthielt 1mg lyophilisiertes Pulver. Dieses wurde in 1ml Aqua dest. gelöst was eine Konzentration von 1000 μ g/1ml lieferte. Diese wurde 1:100 in PBS/BSA auf die Stocklösung von 10 μ g/1ml verdünnt.

Um die gewünschte Konzentration von 100ng/ml zu erhalten, wurde die Stocklösung 1:100 in die Flasche weiter verdünnt.

Glucose

10g D (Anselmi, Hernandez et al.) Glucose der Fa. Merck wurden auf der Waage genau abgewogen und danach unter nicht sterilen Bedingungen auf dem Rührgerät in 50ml PBS-Puffer gelöst. Dies ergab eine Stocklösung von 10000mg/50ml (=200mg/1ml). Diese Lösung wurde unter dem Laminar-Flow mit Hilfe einer Spritze steril durch einen Filter gedrückt. Danach wurden je 2,5ml dieser sterilen Lösung in einem NUNC-Röhrchen portioniert. Je 2,5ml Glucose-Lösung wurden später zu einer Flasche RPMI Medium (=500ml) gegeben, wodurch die Glucose 1:500 zu einer Konzentration von 1mg/1ml (=1g/1l) weiter verdünnt wurde.

2.2. Methoden

2.2.1. Allgemeine Arbeitsbedingungen

Es wurde unter semi-sterilen Bedingungen gearbeitet und alle Arbeitsschritte unter dem Laminar-Flow durchgeführt. Die Materialien wurden nur steril verpackt verwendet und erst unter dem Laminar-Flow geöffnet. Zur Weiterverwendung von einzelnen Materialien wurden diese unter dem Bunsenbrenner abgeflammt.

Die Lösungen wurden in noch geschlossenem Zustand unter den Laminar-Flow gestellt und vor bzw. nach Benützung abgeflammt.

Das tägliche Reinigen der Arbeitsfläche mit 70%-igem Alkohol sollte ein möglichst keimfreies Arbeiten garantieren. Monatlich wurde der Brutschrank mit Alkohol und Antimykotika geputzt und mit frischem destillierten Wasser und neuen sterilen Einsätzen versehen.

Lösungen, welche Zellen enthielten, durften nur mit 1000 μ l- Spitzen pipettiert werden um eine Schädigung der Zellwände zu verhindern. Beim Verwenden von 200 μ l-Pipettenspitzen bestünde die Gefahr, die Zellen zu zerstören.

Das Silikonisieren der Pipettenspitzen und der Eppendorfgefäße sollte einem Anhaften der Zellen an die Pipettenspitzen bzw. Gefäßwände vorbeugen. Dazu

wurden die Pipetten und Gefäße mit Serva Silicone Solution benetzt und danach das Silikon im 100°C heißen Ofen eingebrannt.

2.2.2. Kultivierung

Es wurde stets eine drei- bis viertägige Wachstumsphase eingehalten, weshalb der Zellsplit alle drei bis vier Tage wiederholt wurde. Die angesetzten Platten wurden nach mindestens drei Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ Atmosphäre stimuliert. Der Mediumwechsel wurde immer 24 Stunden nach der Zellsplittung durchgeführt, eine Zellzählung hatte nach vier Tagen zu erfolgen.

2.2.3. Zellsplittung

Nachdem man die Flaschen aus dem Brutschrank genommen hatte, wurde der Überstand vollständig abgesaugt und der Zellrasen mit 5ml vorgewärmtem PBS gewaschen. Danach werden 0,5ml Trypsin-EDTA und 4,5ml PBS in die Flasche gegeben. Nach 15-30 Minuten Inkubation bei 37°C lösten sich die Zellen als Monolayer vom Flaschenboden und traten als Einzelzellsuspensionen unter dem Mikroskop in Erscheinung.

Mit 10% FKS und RPMI Medium wurden die Zellen durch wiederholtes Aufziehen mit einer 1000µl Pipette vermischt und nach Überführen in ein steriles Röhrchen bei 1450U/min und 20°C fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5ml RPMI Medium gelöst. Danach wurden eine Zellzählung und eine Vitalfärbung durchgeführt.

In die Platten wurden ca. 90000 Zellen pro Well verteilt und danach je 5% FKS und RPMI Medium gegeben. Nach drei Stunden erfolgte die Stimulierung. Dabei wurde stets die erste Reihe der Platte unter Standardbedingungen für Basalwerte kultiviert. Die folgenden Wells wurden mit der jeweiligen Konzentration für 48h präinkubiert.

2.2.4. Zellzählung

Je 1ml Medium wurde aus den Wells der Platten abgesaugt und danach 750µl TRIS-EDTA Puffer und 250µl Trypsin-EDTA (10x Lösung) dazu pipettiert.

Nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank wurden die Zellteppiche durch mehrmaliges Aufziehen mit der 1000µl Pipette zu Einzelzellen aufgetrennt.

Es wurden nun 200µl der Zellsuspension in ein Zählöpfchen pipettiert und in 10ml isotoner Lösung 1:51 verdünnt. Mit dem Coulter Counter konnte die Gesamtzahl der Zellen in dem Zählöpfchen berechnet werden. Der Coulter Multisizer wurde im full-

Bereich auf 5-25 μ m und im narrow-Bereich auf 8-20 μ m eingestellt. Damit wurde festgelegt, dass Zellen in dieser Größenordnung als Mammakarzinomzellen erkannt werden.

Beim Zellsplit wurden 100 μ l Zellsuspension in 10ml isotoner Lösung verdünnt, was einer Verdünnung von 1:101 entsprach. Da die vom Coulter Counter berechnete Zellzahl x pro 500 μ l angegeben wird, muss bei der Berechnung der Gesamtzellzahl durch 500 dividiert werden. Damit erhält man die Zellzahl x, die in 1ml enthalten ist. Danach muss man die Verdünnung (Adamu, Fatihu et al.) und die Menge der Zellsuspension in μ l (z.B. 5000 μ l oder 10000 μ l) multiplizieren.

Rechenbeispiel:

Zellzahl 1= 9803	MW= 9944	÷ 500	
Zellzahl 2= 10085		x 101	
		x 10000 (= 10ml Zelllösung)	
Gesamtzellzahl		= 20,1 x 10 ⁶	
		x 0,90 (= 90% lebende Zellen)	
Gesamt-ZZ.(lebend)		= 18,1 x 10 ⁶	

2.2.5. Zellzählung mit MTT Assay

1g Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromid wurde von der Fa. Sigma bezogen und in 10ml PBS-Puffer gelöst. Danach wurde die Lösung 1:20 zu der 5mg/ml MTT-Stocklösung verdünnt. Die 5mg/ml-Stocklösung wurde im Dunkeln (eingewickelt in Folie) bei -20°C eingefroren.

Nachdem Auftauen der 5mg/ml MTT-Stocklösung wurde diese 1:10 mit PBS zu einer 0,5mg/ml MTT-Lösung für den Ansatz weiter verdünnt.

Das RPMI Medium wurde von den MCF-7 Zellplatten abpipettiert und 1ml MTT (0,5mg/ml) in jedes Well pipettiert. Danach wurde die Platte zwei Stunden lang bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die MTT-Farblösung veränderte die Farbe von gelb in violett/blau und auf den Zellen konnte man unter dem Mikroskop violett/blau Spots erkennen. Nun wurde die MTT-Lösung abpipettiert und einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Dann wurde 1ml Lösungsmittel (10% DMSO+90% Isopropanol) in jedes Well hinzugefügt und die Platte fünf Minuten lang bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Daraufhin wurden je 120 μ l abgezogen und in eine 96 Wellplatte

pipettiert. Diese Platten wurden bei 590nm (Messfilter) /620nm (Referenzfilter) mit dem SLT Spectron (Spektrophotometer) gemessen.

2.2.6. Vitalfärbung

Bei der Lebendfärbung verwendeten wir Acridin-Orange das 1:2 mit Ethidiumbromid gemischt und daraufhin 1:10 mit RPMI Medium verdünnt wurde.

Um eine 1:10 Verdünnung zu erhalten wurden 100 μ l Acridin-Orange+ Ethidiumbromid in 900 μ l RPMI gegeben.

Dann wurden 50 μ l der Zellsuspension und 50 μ l verdünntes Farbgemisch auf einen Objektträger gebracht und unter dem Mikroskop mit dem blauen Filter betrachtet. Die lebenden Zellen erschienen grün und die toten Zellen orange.

2.2.7. Kryokonservierung

Die Zellen werden entsprechend einer Passage abtrypsinisiert und die Zellzahl mit dem Coulter Counter bestimmt.

Das Einfriermedium, bestehend aus 7,4ml RPMI Medium (mit Glukose; ohne Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung), 1,5ml FKS (15% FKS) und 1,1ml Dimethylsulfoxyd (11,25%) wurde auf Eis gestellt. Das Dimethylsulfoxyd (DMSO) wurde nur tröpfchenweise zu dem restlichen Einfriermedium pipettiert, um das Ausfallen des DMSO zu verhindern.

Nachdem das eiskalte Einfriermedium zu den Zellen gegeben und gemischt wurde, wurden je 1,8ml der Mischung in ein NUNC-Röhrchen gegeben. Dieses wurde danach in einer mit Zellstoff gefüllten Styroporschachtel 24 Stunden lang in einer -80°C Gefriertruhe aufbewahrt und dann im flüssigen Stickstoff (-196°C) eingefroren.

2.2.8. Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff (-196°C) entnommen und im Wasserbad kurz aufgetaut.

Danach wurden die Zellen in ein 10ml NUNC-Röhrchen gegeben, in dem sich 5ml eiskaltes FKS befand und bei 1000U/min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde durch Zugabe von RPMI Medium (inkl. Glucose und Antibiotikum/Antimykotikum-Lösung) gelöst und zusammen mit 10% FKS in eine 75 cm² Flasche gegeben.

Danach wurde die Flasche in einem Brutschrank bei 37°C unter CO₂-Begasung von 5% unter sterilen Bedingungen gehalten.

2.2.9. Herstellung von Jodlakton

Es wurden 84,56ml PBS (0,1M, pH 7,4) in einen geschliffenen Erlenmeyerkolben gegeben. Zu dem PBS-Puffer wurden 5ml der 33mM-Arachidonsäure-Stocklösung (Endkonzentration 1,65mM = 500 μ g/ml), 10ml der 40mM-KI-Lösung (4mM = 660 μ g/ml), 50 μ l der 100 μ Ci/ml K125I (0,05 μ Ci/ml) und 150 μ l der 1,2M-H₂O₂-Lösung (1,8mM) gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 240 μ l der 5mg/ml-Laktoperoxidase (LPO) (12 μ g/ml = 2400U/l) bei einem Reaktionsvolumen von 100ml gestartet. Den Reaktionsstart durch LPO-Zugabe sah man an einem roten Farbumschlag, der sich danach wieder langsam entfärbte. Dem Reaktionsgemisch wurde ein Magnetrührer zugegeben, dann wurde es unter Stickstoff (N₂) verschlossen und für 30 Minuten bei 20°C gerührt.

Die lipophilen Produkte wurden durch Extraktion mit 200ml Ethylacetat isoliert und überschüssiges Jodid blieb in der wässrigen Phase zurück. Durch Zugabe von 20 Gramm getrocknetem Na₂SO₄ wurde das restliche Wasser gebunden. Danach wurde der Ethylacetat-Überstand in ein Spitzglas gegeben und dieses unter N₂ in einem Wasserbad bei 37°C eingetrocknet. Die Produkte wurden bis zur Durchführung der Säulenchromatographie bei -80°C unter Stickstoffatmosphäre gelagert.

Die Säulenchromatographie wurde bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Glassäule mit einem Volumen von 50ml wurde mit Kieselgel 40 (Fa. Fluka) und Chloroform gepackt und mit 70ml Chloroform (zwei Säulenvolumina Chloroform) vorgespült. Die eingetrockneten Proben wurden in 500 μ l Chloroform gelöst und auf die Kieselgel-Säule aufgetragen. Chloroform wurde nach Einsinken der Probe aufgeschichtet und die Pumpe angeschaltet. Es wurde mit 90ml Chloroform, also dem dreifachen Säulenvolumen, nachgespült. Die Elution erfolgte mit 32ml Methanol, wobei ca. 12ml in einem Töpfchen aufgefangen wurden (batch) und erst danach Fraktionen à 2ml in Röhrchen gesammelt wurden. Danach wurde ein Aliquot von 100 μ l aus jeder Fraktion im γ -Counter gezählt und die Fraktionen des Jodlakton Peaks gepoolt, unter N₂ getrocknet und bei -80°C aufbewahrt. Unter der Voraussetzung, dass Jodid stöchiometrisch im Verhältnis 1:1 in Jodlakton umgesetzt wird, konnte die Konzentration des gewonnenen δ -Jodlakton berechnet werden.

Nach Berechnung der Radioaktivität wurde die Jodlakton-Probe auf die Konzentration von 10mM in 100% Ethanol gelöst und für den weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

Später wurde die Probe 1:100 in 90mg/ml BSA und 10% Ethanol auf eine 100 μ M JL-Stocklösung verdünnt. Die 100 μ M-Stocklösung wurde entweder 1:20 auf eine 5 μ M-Konzentration oder 1:50 auf eine 2 μ M-Konzentration weiter verdünnt.

2.2.10. Mitochondrial Potential Assay (Apoptosenachweis)

MPA ist ein Nachweisverfahren, das die mangelnde Intaktheit der Zell- oder Zellorganellmembranen zunutze macht (Willingham 1999). Im intakten Mitochondrium wird zur ATP-Synthese ein negatives Membranpotential von -180mV bis -200mV gegenüber dem Zytoplasma erhalten. Lipophile Kationen diffundieren entlang dieses Gradienten ins Mitochondrium und können durch Sichtbarmachung zur Beurteilung der mitochondrialen Funktion herangezogen werden (Bernardi, Scorrano et al. 1999; Lehmann, Rank et al. 2006).

Wir verwendeten De Psipher, einen Mitochondrial Potential Assay der Firma R&D Systems. Dieser Kit beinhaltet den Farbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-Carbozyaniniodid, ein Zyaninderivat, das in hydrophiler Umgebung Aggregate bildet und unter hydrophoben Bedingungen als Monomer vorliegt. Bei intaktem Membranpotential akkumuliert es selektiv in der Mitochondrienmembran als rot-fluoreszierendes Aggregat. Bei Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials verbleibt der Farbstoff als grün-fluoreszierendes Monomer im Zytoplasma.

Zur Apoptoseinduktion wurden die Zellen in einer 24-Well-Platte zu ca. 50000 Zellen verteilt. Es wurden jeweils zwei bis drei Wells, also Doppel- bzw. Dreifachwerte, für die verschiedenen Substanzen zur Apoptoseinduktion angelegt. Gemäß der Anleitung wurde eine Färbelösung aus Aqua dest., verdünntem Puffer, Stabilizer und Farbe zubereitet. Nach Apoptoseinduktion mit Jodid, Jod oder Jodlaktone wurde das Medium abgehoben und die Zellen mit je 500 μ l Färbelösung 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Färbelösung mit Puffer vertauscht. Zur Zählung wurde ein Fluoreszenzfilter von 495nm verwendet.

Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern vorgenommen, die nach festgelegten Kriterien vorgehen: Grüne Zellen galten als apoptotisch, rote als lebend.

Die Gesichtsfelder wurden zufällig eingestellt und aus möglichst verschiedenen Bereichen des Wells gewählt. In jedem Well wurden insgesamt 500 Zellen gezählt, je Probe also mindestens 1000 Zellen.

3. Versuchsdurchführung

3.1. Jod-Aufnahme der MCF-12A und MCF-7

Das I-125 der Fa. Amersham (GE Healthcare) hatte eine Aktivität von 74MBq = 2mCi in 22 μ l, was einer Aktivität von 90mCi in 1000 μ l entspricht. Über eine 1:200 Verdünnung mit PBS/BSA wurde eine Aktivität von 0,45mCi, bzw. 450 μ Ci erzeugt.

Eine 1: 50 Weiterverdünnung mit PBS/BSA lieferte eine Aktivität von 9 μ Ci.

Für den Jodmix wurden drei unterschiedliche KI Konzentrationen, nämlich 0,1 μ M, 1 μ M und 100 μ M KI, in PBS/BSA verdünnt und mit 100 μ l Jod-125 Tracer (9 μ Ci) markiert. Bei allen drei Konzentrationen wurden ca. 11423cpm/10 μ l Jodmix im γ -Counter gemessen.

Die MCF-12A wurden in drei unterschiedlichen Flaschen (Basal, 500ng/ml E2 und 500ng/ml PG) drei Tage lang bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und danach gesplittet.

Dabei erhielt man die E2-Konzentration von 500ng/ml indem man die 10 μ g/ml-Stocklösung 1:20 mit PBS/BSA verdünnte. Die PG-Konzentration von 500ng/ml konnte ebenfalls durch eine 1:20 Verdünnung der 10 μ g/ml-Stocklösung mit PBS/BSA hergestellt werden.

Die ca. 10 Millionen MCF-12A Zellen pro Flasche wurden auf 12 Eppendorfgefäße mit je 0,83 Millionen Zellen verteilt. Danach wurden 1ml RPMI Medium (5% FKS) und 10 μ l Jodmix der drei unterschiedlichen KI-Konzentrationen zugegeben, so dass man vier Eppendorfgefäße pro KI-Konzentration als Ansatz erhielt.

Die Eppendorfgefäße wurden nun bei 37°C und 5% CO₂ drei Stunden lang inkubiert und stündlich geschüttelt.

Nach drei Stunden Inkubation wurden die Eppendorfgefäße bei 20°C und 1000U/min fünf Minuten zentrifugiert und dann zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Nachdem der Überstand abpipettiert wurde, konnte das Pellet im γ -Counter gezählt werden. Mit dem γ -Counter wurden zuerst die Aktivität des Referenz-Trays und des leeren Zählständers und dann die 12 Eppendorfgefäße pro Ansatz gemessen.

Um auszuschließen, dass das Zellwachstum den Jodeinbau beeinträchtigte, wurde der Jodeinbau in PetriPerm-Schalen wiederholt. Die hydrophobe Membran der PetriPerm-Schalen sollte das Anwachsen der Zellen sowie das Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus verhindern. Auf jede PetriPerm-Schale wurden ca. vier Millionen Zellen verteilt und mit 5ml RPMI (5% FCS) versetzt. Zusätzlich wurden in die PetriPerm-Schalen für den Östrogen-Ansatz 250 μ l E2 und für den Progesteron-

Ansatz 250 μ l PG pipettiert. Nach drei Tagen Präinkubation der PetriPerm-Schalen (37°C und 5% CO₂) hafteten ungefähr 80% der Zellen monolayerartig an der hydrophoben Membran an. Nach Hinzufügen von 50 μ l Jodmix pro Schale wurden diese für weitere drei Stunden inkubiert und dabei dreimal vorsichtig geschüttelt.

Mit Hilfe eines Zellschabers gelang es, die Zellhaufen vom Boden der Schalen abzulösen, und mittels Auf- und Abziehen mit einer 1000 μ l Pipette konnten die Zellaggregate verkleinert werden. Aus einer PetriPerm-Schale konnte man vier Eppendorfgefäße befüllen. Nach fünfminütigem Zentrifugieren bei 20°C und 1000U/min folgte zweimal der Waschvorgang mit eiskaltem PBS. Daraufhin wurden die Pellets im γ -Counter gezählt.

3.2. Redifferenzierungsversuch mit tRA bei MCF-12A und MCF-7

Die all-trans-Retinsäure (R2625; 50mg) hatte ein Molekulargewicht von 300,45g/l. Eine 1:100 Verdünnung wurde vorgenommen, indem 30mg tRA präzise abgewogen und in 10ml 100% EtOH gelöst wurden. Das gelöste tRA wurde unter dem Laminar-Flow durch einen sterilen Filter gedrückt und danach 1:10 weiter verdünnt. Dazu wurden 1ml tRA-Lösung in 9ml 100% EtOH gelöst. Die 1000 μ M-Stocklösung wurde bei -20° im Gefrierschrank aufbewahrt und somit vor UV-Strahlen geschützt.

Eine 1:1000 Verdünnung in das Well einer Platte lieferte die gewünschte Konzentration von 1 μ M tRA.

Um eine 48-Stunden-Präinkubation der Zellen mit tRA zu erhalten, wurden diese erst zu ca. 700000 Zellen/Well in 24-Well-Plattenverteilt und mit RPMI Medium und 5% FKS versetzt. Danach erfolgte die Inkubation mit 1 μ M tRA und eine zweitägige Inkubation bei 5%CO₂ und 37°C im Brutschrank. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit KI (100 μ M), LL (100 μ M) und JL(5 μ M) stimuliert und für weitere 72 Stunden inkubiert bevor die Zellzählung erfolgte.

Platte \rightarrow 48h Inkubation (5% CO ₂ & 37°C) \rightarrow MW + Inkubation (KI/LL/JL) \rightarrow 72h Inkubation (5%CO ₂ & 37°C) \rightarrow ZZ
--

3.3. Einfluss von E2, FK und PE auf MCF-7 und MCF-12A

Östrogen (E2)-Stocklösung:

Die Stimulierung mit Östrogen (E2) erfolgte in zwei Konzentrationen mit 250ng/ml und 500ng/ml. Die Zellkulturplatten wurden wie folgt angelegt: Die erste Reihe diente als Kontrollreihe, wurde also nicht stimuliert. In die zweite Reihe wurden 100 μ M KI bzw. LL und 250ng/ml E2 pipettiert und die dritte Reihe wurde mit 100 μ M KI bzw. LL und 500ng/ml E2 stimuliert. In der vierten Reihe erfolgte dann ein Vergleich der beiden Östrogen-Konzentrationen, weshalb je zwei Wells mit 250ng/ml E2 und 500ng/ml versetzt wurden.

Um die Östrogen-Konzentrationen herzustellen, wurde eine 10 μ g/ml-Stocklösung verwendet, die in PBS/BSA zum einen 1:40 für die 250ng/ml-Konzentration und 1:20 für die 500ng/ml-Konzentration verdünnt wurde.

Die 100 μ M KI bzw. LL erhielt man über eine 1:100 Verdünnung der jeweiligen 10mM-Stocklösung.

Forskolin-Stocklösung:

10mg Forskolin wurden in 1525 μ l 100%igem Ethanol gelöst und somit entstand eine 16mM-Stocklösung, die 1:8 in PBS/ BSA weiter zu einer 2mM-Stocklösung verdünnt wurde.

Um die gewünschten Konzentrationen 40 μ M, 20 μ M und 10 μ M zu erhalten, wurde die Stocklösung jeweils 1:50, 1:100 und 1:200 weiter in das Well der Platte verdünnt. Dazu wurden entsprechend 20 μ l, 10 μ l und 5 μ l in das 1ml Well pipettiert.

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-Stocklösung:

1mg Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (P8139) wurden von der Fa. Sigma bezogen.

In 162 μ l 100%igem Ethanol wurden 1mg Phorbol-12-Myristat-13-Acetat gelöst und eine 10mM-Konzentration hergestellt.

Diese wurde mit PBS/BSA 1:1000 zu einer 10000nM-Stocklösung verdünnt.

Weiter wurde die 10000nM-Konzentration mit PBS/BSA 1:10 verdünnt, womit man eine 1000nM-Stocklösung erhielt.

Die beiden Stocklösungen wurden 1:100 ins Well hinein verdünnt, wodurch eine 100nM- und eine 10nM-Konzentration hergestellt wurde. Die 2nM-Konzentration erhielt man, indem man eine 1:500 Verdünnung der 1000nM-Konzentration durchführte.

Da die Zellzählung der MCF-12A (9.Passage) sowohl nach der Inkubation mit Forskolin als auch Phorbol ester eine signifikante Hemmung zeigte, jedoch ein Wachstum der Zellen beim Phorbol ester erwartet wurde, wurden Verdünnungsmedien angesetzt, um herauszufinden, ob der Ethanolgehalt zu hoch war und eventuell eine Zerstörung der Zellen bewirkt hat.

Die Forskolin Verdünnung wurde wiederholt, indem zuerst eine 1:8 Verdünnung erfolgte (1ml EtOH in 7ml PBS/BSA). Die 2mM-Stocklösung wurde je 1:50 (20 μ l EtOH in 1ml Well), 1:100 (10 μ l EtOH in 1ml) und 1:200 (5 μ l EtOH in 1ml) auf die Konzentrationen 100nM, 10nM und 2nM verdünnt, was den EtOH Konzentrationen von 0,25%, 0,125% und 0,0625% entspricht.

Die Phorbol ester Stocklösung wurde 1:1000 verdünnt (10 μ l EtOH in 10000 μ l PBS/BSA) und diese dann 1:100 weiter verdünnt (10 μ l in 1ml) zur 100nM-Konzentration (=0,001% EtOH). Um die zweite Stocklösung zu erhalten, wurde die 10000nM-Stocklösung 1:10 zu einer 1000nM-Stocklösung verdünnt (1ml EtOH in 9ml PBS/BSA). Diese wurde dann zum einen 1:100 verdünnt, um die 10nM-Konzentration zu erhalten (10 μ l in 1ml) und zum anderen 1:500, um die 2nM-Konzentration herzustellen (2 μ l in 1ml) (= 0,0001% und 0,00002% EtOH).

3.4. Einfluss von CT auf MCF-12A

1mg lyophilisiertes Cholera toxin wurde bei der Fa. Sigma bezogen. CT (1mg) wurde in 1ml Aqua dest. gelöst. Nach 1:100 Verdünnung mit PBS/BSA erhielt man die 10000ng/ml-Stocklösung, die bei -20°C eingefroren wurde. Um die gewünschte Konzentration 100ng/ml zu erhalten, wurde die Stocklösung 1:100 in die Flasche verdünnt.

Um den Einfluss von Cholera toxin auf die Zellproliferation zu untersuchen, wurden zwei 24-Well-Platten angelegt, von denen eine mit Cholera toxin inkubiert wurde. Bei beiden Platten wurde jeweils die erste Reihe als Kontrollreihe angelegt und die folgenden Reihen mit KI 100 μ M, Jod 100 μ M bzw. JL5 μ M inkubiert.

3.5. Einfluss von KI, LL und JL auf MCF-12A, MCF-7 und SD-CA

24-Well-Platten wurden sowohl für die MCF-7, MCF-12A und Schilddrüsenkarzinomzellen angesetzt. Das Kaliumjodid wurde in den folgenden Konzentrationen dazu pipettiert: 0 μ M, 10 μ M und 100 μ M. Bei der Lugol'schen

Lösung, welche aus KI (16,67g), Jod (8,3g) und gereinigtem Wasser (500g) zusammengesetzt ist, wurde ebenso mit den Konzentrationen 0 μ M, 10 μ M und 100 μ M gearbeitet.

Sowohl KI als auch LL lagen als 10mM-Stocklösung vor, die 1:10 zu einer 1mM=1000 μ M-Stocklösung verdünnt wurde.

Letztere wurde 1:100 zu einer 10 μ M-Konzentration weiter verdünnt, indem 10 μ l KI bzw. LL in das Well pipettiert wurden. Außerdem verdünnte man die 1mM-Stocklösung 1:10 zu einer 100 μ M-Konzentration, wobei hier erst 100 μ l RPMI Medium aus dem Well abpipettiert und danach 100 μ l KI bzw. LL hinzugefügt wurden.

Beim Jodlaktone wurden die Konzentrationen 2 μ M und 5 μ M verwendet.

Die 100 μ M-Stocklösung wurde hier zum einen 1:50 zu einer 2 μ M-Konzentration und zum anderen 1:20 zu einer 5 μ M-Konzentration verdünnt. Um zu einer 2 μ M-Endkonzentration zu gelangen, wurden 20 μ l JL in das Well pipettiert, und um eine 5 μ M-Endkonzentration zu erhalten, musste man 50 μ l JL in das Well geben.

3.6. Einfluss von Rosiglitazone auf MCF-7

Rosiglitazone Stocklösung:

50mg Rosiglitazone-Pulver wurde von Glaxosmith Kline zur Verfügung gestellt. Das Molekulargewicht betrug 473,52g/l. Es wurden 47,35mg präzise abgewogen in 10ml 100%igem EtOH gelöst, was einer 10mM-Konzentration entsprach. Danach wurde das gelöste Rosiglitazone unter dem Laminar-Flow durch einen sterilen Filter gedrückt und 1:10 mit PBS/BSA weiter auf eine 1mM-Konzentration verdünnt. Die 1mM-Stocklösung wurde bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt. Eine Verdünnung 1:100 in das Well lieferte die gewünschte Konzentration von 10 μ M.

Es wurden zwei unterschiedliche Versuchsreihen durchgeführt. Zum einen wurde die Platte 24 Stunden und zum anderen 48 Stunden mit Rosiglitazone präinkubiert. Die Zellzählung erfolgte jeweils nach drei Tagen.

Platte \rightarrow 24h Präinkubation mit 10 μ M Rosiglitazone \rightarrow MW + Inkubation (KI/LL/JL) \rightarrow 48h Brutschrank (5%CO ₂ & 37°C) \rightarrow ZZ

Platte \rightarrow 48h Präinkubation mit 10 μ M Rosiglitazone \rightarrow MW + Inkubation (KI/LL/JL) \rightarrow 24h Brutschrank (5%CO ₂ & 37°C) \rightarrow ZZ

3.7. Vergleich von MCF-12A und MCF-7

24-Well-Platten wurden für die gesunden Mammazellen MCF-12A und für die Mammakarzinomzellen MCF-7 angelegt. Es wurde die all-trans-Retinsäure (tRA)-Wirkung auf die MCF-12A Zelllinie mit der tRA-Wirkung auf die MCF-7 Zelllinie verglichen. Die MCF-12A wurden mit 1 μ M tRA zwei Tage bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert. Nach einem Mediumwechsel wurden die Zellen mit KI (100 μ M), Jod (100 μ M) und JL (5 μ M) inkubiert für weitere 72 Stunden bevor die Zellzählung erfolgte. Ebenso ging man bei den MCF-7 Zellen vor.

Darüber hinaus wurden die hemmende Wirkung von Kaliumjodid, Jod und Jodlaktone auf die MCF-12A Zellen und die MCF-7 Zellen verglichen. Dazu wurden die MCF-12A Zellen mit 10 μ M LL, 100 μ M LL, 10 μ M KI, 100 μ M KI, 2 μ M JL und 5 μ M JL inkubiert und bei 37°C und 5% CO₂ über drei Tage kultiviert. Mit den MCF-7 Zellen wurde analog verfahren. Nach drei Tagen erfolgte die Zellzählung.

4. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm SPSS 15.0 verwendet. Signifikante Unterschiede wurden durch den nicht-parametrischen Wilcoxon-Vorzeichenrangtest für verbundene Stichproben ermittelt.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse als Boxplots erfolgte auch mit SPSS 15.0.

5. Ergebnisse

5.1. Einfluss von KI, LL und JL auf MCF-7 im Vergleich zu MCF-12A

Dazu wurden die MCF-7 Zellen und die MCF-12A auf jeweils eine 24-Well-Platte verteilt. Die Inkubation erfolgte mit Jod (10 μ M LL, 100 μ M LL), Jodid (10 μ M KI, 100 μ M KI) und Jodlaktone (2 μ M, 5 μ M). Nach drei Tagen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Bei den MCF-7 Zellen führte eine Inkubation mit Jod, Jodid und Jodlaktone zu einer dosisabhängigen Reduzierung der Zellzahl. Jodid führte in den Konzentrationen 10 μ M und 100 μ M zu einer Verringerung der MCF-7 Zellzahl auf 87% und 82%. Die Verringerung der MCF-7 Zellzahl durch Zugabe von KI war somit dosisabhängig und signifikant ($p < 0,05$). Jod in den Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M führte zu einer Verringerung der MCF-7 Zellzahl auf 92% und 87%. Auch die Reduzierung der MCF-7 Zellzahl durch Zugabe von Jod war dosisabhängig und signifikant ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu wurde die MCF-7 Zellzahl bereits mit 5 μ M Jodlaktone auf 70% reduziert. Ebenso wie bei Jodid und Jod zeigte sich bei Jodlaktone eine dosisabhängige und signifikante ($p < 0,05$) Verringerung der MCF-7 Zellzahl.

Die Inkubation mit Jod, Jodid und Jodlaktone hatte auf das MCF-12A-Wachstum keinen eindeutig erkennbaren Einfluss. Während die MCF-12A Zellzahl durch die Jodid- und Jodinkubation annähernd gleich blieb, führte die Zugabe von 5 μ M Jodlaktone zu einer signifikanten Erhöhung der MCF-12A Zellzahl ($p < 0,05$). Jodid führte in den Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M KI zu einer gleichbleibenden MCF-7 Zellzahl von 99% und 100%. Die Zugabe von Jod in Konzentrationen von 10 μ M und 100 μ M führte zu einer geringfügigen Erniedrigung der MCF-12A Zellzahl auf 97% und 92%. Im Gegensatz dazu ergab die Zugabe von 2 μ M Jodlaktone tendenziell eine Erhöhung der MCF-12A Zellzahl, die sich durch die Zugabe von 5 μ M Jodlaktone bestätigte. Durch 5 μ M Jodlaktone wurde die Zellzahl auf 116% erhöht.

Einfluss von Jodid, Jod und JL auf MCF-7 Zellen

KI	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	3025,8	1604,8	3050,6	2560,4	
KI 10	2510,6	1677,8	2557,2	2248,533333	0,021
KI 100	2236,4	1530,2	2600,2	2122,266667	0,000

LL	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	3095,6	1673,6	2777,25	2515,483333	
LL 10	2709,8	1455,8	2807,4	2324,333333	0,004
LL 100	2564,4	1517,25	2511,6	2197,75	0,008

JL	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	2826,2	1921,4	2787,4	2511,666667	
JL 2	2455,6	1722,8	2624,8	2267,733333	0,004
JL 5	1911,6	1550,6	1880,2	1780,8	0,000

Tabelle 1 Einfluss von Jodid, Jod und JL auf MCF-7

Dosisabhängiger Effekt von Kaliumjodid (10 μ M KI und 100 μ M KI), Jod (10 μ M und 100 μ M LL) und Jodlaktone (2 μ M und 5 μ M) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 10 μ M KI, 100 μ M KI, 10 μ M LL, 100 μ M LL, 2 μ M Jodlaktone und 5 μ M Jodlaktone war signifikant ($p < 0,05$).

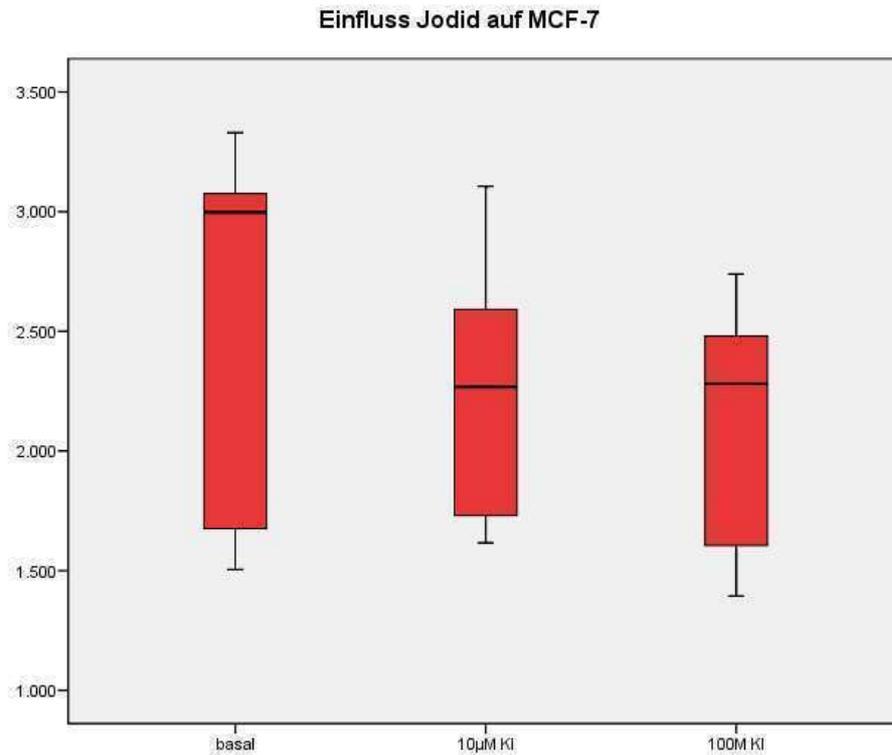


Abbildung 3 Einfluss von Jodid auf MCF-7

Dosisabhängiger Effekt von Kaliumjodid (10µM KI und 100µM KI) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 10µM KI und 100µM KI war signifikant ($p < 0,05$).

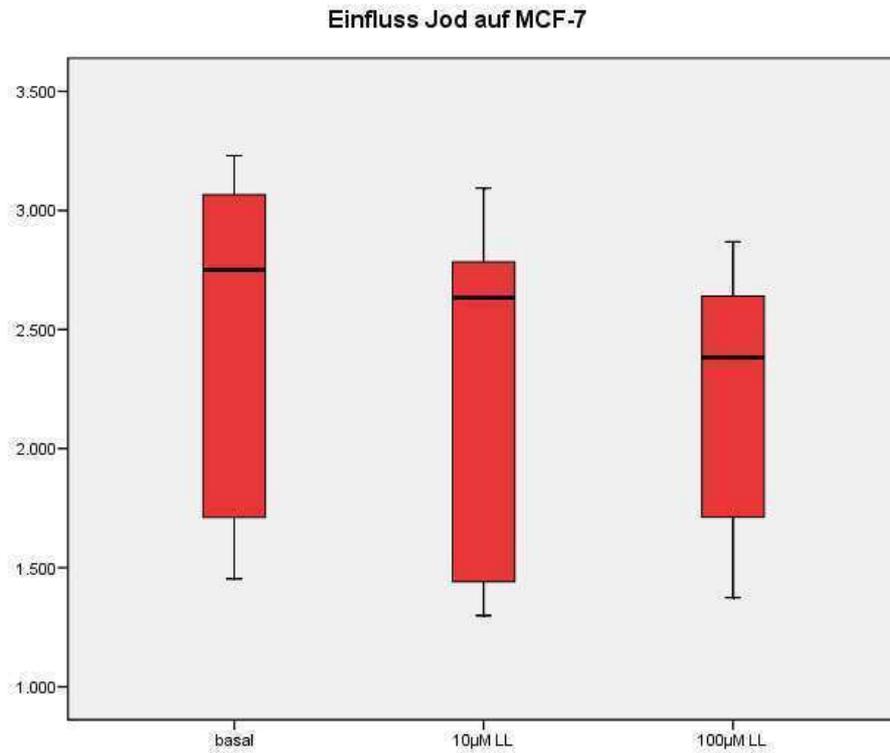


Abbildung 4 Einfluss von Jod auf MCF-7

Dosisabhängiger Effekt von Jod (10µM LL und 100µM LL) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 10µM LL und 100µM LL war signifikant ($p < 0,05$).

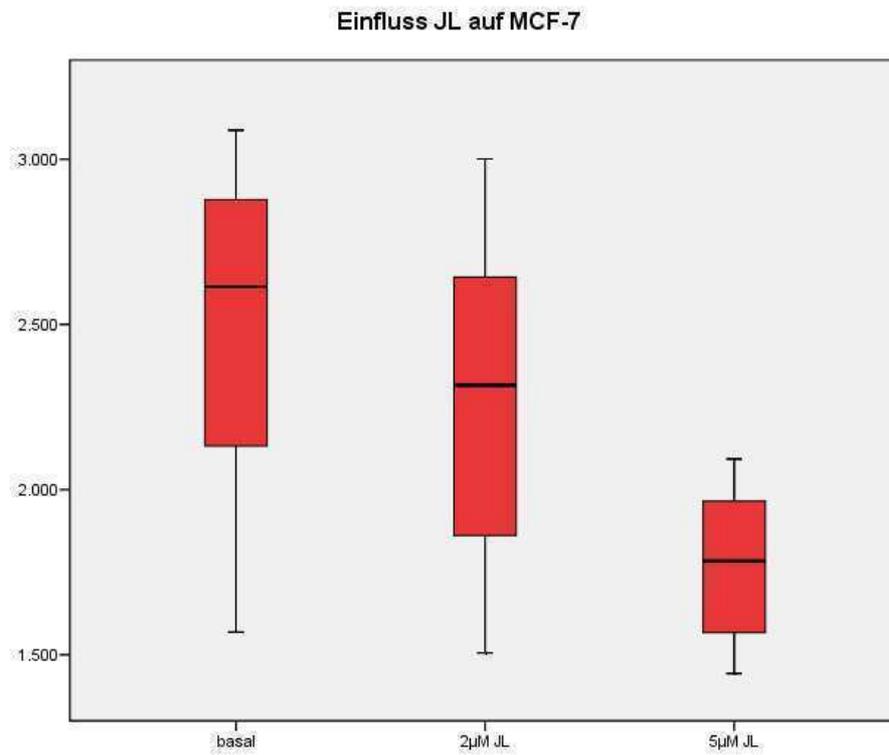


Abbildung 5 Einfluss von JL auf MCF-7

Dosisabhängiger Effekt von Jodlaktin (2µM JL und 5µM JL) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 2µM JL und 5µM JL war signifikant ($p < 0,05$).

Einfluss von Jodid, Jod und JL auf MCF-12A Zellen

KI	MW1	MW2	MW ges	Signifikanz
C	2840,8	1213,6	2027,2	
KI 10	2744,8	1274,4	2009,6	0,423
KI 100	2670,2	1416,4	2043,3	0,500

LL	MW1	MW2	MW ges	Signifikanz
C	2995,4	1957,8	2476,6	
LL 10	2769,2	2047	2408,1	0,500
LL 100	2515,4	2044,6	2280	0,080

JL	MW1	MW2	MW ges	Signifikanz
C	2952,6	2067,2	2509,9	
JL 2	2811,4	2384,6	2598	0,348
JL 5	2928,4	2913,6	2921	0,032

Tabelle 2 Einfluss von Jodid, Jod und JL auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Kaliumjodid (10 μ M KI und 100 μ M KI), Jod (10 μ M und 100 μ M LL) und Jodlaktone (2 μ M und 5 μ M) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Wachstumsstimulation mit 5 μ M JL war signifikant ($p < 0,05$).

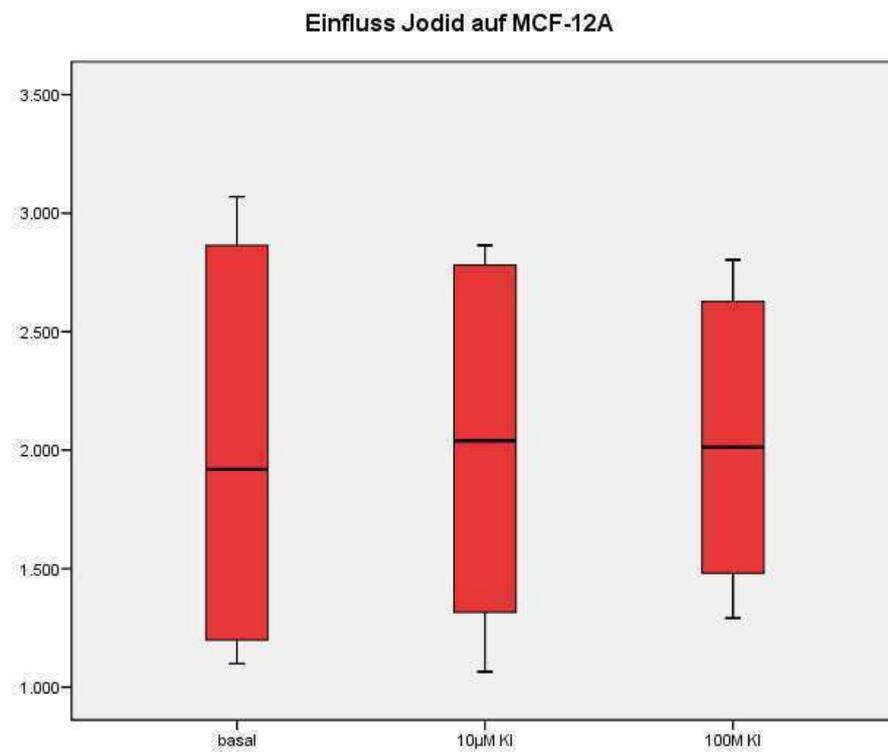


Abbildung 6 Einfluss von Jodid auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Kaliumjodid (10µM KI und 100µM KI) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt.

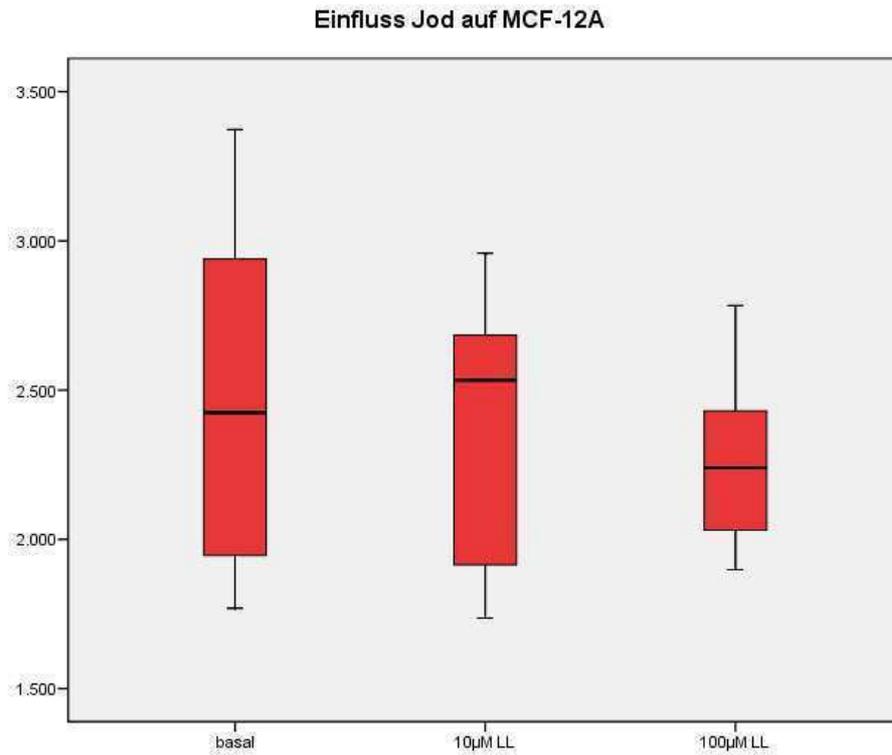


Abbildung 7 Einfluss von Jod auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Jod (10µM LL und 100µM LL) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt.

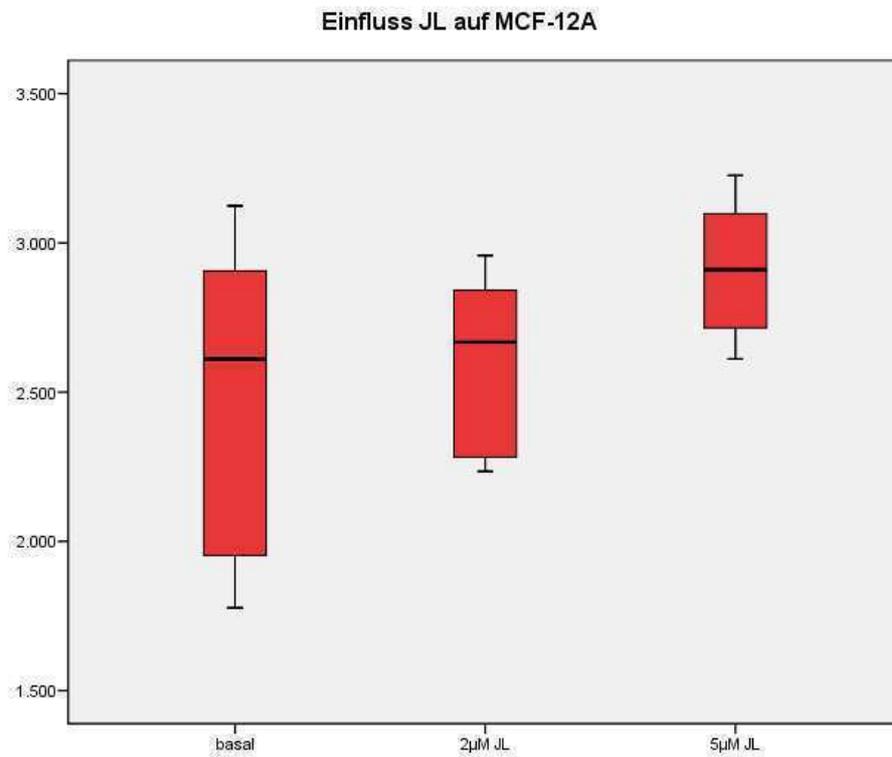


Abbildung 8 Einfluss von Jodlakton auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Jodlakton (2µM JL und 5µM JL) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Wachstumsstimulation mit 5µM JL war signifikant ($p < 0,05$).

5.2. Apoptoseinduktion durch KI, LL und JL bei MCF-7 und MCF-12A

Zum Nachweis der Apoptose wurde der Mitochondrial Potential Assay der Fa. R&D Systems, wie unter Punkt 2.2.10 beschrieben, verwendet. Die Apoptoseinduktion erfolgte mit Jod (100 μ M LL), Jodid (100 μ M KI) und Jodlaktone (2 μ M, 5 μ M). Nach 24 Stunden Inkubation mit den unterschiedlichen Substanzen erfolgte die Zellzählung.

Die MCF-7 Zellen waren nach 24-stündiger Inkubation mit 100 μ M KI zu 27% apoptotisch. Nach Inkubation mit 100 μ M LL waren 32% der MCF-7 Zellen apoptotisch. Die Inkubation mit 2 μ M Jodlaktone zeigte sogar eine Apoptoserate von 36%.

Bei dem MCF-12A führte die Inkubation mit 100 μ M KI zu einer Apoptoserate von 11%. Auch führte die Inkubation der MCF-12A mit 100 μ M LL, 2 μ M JL und 5 μ M JL zu einer Apoptoserate von ca. 9%.

Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-7 Zellen

Apoptose in %	MW1	MW2	MW ges	Signifikanz
C	15,75	17	16,375	
KI 100	28	26,75	27,375	0,008
LL 100	33,3333	30,5	31,91667	0,008
JL 2	29	43	36	0,016

Tabelle 3 Apoptose durch Jodid, Jod und JL auf MCF-7

Prozentsatz an apoptotischen MCF-7 Zellen induziert durch Kaliumjodid (100 μ M KI), Jod (100 μ M LL) und Jodlaktin (2 μ M). Die Apoptose wurde mit dem De Psipher MPA bestimmt. Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen war bei 100 μ M KI, 100 μ M LL und 2 μ M JL signifikant höher im Vergleich zur Basalgruppe.

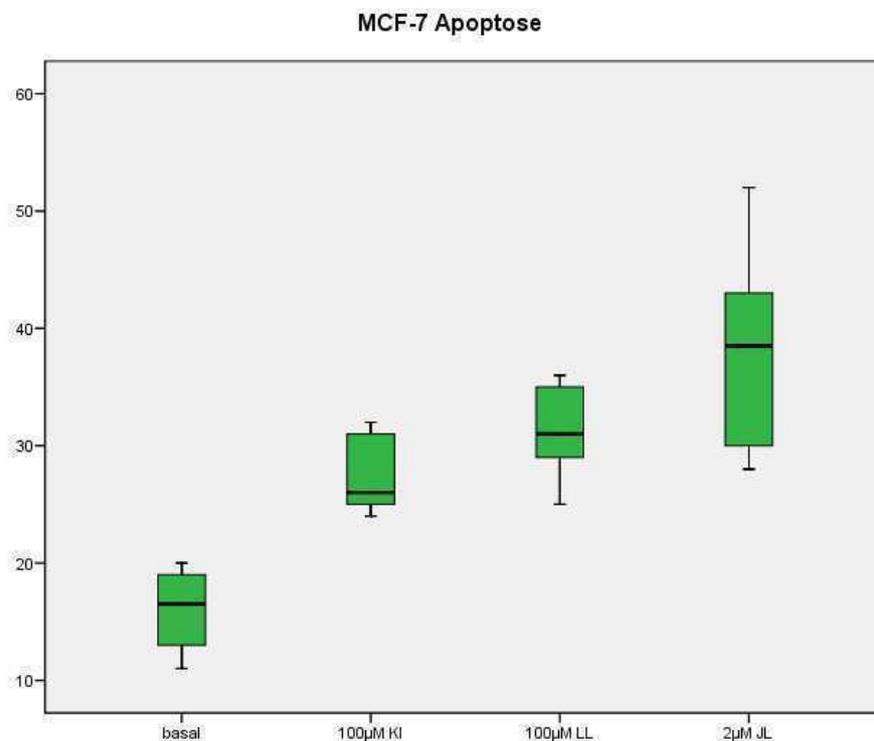


Abbildung 9 Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-7

Prozentsatz an apoptotischen MCF-7 Zellen induziert durch Kaliumjodid (100 μ M KI), Jod (100 μ M LL) und Jodlaktin (2 μ M). Die Apoptose wurde mit dem De Psipher MPA bestimmt. Der Prozentsatz an apoptotischen Zellen war bei 100 μ M KI, 100 μ M LL und 2 μ M JL signifikant höher im Vergleich zur Basalgruppe.

Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-12A Zellen

Apoptose in %	MW1	MW2	MW Ges	Signifikanz
C	5,275	8,99	7,1325	
KI 100	11,075	11,5667	11,32083	0,055
LL 100	6,975	10,0333	8,504167	0,188
JL 2	9,55	-	9,55	0,500
JL 5	6,45	10,2333	8,341667	0,313

Tabelle 4 Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-12A

Prozentsatz an apoptotischen MCF-12A Zellen induziert durch Kaliumjodid (100 μ M KI), Jod (100 μ M LL) und Jodlaktin (2 μ M und 5 μ M). Die Apoptose wurde mit dem De Psipher MPA bestimmt.

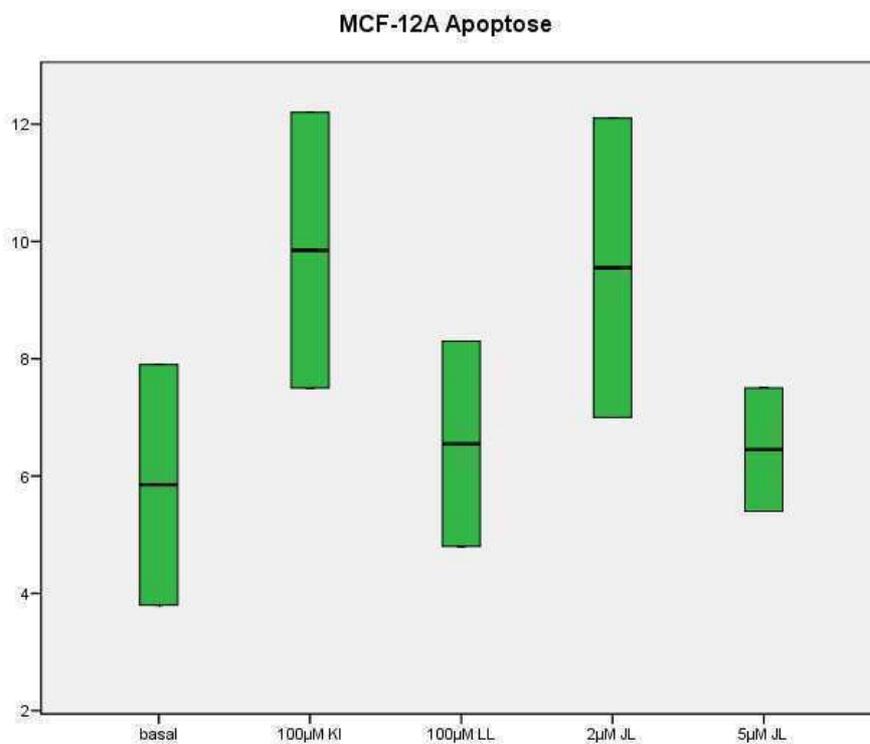


Abbildung 10 Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-12A

Prozentsatz an apoptotischen MCF-12A Zellen induziert durch Kaliumjodid (100 μ M KI), Jod (100 μ M LL) und Jodlaktin (2 μ M und 5 μ M). Die Apoptose wurde mit dem De Psipher MPA bestimmt.

5.3. Einfluss von Modulatoren des PKA-Pathways auf MCF-7 und MCF-12A

5.3.1. Einfluss von FK auf MCF-7 und MCF-12A

Um den Einfluss von Forskolin auf die MCF-7 Zellen zu untersuchen, wurden die MCF-7 Zellen auf 24-Well-Platten verteilt. Danach erfolgte eine Inkubation mit Forskolin in unterschiedlichen Konzentrationen (40 μ M, 20 μ M und 10 μ M). Nach drei Tagen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl.

Die Zugabe von Forskolin in Konzentrationen von 40, 20 und 10 μ M führte zu einer Verringerung der MCF-7 Zellzahl auf 39, 51 und 65%. Bereits die Zugabe von 10 μ M Forskolin erniedrigte die MCF-7 Zellzahl signifikant ($p < 0,05$).

Zum Vergleich wurde der Einfluss von Forskolin auf die MCF-12A untersucht. Dazu wurden die MCF-12A auf 24-Well-Platten verteilt. Drei Tage nach Zugabe von Forskolin in Konzentrationen von 40 μ M, 20 μ M und 10 μ M wurde die Brustdrüsenzellzahl bestimmt.

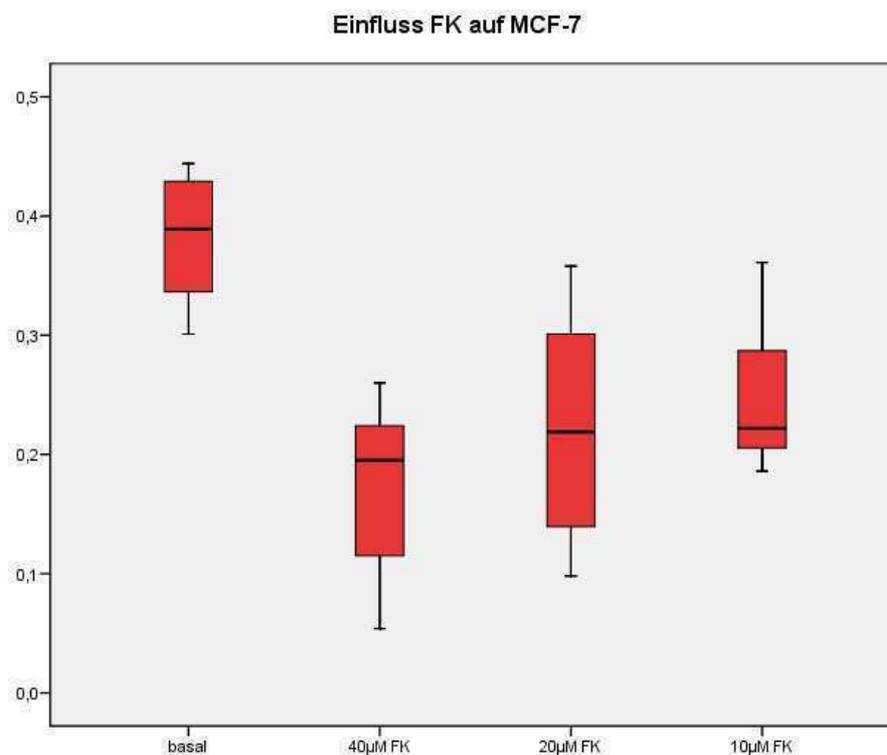
Die Zugabe von Forskolin in Konzentrationen von 40, 20 und 10 μ M führte zu einer Verringerung der MCF-12A Zellzahl auf 70, 81 und 84%. Hier führte ebenfalls die Zugabe von 10 μ M Forskolin zu einer signifikant niedrigeren MCF-12A Zellzahl ($p < 0,05$).

Einfluss von Forskolin (FK) auf MCF-7 Zellen

Forskolin	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	0,31625	0,41185	0,39177	0,37329	
FK 40	0,06633333	0,16786667	0,19977333	0,144657778	0,000
FK 20	0,092	0,2674	0,21385	0,191083333	0,001
FK 10	0,19533333	0,28258333	0,25114583	0,243020833	0,002

Tabelle 5 Einfluss von Forskolin auf MCF-7

Dosisabhängiger Effekt von Forskolin (40 μ M, 20 μ M und 10 μ M FK) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl mit dem MTT-Assay bestimmt. Die Hemmung mit 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M Forskolin war signifikant ($p < 0,05$).

*Abbildung 11 Einfluss von Forskolin auf MCF-7*

Dosisabhängiger Effekt von Forskolin (40 μ M, 20 μ M und 10 μ M FK) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl mit dem MTT- Assay bestimmt. Die Hemmung mit 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M Forskolin war signifikant ($p < 0,05$).

Einfluss von Forskolin (FK) auf MCF-12A Zellen

Forskolin	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	2769,5	3180,91667	3215,81944	3055,412037	
FK 40	1978,83333	2098,63889	2377,60648	2151,692901	0,000
FK 20	1877	3153,83333	2442,63889	2491,157407	0,004
FK 10	2171	2874,66667	2665,44444	2570,37037	0,000

Tabelle 6 Einfluss von Forskolin auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Forskolin (40 μ M, 20 μ M und 10 μ M FK) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M Forskolin war signifikant ($p < 0,05$).

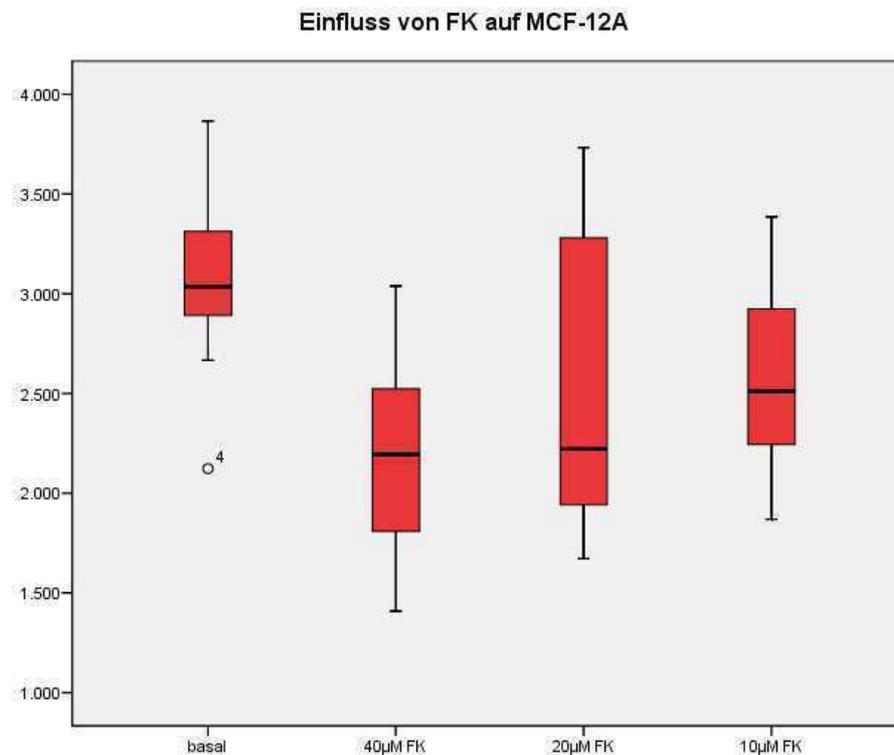


Abbildung 12 Einfluss von Forskolin auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Forskolin (40 μ M, 20 μ M und 10 μ M FK) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 40 μ M, 20 μ M, 10 μ M Forskolin war signifikant ($p < 0,05$).

5.3.2. Einfluss von CT auf MCF-12A

Um den Einfluss von Cholera-toxin auf die MCF-12A Zellen zu untersuchen wurden die Zellen 24 Stunden mit Cholera-toxin vorinkubiert. Danach wurde Jod ($100\mu\text{M}$ LL), Jodid ($100\mu\text{M}$ KI) und Jodlaktone ($5\mu\text{M}$) zugegeben. Drei Tage später erfolgte die Zellzählung.

Die Vorinkubation mit Cholera-toxin hatte auf die Brustdrüsenzellen keinen Einfluss. Die Zugabe von $100\mu\text{M}$ Jod und $5\mu\text{M}$ Jodlaktone führte zu einer gleichbleibenden Zellzahl von 101% und 99%. Durch die Zugabe von $100\mu\text{M}$ KI hingegen wurde die MCF-12A Zellzahl signifikant auf 91% erniedrigt ($p < 0,05$).

Einfluss von Cholera toxin auf MCF-12A Zellen

CT	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	4830,83333	5556	5525,33333	5304,05556	
KI 100	4452,66667	5660,33333	4356,16667	4823,05556	0,037
LL 100	4541,5	6170,66667	5297,16667	5336,44444	0,261
JL 5	5089,66667	5044	5575	5236,22222	0,395

Tabelle 7 Einfluss von Cholera toxin auf MCF-12A

Effekt von 100ng/ml CT auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 100µM KI war signifikant ($p < 0,05$).

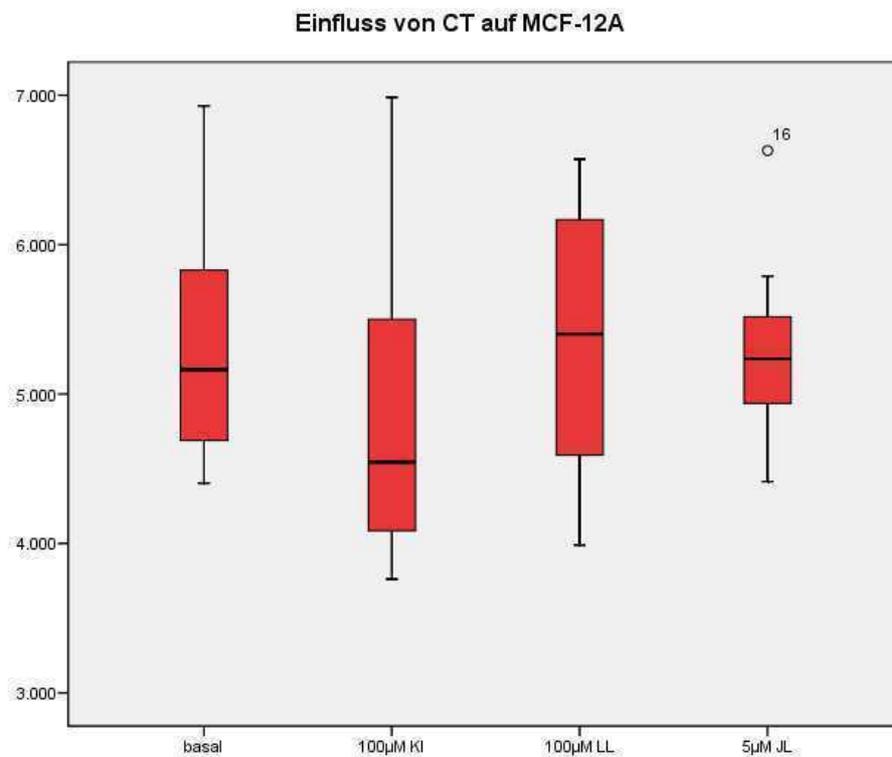


Abbildung 13 Einfluss von Cholera toxin auf MCF-12A

Effekt von 100ng/ml CT auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 100µM KI war signifikant ($p < 0,05$).

5.4. Einfluss von PE auf MCF-7 und MCF-12A

Um den Einfluss von Phorbolester auf die MCF-7 Zellen zu untersuchen, wurden die MCF-7 Zellen auf 24-Well-Platten verteilt. Danach erfolgte eine Inkubation mit Phorbolester in unterschiedlichen Konzentrationen (100nM, 10nM und 2nM). Nach drei Tagen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl.

Die MCF-7 Zellzahl wurde durch Zugabe von PE dosisabhängig und signifikant reduziert auf 60, 82 und 89% mit 100nM, 10nM und 2nM PE ($p < 0,05$).

Zum Vergleich wurde der Phorbolester Einfluss auf die MCF-12A untersucht. Dazu wurden die MCF-12A auf 24-Well-Platten verteilt. Drei Tage nach Zugabe von 100, 10 und 2nM PE wurde die Brustdrüsenzellzahl bestimmt.

Die MCF-12A Zellzahl wurde durch Zugabe von PE dosisabhängig und signifikant reduziert auf 43, 44 und 63% mit 100nM, 10nM und 2nM PE ($p < 0,05$).

Einfluss von Phorbolster (PE) auf MCF-7 Zellen

PE	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	0,3625	0,381875	0,374975	0,373116667	
100 nM	0,2515	0,2295	0,185125	0,222041667	0,004
10nM	0,295	0,3058	0,31176	0,304186667	0,006
2 nM	0,31766667	0,33516667	0,34403333	0,332288889	0,027

Tabelle 8 Einfluss von PE auf MCF-7

Dosisabhängiger Effekt von Phorbolster (100nM, 10nM, 2nM PE) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl mit dem MTT-Assay bestimmt. Die Hemmung mit 2nM, 10nM und 100nM Phorbolster war signifikant ($p < 0,05$).

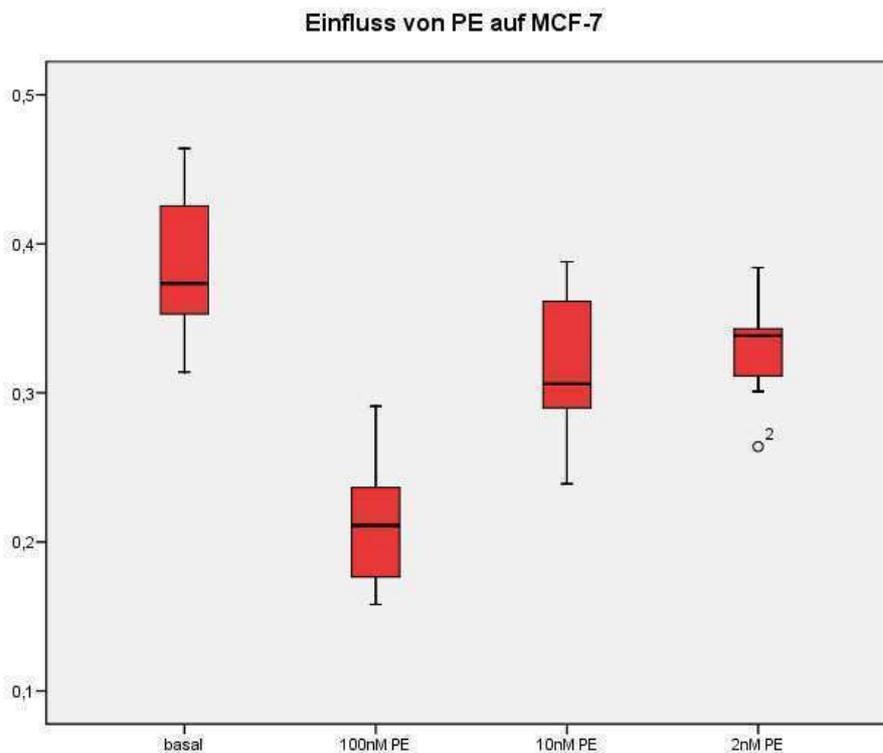


Abbildung 14 Einfluss von PE auf MCF-7

Dosisabhängiger Effekt von Phorbolster (100nM, 10nM, 2nM PE) auf MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl mit dem MTT-Assay bestimmt. Die Hemmung mit 2nM, 10nM und 100nM Phorbolster war signifikant ($p < 0,05$).

Einfluss von Phorbol ester (PE) auf MCF-12A Zellen

PE	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	3214,5	3154,75	3535,29167	3301,513889	
PE 100	1755,66667	1098,11111	1388,51852	1414,098765	0,000
PE 10	1793	1089,66667	1472,94444	1451,87037	0,000
PE 2	2384	1884,83333	1961,80556	2076,87963	0,000

Tabelle 9 Einfluss von PE auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Phorbol ester (100nM, 10nM, 2nM PE) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 2nM, 10nM und 100nM Phorbol ester war signifikant ($p < 0,05$).

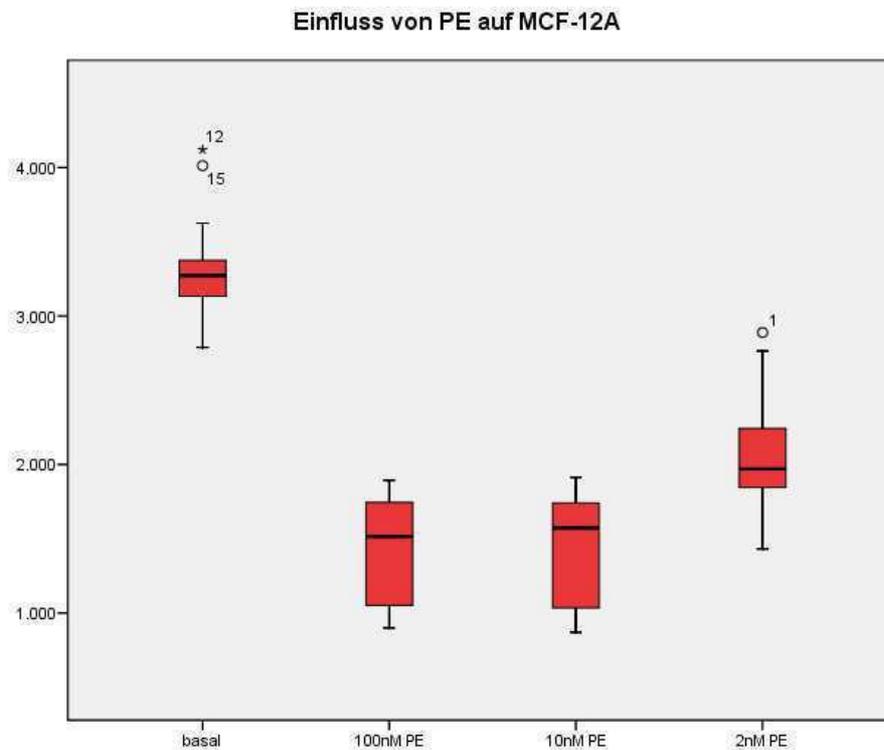


Abbildung 15 Einfluss von PE auf MCF-12A

Dosisabhängiger Effekt von Phorbol ester (100nM, 10nM, 2nM PE) auf MCF-12A Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 2nM, 10nM und 100nM Phorbol ester war signifikant ($p < 0,05$).

5.5. Redifferenzierungsversuch mit tRA, Rosiglitazone und E2

5.5.1. Redifferenzierungsversuch mit tRA

Im Redifferenzierungsversuch mit Retinolsäure erfolgte eine zweitägige Präinkubation der Zellen (MCF-7 bzw. MCF-12A) mit Retinolsäure (tRA) und eine Inkubation mit Jod, Jodid und Jodlakton. Die Zellzahl wurde nach drei Tagen bestimmt.

Bei den MCF-7 Zellen führte die Präinkubation mit tRA und die Zugabe von 100 μ M KI, 100 μ M LL und 5 μ M JL zu einer minimalen Erniedrigung der MCF-7 Zellzahl auf 99%, 95% und 90%.

Bei den MCF-12A führte die Präinkubation mit tRA und die Zugabe von 100 μ M KI, 100 μ M LL bzw. 5 μ M JL zu einer geringfügig erhöhten Zellzahl von 103%.

Einfluss von all-trans-Retinsäure (tRA) auf MCF-7 Zellen

tRA	MW1	MW2	MW3	MW4	MW ges	Signifikanz
C	638	2150	1371,4	971,5	1282,725	
KI 100	562,6	2292,6	1276,8	949,2	1270,3	0,242
LL 100	549,2	2163	1209,6	940,8	1215,65	0,068
JL 5	541,4	2058,8	1193,8	812,6	1151,65	0,07

Tabelle 10 Einfluss von tRA auf MCF-7

Einfluss von tRA auf das Zellwachstum durch Zugabe von 1 μ M tRA und durch Inkubation mit den angeführten Substanzen. Es wurde mit 100 μ M LL, 100 μ M KI und 5 μ M JL inkubiert.

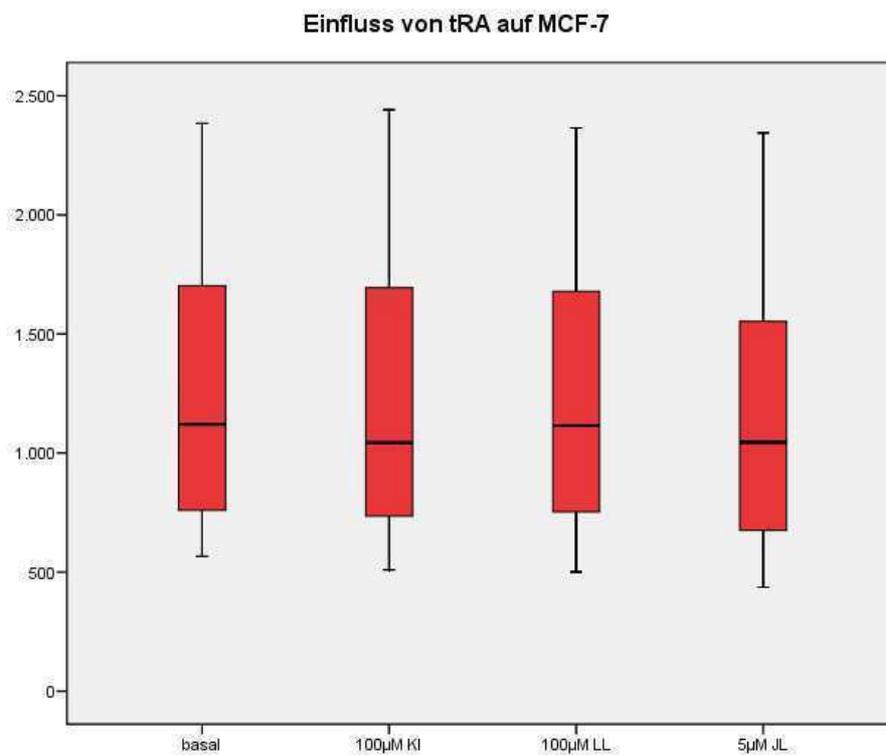


Abbildung 16 Einfluss von tRA auf MCF-7

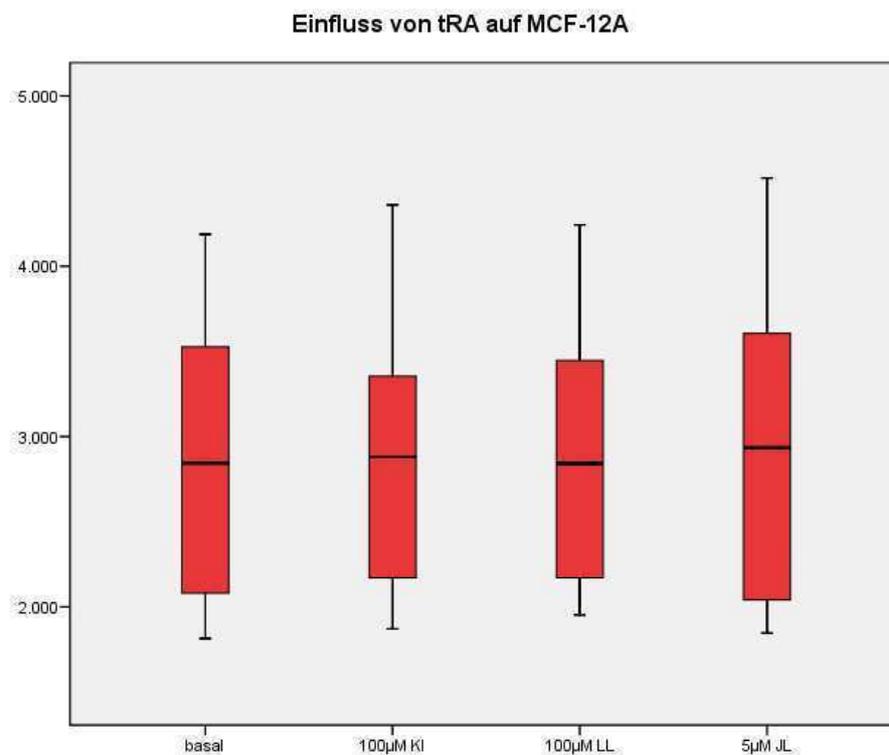
Einfluss von tRA auf das Zellwachstum durch Zugabe von 1 μ M tRA und durch Inkubation mit den angeführten Substanzen. Es wurde mit 100 μ M LL, 100 μ M KI und 5 μ M JL inkubiert.

Einfluss von all-trans-Retinsäure (tRA) auf MCF-12A Zellen

tRA	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	3715,2	2811,4	1950,6	2825,7333	
KI 100	3624	3093,4	2004,8	2907,4	0,262
LL 100	3791,8	2895,8	2067,8	2918,4667	0,126
JL 5	3757,2	3058	1944,8	2920	0,180

Tabelle 11 Einfluss von tRA auf MCF-12A

Einfluss von tRA auf das Zellwachstum durch Zugabe von $1\mu\text{M}$ tRA und durch Inkubation mit den angeführten Substanzen. Es wurde mit $100\mu\text{M}$ LL, $100\mu\text{M}$ KI und $5\mu\text{M}$ JL inkubiert.

*Abbildung 17 Einfluss von tRA auf MCF-12A*

Einfluss von tRA auf das Zellwachstum durch Zugabe von $1\mu\text{M}$ tRA und durch Inkubation mit den angeführten Substanzen. Es wurde mit $100\mu\text{M}$ LL, $100\mu\text{M}$ KI und $5\mu\text{M}$ JL inkubiert.

5.5.2. Redifferenzierungsversuch mit Rosiglitazone

Beim Redifferenzierungsversuch mit Rosiglitazone wurde die Platte 24 Stunden bzw. 48 Stunden mit Rosiglitazone präinkubiert. Danach erfolgten ein Mediumwechsel und die Zugabe von Jod, Jodid und Jodlaktone. Die Zellzählung erfolgte jeweils nach 48 Stunden bzw. 24 Stunden.

Die Präinkubation mit Rosiglitazone hatte auf das Wachstumsverhalten der MCF-7 keinen eindeutig erkennbaren Einfluss. Die Zugabe von 100 μ M KI erhöhte die Zellzahl der präinkubierten MCF-7 Zellen auf 109%. Im Gegensatz dazu erniedrigte die Zugabe von 100 μ M LL, 5 μ M JL und 10 μ M JL die Zellzahl der präinkubierten Mammakarzinomzellen. Die MCF-7 Zellzahlen wurden dabei durch die JL-Zugabe dosisabhängig auf 75% bzw. 94% mit 10 μ M JL bzw. 5 μ M JL erniedrigt.

Einfluss von Rosiglitazone auf MCF-7 Zellen

Rosi	MW1	MW2	MW3	MW4	MW5	MW6	MW7	MW ges	Signifikanz
C	2356,4	1072,5	1510,3	1470	2634,4	1210	1187	1634,31667	
KI 100	2340,2	1499,25	1428	1384,3	2288,6	-	-	1788,06	0,215
LL 100	2265	1572,75	1282,3	1489,8	2055,2	1014	1061	1534,17143	0,197
JL 5	2212,2	1349,75	1358,5	1125,3	2206	1166	1344	1537,38571	0,185
JL 10	-	1211,75	1440,8	1015,5	-	-	-	1222,66667	0,102

Tabelle 12 Einfluss von Rosiglitazone auf MCF-7

Einfluss von Rosiglitazone auf das Zellwachstum durch Zugabe von 10 μ M Rosiglitazone und durch Inkubation mit 100 μ M LL, 100 μ M KI, 5 μ M JL und 10 μ M JL.

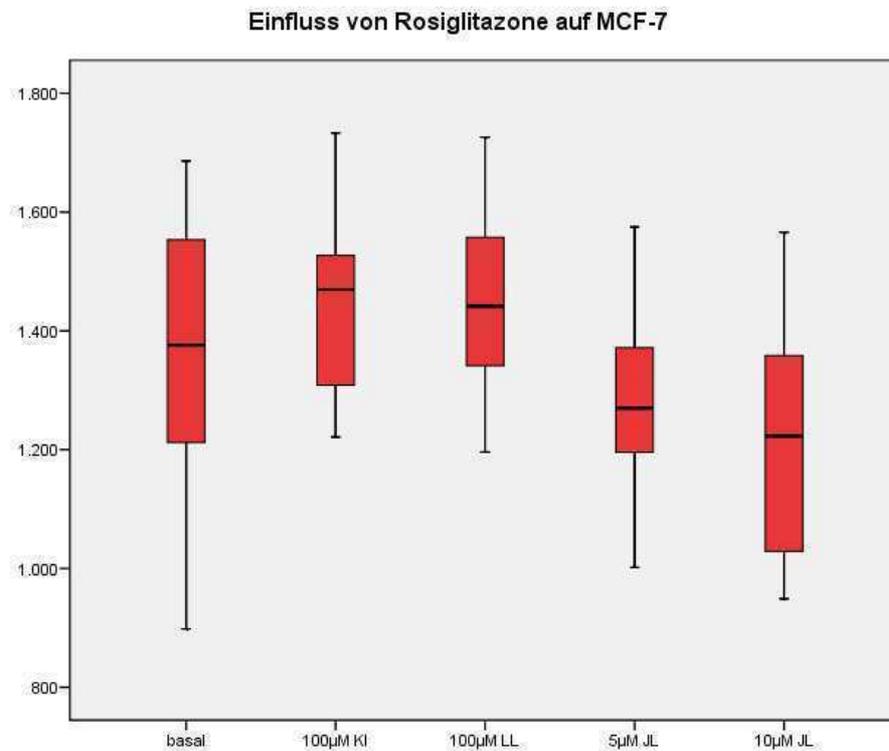


Abbildung 18 Einfluss von Rosiglitazone auf MCF-7

Einfluss von Rosiglitazone auf das Zellwachstum durch Zugabe von 10 μ M Rosiglitazone und durch Inkubation mit 100 μ M LL, 100 μ M KI, 5 μ M JL und 10 μ M JL.

5.5.3. Redifferenzierungsversuch mit E2

Östrogen wurde in Konzentrationen von 250ng/ml und 500ng/ml verwendet. Nach Präinkubation mit E2 erfolgte die Zugabe von 100 μ M Jod und 100 μ M Jodid. Auch sollte die alleinige Wirkung von Östrogen unterschiedlicher Konzentrationen auf die Zellen untersucht werden. Dazu erfolgte lediglich eine Präinkubation der Zellen mit 250ng/ml und 500ng/ml E2.

Bei den MCF-7 Zellen führte die Zugabe von 250ng/ml E2 und 100 μ M LL zu einer Verringerung der Zellzahl auf 84%. Auch 500ng/ml E2 und 100 μ M LL bewirkten eine MCF-7 Zellzahlerniedrigung auf 84%. Die Inkubation mit 250ng/ml bzw. 500ng/ml E2 senkte die MCF-7 Zellzahl ebenso auf 88% und 84%, so dass zwischen der Östrogeninkubation und Östrogen und nachfolgender Jodinkubation kein Unterschied festgestellt werden konnte.

Die Inkubation mit 250ng/ml E2 und 100 μ M KI verringerte die MCF-7 Zellzahl auf 82%. Die Zugabe von 250ng/ml E2 alleine führte zu einer Verringerung der Zellzahl auf 84%. Auch senkte die Inkubation mit 500ng/ml E2 und 100 μ M KI die MCF-7 Zellzahl auf 73% und die Inkubation mit 500ng/ml E2 nur auf 84%.

Die Zugabe von 250ng/ml E2 und 100 μ M LL erhöhte die MCF-12A Zellzahl geringfügig auf 105%. Im Gegensatz dazu erhöhte die Zugabe von 500ng/ml E2 und 100 μ M LL die Zellzahl auf 115%. Die alleinige Zugabe von 250ng/ml E2 bzw. 500ng/ml E2 erhöhte die Zellzahl auf 115% bzw. 117%. Beim Vergleich der Zugabe von 250ng/ml E2 mit der Zugabe von 250ng/ml E2 und 100 μ M LL scheint das Jod die Wachstum stimulierende Wirkung des Östrogens aufzuheben.

Die Zugabe von 250ng/ml E2 und 100 μ M KI erniedrigte die MCF-12A Zellzahl geringfügig auf 97%. Unverändert blieb die MCF-12A Zellzahl durch die Zugabe von 500ng/ml E2 und 100 μ M KI. Durch die Zugabe von 250ng/ml E2 bzw. 500ng/ml E2 erhöhte sich die Brustdrüsenzellzahl minimal auf 102% bzw. 103%.

Weder die Zugabe von E2 alleine, noch die Präinkubation mit E2 mit nachfolgender Jodidsubstitution scheint einen Einfluss auf das MCF-12A-Wachstum zu haben.

Einfluss von Östrogen(E2) auf MCF-7 Zellen

LL und E2	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	3052	2281	1816,5	2383,16667	
LL & 250 ng/ml E2	2792,4	2255,6	981,5	2009,83333	0,078
LL & 500 ng/ml E2	2783	2260,6	993,33	2012,31111	0,078
250 ng/ml E2	3185,5	2241	881,5	2102,66667	0,281
500 ng/ml E2	2890,5	2127	978,5	1998,66667	0,016

KI und E2	MW1	MW2	MW3	MW ges	Signifikanz
C	2887,5	2976	1548	2470,5	
KI & 250 ng/ml E2	2695,4	2354,6	996,83	2015,6111	0,313
KI & 500 ng/ml E2	2685,8	1865,6	860,4	1803,93333	0,313
250 ng/ml E2	3231	2177,5	838,5	2082,33333	0,156
500 ng/ml E2	2970,5	2254	989,5	2071,33333	0,156

Tabelle 13 Einfluss von E2 auf MCF-7

Einfluss von E2 auf das Zellwachstum durch Zugabe von 250 und 500ng/ml E2 und durch Inkubation mit 100 μ M Jod und 100 μ M Kaliumjodid.

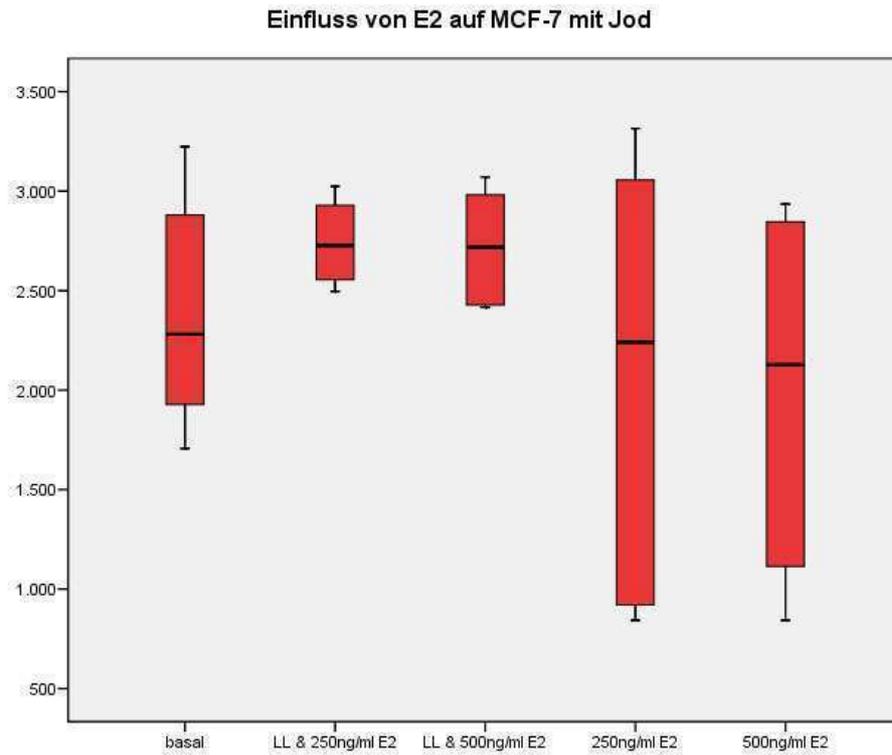


Abbildung 19 Einfluss von E2 und Jod auf MCF-7

Einfluss von E2 auf das Zellwachstum durch Zugabe von 250 und 500ng/ml E2 und durch Inkubation mit 100 μ M Jod.

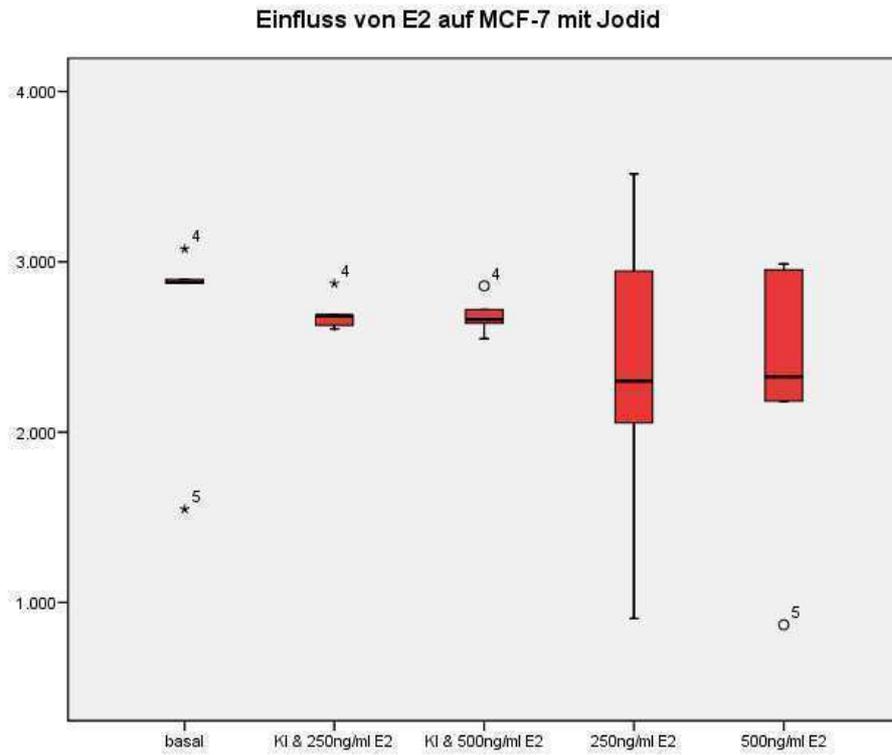


Abbildung 20 Einfluss von E2 und Jodid auf MCF-7

Einfluss von E2 auf das Zellwachstum durch Zugabe von 250 und 500ng/ml E2 und durch Inkubation mit 100 μ M Kaliumjodid.

Einfluss von Östrogen(E2) auf MCF-12A Zellen

LL und E2	MW1	MW2	MW3	MW4	MW5	MW ges	Signifikanz
C	2974	5604	2633,8	3665,2	3775,4	3730,48	
LL & 250 ng/ml E2	3152,8	5988,2	2987,2	3634	3785,6	3909,56	0,016
LL & 500 ng/ml E2	4123,2	6082	2909,6	4228,2	4044,6	4277,52	0,000
250 ng/ml E2	3817,5	6299	2891,5	4083	4388	4295,8	0,423
500 ng/ml E2	3894,5	6259,5	2890	3952	4808,5	4360,9	0,461

KI und E2	MW1	MW2	MW3	MW4	MW5	MW ges	Signifikanz
C	2928	6337,2	2991,8	3731,6	4521,4	4102	
KI & 250 ng/ml E2	2922,8	6255,8	2819,2	3850,8	4050,8	3979,88	0,129
KI & 500 ng/ml E2	2892,6	6083,6	2781,4	4680,4	4165,6	4120,72	0,311
250 ng/ml E2	3385	5777,5	2725,5	4640	4397,5	4185,1	0,278
500 ng/ml E2	3122	5918,5	2447,5	4891	4679,5	4211,7	0,246

Tabelle 14 Einfluss von E2 auf MCF-12A

Einfluss von E2 auf das Zellwachstum durch Zugabe von 250 und 500ng/ml E2 und durch Inkubation mit 100 μ M Jod und 100 μ M Kaliumjodid. Die Wachstumsstimulation mit LL&250ng/ml E2 und LL&500ng/ml E2 ist signifikant ($p < 0,05$).

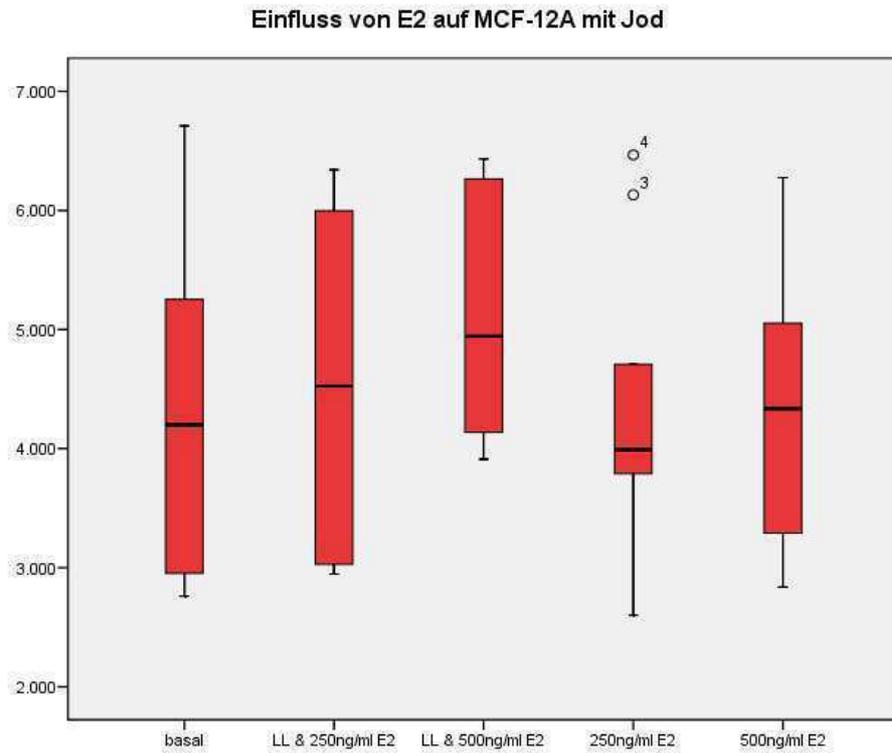


Abbildung 21 Einfluss von E2 und Jod auf MCF-12A

Einfluss von E2 auf das Zellwachstum durch Zugabe von 250 und 500ng/ml E2 und durch Inkubation mit $100\mu\text{M}$ Jod. Die Wachstumsstimulation mit LL&250ng/ml E2 und LL&500ng/ml E2 ist signifikant ($p < 0,05$).

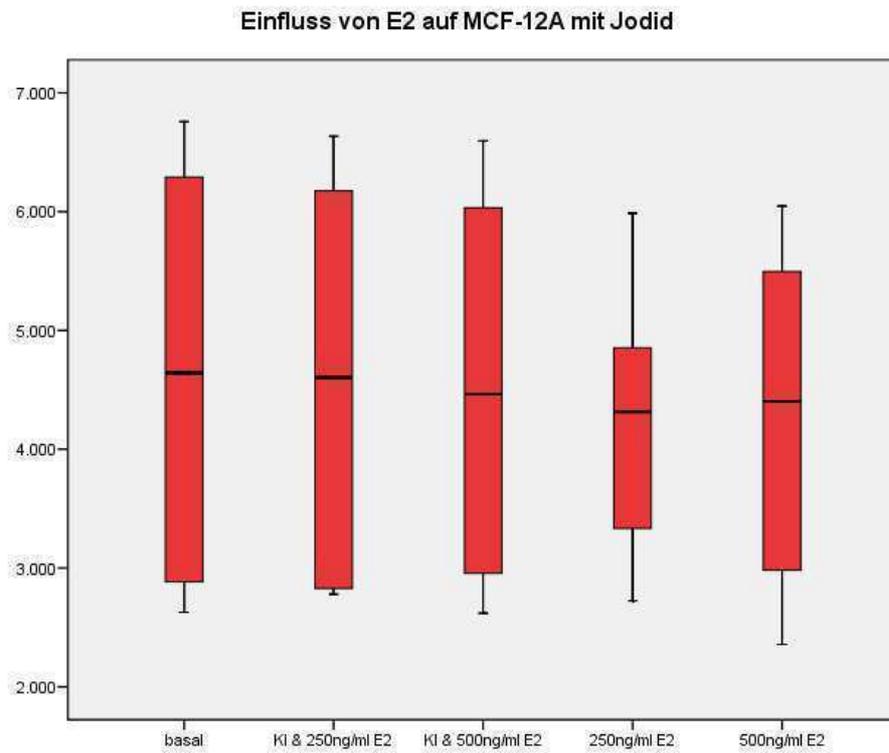


Abbildung 22 Einfluss von E2 und Jodid auf MCF-12A

Einfluss von E2 auf das Zellwachstum durch Zugabe von 250 und 500ng/ml E2 und durch Inkubation mit 100 μ M Kaliumjodid.

5.6. Einfluss von KI, LL und JL auf SD-CA

Die Wirkung von Jod, Jodid und Jodlaktone auf die Schilddrüsenkarzinomzelllinien 8505C, B-CPAP und FTC sollte ebenfalls untersucht werden. Dazu wurden die Schilddrüsenkarzinomzellen auf 24-Well-Platten verteilt und mit Jod (100 μ M), Jodid (100 μ M) und Jodlaktone (5 μ M, 10 μ M) inkubiert. Nach drei Tagen erfolgte die Bestimmung der Zellzahl.

5.6.1. Einfluss von KI, LL und JL auf 8505 C

Die 8505 C Zellzahl wurde durch die Zugabe von 100 μ M KI auf 109% erhöht. Auch erhöhte sich die Schilddrüsenkarzinomzellzahl durch die Zugabe von 5 μ M JL auf 105%. Durch 10 μ M JL wurde die 8505C Zellzahl hingegen signifikant auf 89% reduziert ($p < 0,05$). Die Zugabe von 100 μ M LL führte zu einer gleichbleibenden 8505C Zellzahl.

Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf 8505C Zellen

8505 C	MW1	MW2	MW3	MW4	MW ges	Signifikanz
C	1811	2886,8	2245,2	1919	2215,5	
KI 100	2191,2	3200,8	2518,8	1745	2413,95	0,007
LL 100	2037,6	2657,4	2326	1900,8	2230,45	0,391
JL 5	2038,4	3117	1989,4	2170,4	2328,8	0,244
JL 10	1938,6	2099,8	1899,4	-	1979,2667	0,047

Tabelle 15 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf 8505C

Effekt von Kaliumjodid (100 μ M KI), Jod (100 μ M LL) und Jodlaktone (5 μ M und 10 μ M) auf 8505C Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 10 μ M Jodlaktone war signifikant ($p < 0,05$).

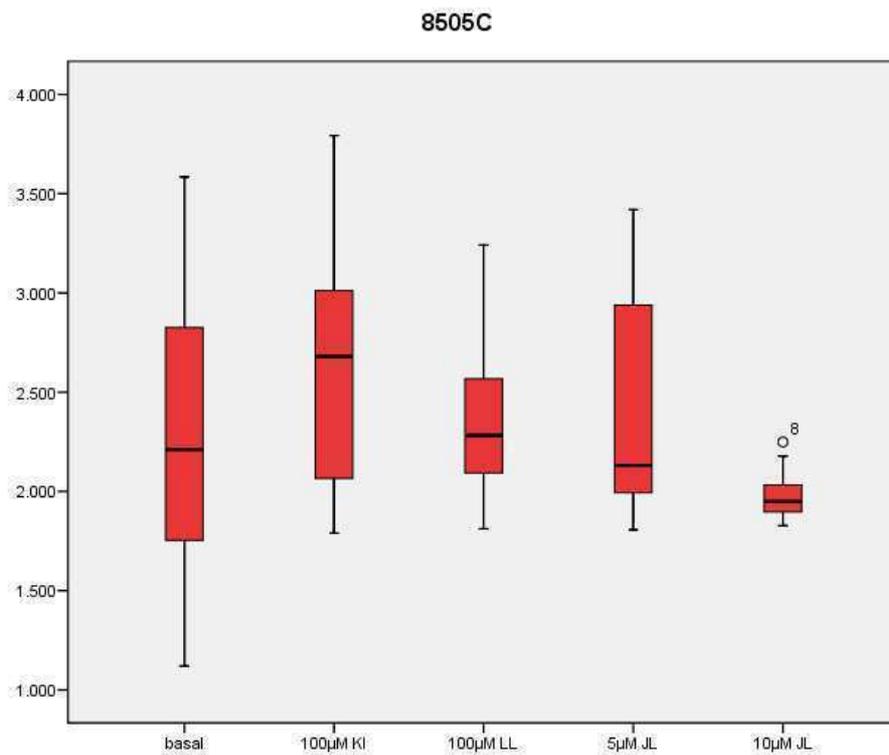


Abbildung 23 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf 8505C

Effekt von Kaliumjodid (100 μ M KI), Jod (100 μ M LL) und Jodlaktone (5 μ M und 10 μ M) auf 8505C Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 10 μ M Jodlaktone war signifikant ($p < 0,05$).

5.6.2. Einfluss von KI, LL und JL auf B-CPAP

Während die Jodzugabe (100 μ M LL) die B-CPAP Zellzahl nicht beeinflusste, führte die Zugabe von Kaliumjodid (100 μ M KI) tendenziell zu einer Erniedrigung der B-CPAP Zellzahl. Im Gegensatz dazu führte die Jodlaktone-Zugabe zu einer dosisabhängigen Erniedrigung der B-CPAP auf 95% bzw. 88% mit 5 μ M bzw. 10 μ M JL.

Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf B-CPAP Zellen

B-CPAP	MW1	MW2	MW3	MW4	MW5	MW ges	Signifikanz
C	4328	3206,8	2140,2	2357,6	-	3008,15	
KI 100	4627,6	3061,8	2893,6	1445	2493,8	2904,36	0,420
LL 100	4838	3189	3027,6	1368	2725	3029,52	0,420
JL 5	4125	3280	2984,8	1400,4	2491,4	2856,32	0,364
JL 10	3756,2	2935,6	2725,4	1450,6	2326,6	2638,88	0,041

Tabelle 16 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf B-CPAP

Effekt von Kaliumjodid (100 μ M KI), Jod (100 μ M LL) und Jodlaktone (5 μ M und 10 μ M) auf B-CPAP Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 10 μ M Jodlaktone war signifikant ($p < 0,05$).

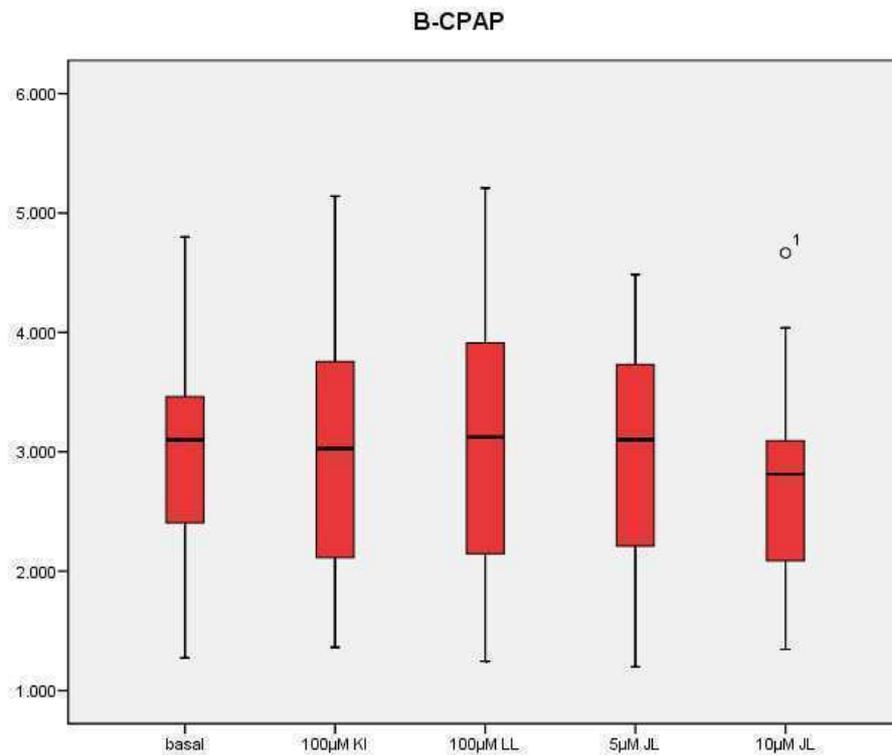


Abbildung 24 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlakton auf B-CPAP

Effekt von Kaliumjodid (100µM KI), Jod (100µM LL) und Jodlakton (5µM und 10µM) auf B-CPAP Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Hemmung mit 10µM Jodlakton war signifikant ($p < 0,05$).

5.6.3. Einfluss von KI, LL und JL auf FTC

Die Zugabe von Jodid und Jod reduzierte die FTC Zellzahl auf 96% und 97% mit 100 μ M KI und 100 μ M LL. Durch Jodlaktone-Zugabe erfolgte eine Erhöhung der FTC Zellzahl auf 110% bzw. 108% mit 10 μ M bzw. 5 μ M JL.

Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf FTC Zellen

FTC	MW1	MW2	MW3	MW4	MW ges	Signifikanz
C	2800	3614,75	2307,25	2776,75	2874,6875	
KI 100	2785	3456	2373,8	2475,6	2772,6	0,149
LL 100	2732,8	3552,6	2118,4	2752,8	2789,15	0,096
JL 10	3092,8	4115,6	2530,2	2879,4	3154,5	0,003
JL 5	3084,2	4027,8	2501,2	2862,2	3118,85	0,005

Tabelle 17 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf FTC

Effekt von Kaliumjodid (100 μ M KI, Jod (100 μ M LL) und Jodlaktone (5 μ M und 10 μ M) auf FTC Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Wachstumsstimulation mit Jodlaktone 5 μ M und 10 μ M war signifikant ($p < 0,05$).

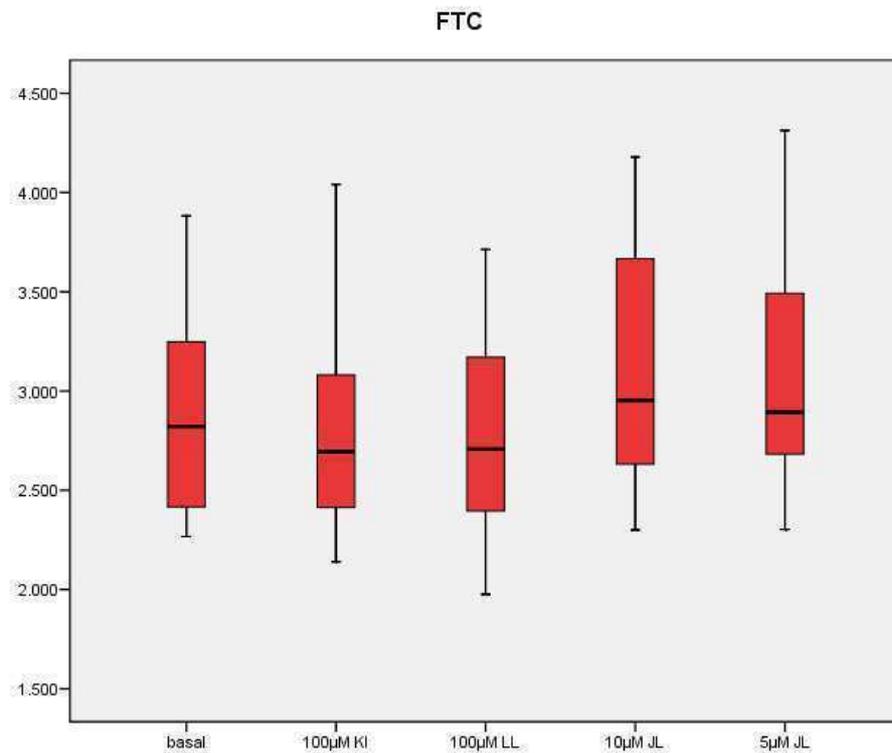


Abbildung 25 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf FTC

Effekt von Kaliumjodid (100µM KI), Jod (100µM LL) und Jodlaktone (5µM und 10µM) auf FTC Zellen. Die Zellen wurden 24 Stunden inkubiert und danach wurde die Zellzahl im Coulter Counter bestimmt. Die Wachstumsstimulation mit Jodlaktone 5µM und 10µM war signifikant ($p < 0,05$).

6. Diskussion

6.1. Diskussion der Ergebnisse

6.1.1. Einfluss von KI, LL und JL auf MCF-7 im Vergleich zu MCF-12A

Die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Jodid, Jod und Jodlaktone einen hemmenden Effekt auf die MCF-7 Zellproliferation haben. Die Hemmung der MCF-7 Zellproliferation war dosisabhängig und signifikant. Diese signifikante Hemmung der MCF-7 Zellzahl ist in unseren Versuchen durch 10 μ M Jodid und 10 μ M Jod erreicht worden. Bereits 5 μ M Jodlaktone führten zu einer signifikanten MCF-7 Wachstumshemmung.

Der hemmende Effekt von Kaliumjodid und Jodlaktone konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden (Aceves, Anguiano et al. 2005). Diese wies darauf hin, dass die Hemmung der MCF-7 durch Jodlaktone sehr viel effektiver als durch Kaliumjodid ist. Mit Jodlaktone wurde eine 50% niedrigere und mit Kaliumjodid eine nur 25% geringere Proliferationsrate der MCF-7 Zellen erreicht. Aceves et al. schlossen, dass Jod effektiver und schneller in die Zellen aufgenommen wird als Kaliumjodid. Außerdem wurde angenommen, dass der antiproliferative Effekt des Jods auf die Bildung von Jodlaktone zurück zu führen ist (Aceves, Anguiano et al. 2005).

Die MCF-7 Zellen exprimieren in vitro ohne Zugabe von Retinsäure keinen oder nur wenig NIS und nehmen folglich auch wenig Jod auf. Daher ist die Hemmung des MCF-7-Wachstums mit Jodid geringer im Vergleich zur Lugol'schen Lösung und bei Jodlaktone am stärksten. Da aber auch mit hohen Dosen von Jodid und Jod eine Wachstumshemmung stattfindet, muss angenommen werden, dass entweder geringe Mengen an Jod aufgenommen werden, oder aber direkt an der Zellmembran ohne Jod-Aufnahme Jodlaktone gebildet werden. Dies muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

Bei den MCF-12A Zellen hingegen konnte in unseren Versuchen kein eindeutiger Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf die Brustdrüsenzellen festgestellt werden. Dies bedeutet, dass offenbar die Karzinomzellen im Gegensatz zu normalen Brustdrüsenzellen einen Mechanismus haben, Jodlaktone zu bilden. Dies könnte

erklärt werden durch das Vorhandensein von Peroxidasen oder von NIS in den Karzinomzellen. Es hat auch möglicherweise therapeutische Konsequenzen, wenn man Mammakarzinome mit Jod behandeln würde, denn Jod würde dann nicht das normale Gewebe betreffen sondern nur selektiv die Karzinomzellen.

6.1.2. Apoptose induziert durch KI, LL und JL bei MCF-7 und MCF-12A

In unseren Versuchen führte eine Inkubation mit $2\mu\text{M}$ Jodlaktone dazu, dass 36% der MCF-7 Zellen apoptotisch waren. Die Inkubation mit $100\mu\text{M}$ Jodid und $100\mu\text{M}$ Jod führte zu einer niedrigeren Apoptoserate von 27% und 32%.

Da die Inkubation der MCF-7 Zellen mit Jod und Jodlaktone zu einer Wachstumshemmung führte (siehe 5.1.1) und eine Induktion der Apoptose in diesem Versuch nachgewiesen werden konnte, schlussfolgerten wir, dass der Hauptgrund für die Wachstumshemmung die Apoptoseinduktion ist. Entsprechend korrelierte die die Anzahl der apoptotischen MCF-7 Zellen mit dem Grad der Wachstumshemmung. An porcinen Schilddrüsenfollikeln wurde dieser Zusammenhang bereits *in vitro* gezeigt (Langer, Burzler et al. 2003). Zudem konnten wir zeigen, dass Jodlaktone in niedrigen Konzentrationen ebenso effektiv den Jodeffekt simulieren kann (Dugrillon, Bechtner et al. 1990; Pisarev MA 2000). Wie bei den Schilddrüsenzellen *in vitro* erfolgt die Hemmung der MCF-7 Zellproliferation über die Apoptose und nicht über eine Nekrose.

In experimentellen Tiermodellen an Ratten konnte bereits ein Jod induzierter Brustkrebsrückgang aufgezeigt werden. Außerdem wurde eine positive Wirkung des Jods auf fibrozystische Veränderungen der menschlichen Brust festgestellt. Auch *in vitro* konnte die zytotoxische Wirkung von 1 bis $4\mu\text{M}$ Jod auf MCF-7 Zellen bestätigt werden. Man vermutete, dass Jod nicht nur das Zellwachstum hemmt, sondern den Zelltod über die Apoptose induziert (Shrivastava, Tiwari et al. 2006).

Unsere Ergebnisse können diese Vermutungen wie oben beschrieben bestätigen.

Darüber hinaus zeigte die Arbeitsgruppe um Shrivastava et al., dass die Apoptose nicht über den Caspase-Weg, sondern über den Mitochondrien-vermittelten Weg induziert wird. Beim Mitochondrien-vermittelten Weg kommt es zu einer Bax-Aktivierung, AIF-Umverteilung aus den Mitochondrien in den Zellkern und dadurch zu einer Thiol-Armut. Jod scheint dabei unabhängig von NIS in die Zellen aufgenommen zu werden und als Antioxidans zu wirken (Shrivastava, Tiwari et al. 2006).

Bei den MCF-12A Zellen führte die Inkubation mit Jod, Jodid und Jodlaktone zu keiner Erhöhung der Apoptoserate. Da Jod, Jodid und Jodlaktone zu keiner Erniedrigung der MCF-12A Zellproliferation führte, ist dieses Ergebnis auch erklärbar.

6.1.3. Einfluss von FK auf MCF-7 und MCF-12A

Da der Jodid-Transport in den Schilddrüsenzellen über die Aktivierung des cAMP-Signalweges erfolgt, haben wir die Wirkung von Forskolin auf die Zellproliferation der MCF-7 Zellen untersucht. Die Inkubation der MCF-7 Zellen mit Forskolin ergab eine signifikante Hemmung der MCF-7 Zellen. Schon eine Konzentration von 10 μ M Forskolin führte zu einer Verringerung der MCF-7 Zellzahl auf 65%.

Schon 1997 untersuchte eine Arbeitsgruppe um Lowe die Wirkung eines erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegels durch Forskolin und kam zu dem Ergebnis, dass 1 μ M Forskolin das MCF-7 Zellwachstum um 17% und 10 μ M das Zellwachstum um 68% erniedrigte (Lowe, Fu et al. 1997; Al-Dhaheri and Rowan 2007).

Kogai et al. zeigten, dass die Jod-Aufnahme der MCF-7 Zellen durch Forskolin nicht gesteigert werden konnte. Bei den Schilddrüsenzellen hingegen konnte eine Steigerung der Jodid-Aufnahme über die TSH-Stimulierung und den cAMP Signalweg erreicht werden. Dabei kam es zu einer erhöhten NIS-Gen- und Proteinexpression. Mit Forskolin konnte diese stimulierende Wirkung auf die Jodid-Transportaktivität und die NIS-Gen- und Proteinexpression nachgeahmt werden (Kogai, Schultz et al. 2000).

Eine weitere Arbeitsgruppe um Rubis kam zu dem Ergebnis, dass die 96-stündige Inkubation der MCF-7 Zellen mit 12,5 μ M Forskolin das Zellwachstum der Brustkrebszellen nicht signifikant veränderte und man schlussfolgerte, dass eine Stimulation des PKA-Signalweges die MCF-7 Proliferation nicht beeinflusst (Rubis, Grodecka-Gazdecka et al. 2004). Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten auf unterschiedliche Versuchsbedingungen zurückzuführen sein.

In unseren Versuchen führte die Inkubation der MCF-12A Zellen mit Forskolin zu einer signifikanten Hemmung.

6.1.4. Einfluss von CT auf MCF-12A

Dass das Cholera-toxin das intrazelluläre cAMP-Niveau signifikant erhöht ist schon lange bekannt. In vitro führte die Inkubation der MCF-7 Zellen mit Cholera-toxin bei einer anderen Arbeitsgruppe zu einem signifikanten MCF-7 Zellwachstum. Die

Wirkung des CT wurde in Anwesenheit von 17β -Estradiol verstärkt, was einen Synergismus von cAMP und Estradiol bei der Wachstumskontrolle von ER-positiven Brustkrebszellen vermuten ließ. Diese Ergebnisse konnten in vitro bestätigt werden, wo tägliche Injektionen von CT in MCF-7 positive Mäuse zu einem signifikanten Tumorwachstum führte. Das erhöhte cAMP-Niveau via Cholera-Toxin-Therapie führte zu einem erhöhten Wachstum von ER-positiven Brustkrebszellen. Obwohl Östrogen alleine keine mitogene Wirkung auf ER-positive Brustkrebszellen in vitro hatte, übte es in Anwesenheit von erhöhtem zellulärem cAMP-Niveau eine mitogene Wirkung aus (Sheffield and Welsch 1985).

Den normalen Brustdrüsenzellen MCF-12A, welche auch ER-positiv sind, wurde CT (100ng/ml) schon mit dem Wachstumsmedium zugefügt, da es in vitro mit Insulin und Hydrocortison das Brustepithelwachstum stimuliert.

In unseren Versuchen führte die 24-stündige Präinkubation der MCF-12A Zellen zu einer unveränderten MCF-12A Zellzahl. Die Präinkubation mit CT und die anschließende $100 \mu\text{M}$ KI-Inkubation führte zu einer signifikanten Erniedrigung der MCF-12A Zellzahl auf 91%.

6.1.5. Einfluss von PE auf MCF-7 und MCF-12A

In unserem Versuch wurden die MCF-7 Zellzahlen durch Phorbol-ester dosisabhängig und signifikant reduziert auf 60, 82 und 89% mit 100nM, 10nM und 2nM PE.

Phorbol-ester führte auch in einer anderen Arbeitsgruppe zu einer dosisabhängigen Veränderung der MCF-7 Zellen. Dabei kam es zu einer veränderten Zellmorphologie und einer verringerten MCF-7 Zellzahl. Die Hemmung der MCF-7 Zellzahl war maximal bei Verwendung von Phorbol-ester zwischen 25ng/ml PE und 100ng/ml PE (Shoyab, McDonald et al. 1988).

Auch die Inkubation der MCF-12A Zellen mit Phorbol-ester ergab in unseren Versuchen eine dosisabhängige und signifikante Hemmung.

Die Arbeitsgruppe um Birkenfeld kam zu dem Ergebnis, dass niedrige Dosen an Phorbol-ester (0,1nM bis 5nM PMA) alleine keine mitogene Wirkung haben. Kombiniert mit EGF führte die Inkubation mit 0,1 bis 5nM PMA jedoch zu einer signifikant höheren Brustepithelzellproliferation. In höheren Phorbol-ester-Dosen (10nM bis 100nM PMA) führte die Inkubation mit PMA alleine zu einem signifikanten Anstieg der Brustepithelproliferation. Daher nahm man an, dass niedrige PMA-Dosen zu einer erhöhten EGF-Rezeptor-Tyrosinkinase und PKC-Aktivität führten. Hohe

PMA-Dosen dahingegen erhöhen die Zellproliferation unabhängig von einer PKC- und EGF-Rezeptor-Aktivierung (Birkenfeld, McIntyre et al. 1996).

Dass in unseren Versuchen jedoch eine Wachstumshemmung der MCF-12A Zellen durch Phorbolester hervorgerufen wurde, könnte an einer falsch gewählten PE-Konzentration liegen. Möglicherweise handelte es sich um eine toxische Phorbolester-Konzentration, welche die Apoptose der MCF-12A Zellen induzierte.

6.1.6. Redifferenzierungsversuch mit tRA

Die Präinkubation mit tRA und die Zugabe von Jodid, Jod und Jodlaktone ergab in unserem Versuch eine minimale Erniedrigung der MCF-7 Zellzahl auf 99%, 95% und 90%.

Die NIS-Expression im Brustkrebsgewebe gilt als wichtiger Angriffspunkt der Radiojod-Therapie (^{131}I). Beim Schilddrüsenkrebs ist die Radiojod-Therapie eine wichtige nuklearmedizinische Therapie. Die Jodidkonzentration ist im Brustkrebsgewebe jedoch signifikant niedriger als in normalem Schilddrüsen-gewebe. Dass die Retinsäure die NIS-Genexpression und die Jod-Aufnahme bei MCF-7 Zellen stimulieren kann, wurde bereits von der Arbeitsgruppe um Kogai et al. gezeigt. So führte die Inkubation mit $1\mu\text{M}$ tRA zu einem signifikanten dosisabhängigen Anstieg der Jodid-Aufnahme nach sechs Stunden (1,5fach) und einem Maximum der Jodid-Aufnahme nach 48 Stunden (9,4fach). In einem weiteren Versuch konnte eine signifikante Hemmung der MCF-7 Zellen durch eine Kombination von Radiojod (^{131}I) und tRA-Präinkubation gezeigt werden (Kogai, Schultz et al. 2000; Kogai, Kanamoto et al. 2004).

Die Arbeitsgruppe um Arroyo-Helguera untersuchte den Zusammenhang von NIS und Pendrin bei der Jod-Aufnahme der MCF-7 Zellen. Die Zellen wurden mit $1\mu\text{M}$ RA inkubiert. Als Kontrolle wurde eine Platte mit MCF-7 angelegt, bei welcher keine Retinsäure hinzugefügt wurde. In dieser Studie zeigten nur RA-vorbehandelte MCF-7 Zellen eine NIS-mRNA-Expression und folglich eine Jodid-Aufnahme. Die Jodid-Aufnahme ist somit NIS-abhängig.

Eine fünffach höhere Jod-Aufnahme im Vergleich zur Jodid-Aufnahme wurde sowohl bei RA-vorbehandelten als auch bei RA-unbehandelten Zellen erreicht. Die Jod-Aufnahme erfolgt also NIS-unabhängig über eine erleichterte Diffusion. Danach wird das Jod an Proteine und Fette gebunden, welche die Zellproliferation hemmen (Arroyo-Helguera, Anguiano et al. 2006).

In unseren Versuchen konnten wir NIS nicht mit Hilfe von tRA induzieren und keine Jodid-Aufnahme feststellen.

Vor Kurzem konnte auch gezeigt werden, dass MCF-7 Zellen molekulares Jod sättigungsabhängig binden können (Arroyo-Helguera, Anguiano et al. 2006).

Es wird vermutet, dass Jod in Anwesenheit von Peroxidasen in oder an der Zellmembran δ -Jodlaktone bildet, welche dann eine Wachstumshemmung bewirken (Aceves, Anguiano et al. 2005).

Interessant ist die Tatsache, dass molekulares Jod und nicht Jodid chemisch induzierten Krebs der Ratten hemmen kann (Garcia-Solis, Alfaro et al. 2005).

Aus unseren Ergebnissen schließen wir, dass δ -Jodlaktone die Hauptkomponente ist, welche während der Jodexposition in Zellen mit Peroxidasen gebildet wird und dass diese dann das Wachstum hemmen und die Apoptose induzieren.

Bei der MCF-12A Zelllinie konnte die Jodid-Aufnahme durch Inkubation mit tRA jedoch nicht gesteigert werden (Kogai, Schultz et al. 2000).

In unserem Versuch führte die Präinkubation der MCF-12A Zellen mit tRA und die nachfolgende Inkubation mit Jod, Jodid und Jodlaktone zu einer minimalen Erhöhung der MCF-12A Zellen.

6.1.7. Redifferenzierungsversuch mit Rosiglitazone

In unserem Versuch hatte die Präinkubation mit Rosiglitazone auf das Wachstumsverhalten der MCF-7 keinen eindeutig erkennbaren Einfluss. Die Zugabe von KI erhöhte die Zellzahl der mit Rosiglitazone präinkubierten MCF-7 Zellen während die Zugabe von LL und JL die MCF-7 Zellzahlen erniedrigten.

Eine Arbeitsgruppe um Bonofiglio zeigte, dass der PPAR- γ -Agonist Rosiglitazone die MCF-7 Zellen am Übergehen der G₀-G₁-Phase der Mitose in die S-Phase hindert. Neben dem Zellzyklusarrest führte die Inkubation der MCF-7 Zellen mit Rosiglitazone auch zur Apoptoseinduktion (Bonofiglio, Aquila et al. 2006). Außerdem fand diese Arbeitsgruppe heraus, dass Rosiglitazone den PI3K/Akt Signalweg unterdrückt und somit die MCF-7 Zellproliferation hemmt (Bonofiglio, Gabriele et al. 2005).

6.1.8. Redifferenzierungsversuch mit E2

Bei den MCF-7 Zellen konnte zwischen der Inkubation mit Östrogen und der Östrogeninkubation mit nachfolgender LL-Inkubation kein Unterschied festgestellt werden. In beiden Fällen kam es zu einer geringen Senkung der MCF-7 Zellzahl.

Die Inkubation mit Östrogen alleine senkte die MCF-7 Zellzahl nicht in dem Maße, wie die Östrogenpräinkubation mit nachfolgender Kaliumjodid-Inkubation.

Im Versuch mit den MCF-12A Zellen führte die Inkubation mit Östrogen zu einem geringfügigen Anstieg der MCF-12A Zellzahl verglichen mit der Inkubation mit Östrogen und LL bzw. KI.

Das Hormon Östrogen und die beiden hypophysären Hormone Oxytocin und Prolaktin spielen eine wichtige Rolle bei der NIS-Induktion der laktierenden Mamma (Cho, Leveille et al. 2000). Östradiol führt in ovariectomierten Mäusen nur zu einer mäßigen NIS-Induktion (Tazebay, Wapnir et al. 2000). Bei den FRTL-Schilddrüsenzellen hat Östradiol die NIS-Expression sogar vermindert (Furlanetto, Nguyen et al. 1999).

Oxytocin, Prolaktin und Östradiol zusammen konnten die Brustdrüsen-NIS deutlich erhöhen, während jedes Hormon alleine keine NIS-Induktion zeigte (Tazebay, Wapnir et al. 2000).

Oxytocin, Prolaktin und Östradiol wurden auch in Brustkrebszellen auf ihre Fähigkeit eine NIS-Expression und Jodid-Aufnahme zu induzieren geprüft (Cho, Leveille et al. 2000). Östradiol beeinflusste die Jodid-Aufnahme in MCF-7 Zellen nicht signifikant (Kogai, Kanamoto et al. 2004). Prolaktin führte bei den MCF-7 Zellen kurzzeitig zu einer signifikanten Jodid-Aufnahme und NIS-mRNA-Induktion (Arturi, Ferretti et al. 2005).

Kang et al. zeigten, dass $17\text{-}\beta$ Östradiol-präinkubierte MCF-7 Zellen die Radiojod-Aufnahme (^{125}I) um bis zu 70-80% steigern konnten. Die NIS-Expression konnte dosisabhängig über die $17\text{-}\beta$ Östradiol-Präinkubation der MCF-7 Zellen gesteigert werden (Kang, Chung et al. 2006).

Eine erhöhte NIS-Expression könnte auch in unserem Versuch der Grund für eine erniedrigte MCF-7 Zellzahl der Östrogen präinkubierten Zellen mit Kaliumjodid Substitution sein.

6.1.9. Einfluss von KI, LL und JL auf SD-CA

In unserem Versuch hatten weder Jodid, Jod noch $5\mu\text{M}$ Jodlaktone einen Effekt auf das Zellwachstum der anaplastischen 8505C Zellen. Lediglich die $10\mu\text{M}$ Jodlaktone-Konzentration führte zu einer signifikanten Reduzierung der 8505C Zellzahl.

Bei den B-CPAP Zellen führte die Kaliumjodid Substitution zu einer geringen Zellzahlerniedrigung. Die B-CPAP Zellzahl wurde jedoch durch die Jodlaktone Zugabe effektiver und dosisabhängig gesenkt.

Weder Jodid, Jod noch Jodlaktone hatten eine Wirkung auf das FTC-133-Zellwachstum.

Die Rolle von Jodid und δ -Jodlaktone auf die Wachstumshemmung und Apoptoseinduktion der gesunden Schilddrüsenfollikel ist hinreichend belegt (Pisarev MA 2000; Langer, Burzler et al. 2003). Es gibt aber noch keine Daten über die Wirkung von Jodid und Jodlaktone auf Schilddrüsenkarzinomzellen.

Jodid und Jod hatten in unseren Versuchen keinen Effekt auf das Wachstum der follikulären und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen. Bei den papillären Schilddrüsenkarzinomzellen B-CPAP führte δ -Jodlaktone schon in niedrigen Konzentrationen zu einer deutlichen Wachstumshemmung.

Aus unseren Versuchen mit den MCF-7 Zellen schließen wir, dass δ -Jodlaktone die Hauptkomponente ist, welche bei einer Jodexposition von Peroxidase-exprimierenden Zellen gebildet wird. δ -Jodlaktone bewirkt folglich die Wachstumshemmung und Induktion der Apoptose (Garcia-Solis, Alfaro et al. 2005).

Schon früher konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass δ -Jodlaktone die IP3 Bildung und nicht die cAMP-Bildung in porcinen Schweinefollikeln ex vivo hemmen kann und man wies darauf hin, dass die Hemmung des Proteinkinase C-Signalweges der Grund für die Wachstumshemmung sein könnte (Dugrillon and Gartner 1995). Aber Jod und δ -Jodlaktone scheinen auch Apoptose-induzierend zu sein. Wobei δ -Jodlaktone die aktivere Komponente zu sein scheint (Langer, Burzler et al. 2003).

Die Tatsache, dass Schilddrüsenkrebszellen nicht auf molekulares Jod ansprechen, könnte auf einen Peroxidase-mangel (TPO-Mangel) zurückzuführen sein (Faggiano, Caillou et al. 2007). Aus diesem Grund waren Redifferenzierungsversuche mit tRA oder Rosiglitazone von Bedeutung. Diese Redifferenzierungsversuche und die chronische Gabe von hochdosiertem Jod könnten ein neuer Ansatz in der Schilddrüsen- und Brustkrebstherapie sein.

Aufgrund der derzeitigen Versuchsergebnisse postulieren wir, dass Jodid nur in NIS- und Peroxidase-exprimierenden Zellen δ -Jodlaktone bilden kann, wohingegen molekulares Jod innerhalb der Zellmembran in Anwesenheit von Peroxidasen ohne NIS gebildet werden kann. Außerdem nehmen wir an, dass δ -Jodlaktone die Hauptkomponente bei der Zellproliferationshemmung und Apoptoseinduktion von differenzierten Schilddrüsenkrebszellen und Brustkrebszellen ist.

6.2. Diskussion der Fehlerquellen

Dass einige Versuchsergebnisse nicht wie erwartet ausfielen, könnte auf folgende Fehlerquellen zurückzuführen sein.

Ein möglicher Fehler bei der Versuchsdurchführung könnte sein, dass die Matrix nicht immer gleich gewählt wurde. Zu Beginn der Versuchsdurchführung wurde der Basalgruppe einer Platte lediglich das Wachstumsmedium hinzugefügt. Im Laufe unserer Versuchsdurchführung erkannten wir, dass ein Hinzufügen der maximalen Lösungssubstanz (z.B. Ethanol) sinnvoll ist, um eine eventuelle toxische Wirkung auf die Zellen der Platte ausschließen zu können. Danach wurde in allen Versuchen die Matrix konstant gehalten.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle sind die MCF-7 Zellen selbst. Die von uns verwendeten MCF-7 Zellen sind nicht identisch mit der ursprünglichen MCF-7 Zelllinie. Grund dafür ist möglicherweise, dass durch die zahlreichen Zellpassagen Mutationen erfolgt sind und damit keine einheitliche, identische Zelllinie mehr vorhanden ist. Auch könnte eine Kontamination mit Mycoplasmen einen Einfluss auf das Verhalten der Zellen haben.

7. Zusammenfassung

Der hemmende Effekt von Jod auf Schilddrüsenzellen ist bereits hinreichend belegt. In dieser Arbeit sollten nun die Einflüsse von Jodid, molekularem Jod und Jodlaktone einerseits auf maligne Schilddrüsenzellen und andererseits auf Mammakarzinomzellen (MCF-7) und normale Brustdrüsenzellen (MCF-12A) untersucht werden.

Der Grund für die Untersuchungen an Mammakarzinomzellen war, dass wegen des epidemiologischen Zusammenhanges zwischen Jodmangelstrumen und der erhöhten Brustkrebsinzidenz vermutet wurde, dass langjähriger Jodmangel nicht nur zur Proliferation und Bildung von Neoplasien in der Schilddrüse sondern auch in der Brustdrüse führt (Smyth, Smith et al. 1996). Bereits 1896 war ein Zusammenhang zwischen Brust- und Schilddrüsenkrebs vermutet worden (Beatson 1896).

Auch wurde gezeigt, dass eine jodreiche Ernährung, speziell Algen mit einem etwa fünffach niedrigeren Brustkrebsrisiko einher geht (Mettlin 1999). Algen enthalten neben Jodid auch organisch gebundenes Jod, insbesondere auch Jodlaktone.

Der wachstumshemmende und Apoptose-induzierende Effekt von Jod auf normale Schilddrüsenzellen wurde in unserer Arbeitsgruppe eingehend untersucht (Dugrillon and Gartner 1995; Langer, Burzler et al. 2003). Vor einigen Jahren wurde nun erstmals von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt, dass Mammakarzinomzellen (MCF-7) offenbar vergleichbar mit normalen Schilddrüsenzellen durch Jod und Jodlaktone beeinflusst werden (García-Solís et al., 2005). Da diese MCF-7 Zellen wenig NIS exprimieren und nicht durch Jodid beeinflusst werden, lag es nahe, auch Schilddrüsenkarzinomzellen zu untersuchen, da diese auch kein oder wenig NIS exprimieren.

Wir konnten nun bestätigen, dass molekulares Jod und insbesondere synthetisch hergestelltes δ -Jodlaktone aus Arachidonsäure signifikant die Proliferation von MCF-7, nicht aber MCF-12A Zellen hemmt. Diese Hemmung wird nicht durch Zellarrest, sondern Apoptose induziert. Die Tatsache dass gesunde Brustdrüsenzellen nicht durch Jod und δ -Jodlaktone beeinflusst werden, ist ein entscheidender klinisch bedeutsamer Befund wenn man daran denkt, z.B. elementares Jod als adjuvante Therapie bei Mammakarzinom einzusetzen. Der Grund hierfür ist allerdings bislang nicht klar, möglicherweise liegt dies daran, dass gesunde normale Brustdrüsenzellen weniger Peroxidasen haben oder sich besser vor Apoptose schützen können als schneller proliferierende Karzinomzellen. Hier liegt auch ein entscheidender

Unterschied zu den Schilddrüsenzellen, die ja sowohl durch Jodid als auch δ -Jodlaktone in der Proliferation gehemmt und auch apoptotisch werden.

Es ist in unseren Versuchen nicht gelungen, durch Rosiglitazone oder Retinsäure bei den MCF-7 Zellen NIS zu exprimieren und einen antiproliferativen Effekt durch Jodid zu erzielen, auch nicht durch Östrogen oder Forskolin und Cholera-Toxin.

Erstmals konnten wir zeigen, dass eine Zelllinie aus papillären Schilddrüsenkarzinom durch molekulares Jod und synthetisches δ -Jodlaktone vergleichbar zu MCF7 Zellen in der Proliferation durch Induktion der Apoptose gehemmt werden kann. Diese Zelllinie exprimiert offenbar kein NIS, denn Jodid hatte keinen Einfluss auf die Proliferation. Zelllinien von follikulären und anaplastischen Schilddrüsenkarzinom wurden durch Jod oder δ -Jodlaktone nicht beeinflusst.

Diese Ergebnisse könnten klinisch bedeutsam sein, denn sie bestätigen dass MCF-7 Zellen durch molekulares Jod nicht nur in der Proliferation gehemmt werden, sondern apoptotisch werden. Der klinische Einsatz von molekularem Jod z.B. durch Algen mit hohem Jodgehalt könnte ein neuer und vielversprechender Ansatz bei der Schilddrüsen- und Mammakarzinomtherapie sein. Klinische Studien hierzu wären wünschenswert und sollten in naher Zukunft initiiert werden, denn Algen sind nicht nur preiswert sondern auch arm an Nebenwirkungen, vorausgesetzt es bestehen keine Schilddrüsenautonomien oder ein M. Basedow.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 (Knostman, Cho et al. 2004): Die Jodid-Aufnahme in die Zelle	12
Abbildung 2 (Knostman, Cho et al. 2004): PKA und PI3K Signaltransduktion.....	17
Abbildung 3 Einfluss von Jodid auf MCF-7	50
Abbildung 4 Einfluss von Jod auf MCF-7.....	51
Abbildung 5 Einfluss von JL auf MCF-7	52
Abbildung 6 Einfluss von Jodid auf MCF-12A.....	54
Abbildung 7 Einfluss von Jod auf MCF-12A	55
Abbildung 8 Einfluss von Jodlaktone auf MCF-12A.....	56
Abbildung 9 Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-7	58
Abbildung 10 Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-12A.....	59
Abbildung 11 Einfluss von Forskolin auf MCF-7	61
Abbildung 12 Einfluss von Forskolin auf MCF-12A.....	62
Abbildung 13 Einfluss von Choleratoxin auf MCF-12A	64
Abbildung 14 Einfluss von PE auf MCF-7.....	66
Abbildung 15 Einfluss von PE auf MCF-12A	67
Abbildung 16 Einfluss von tRA auf MCF-7.....	69
Abbildung 17 Einfluss von tRA auf MCF-12A	70
Abbildung 18 Einfluss von Rosiglitazone auf MCF-7	72
Abbildung 19 Einfluss von E2 und Jod auf MCF-7	75
Abbildung 20 Einfluss von E2 und Jodid auf MCF-7.....	76
Abbildung 21 Einfluss von E2 und Jod auf MCF-12A	78
Abbildung 22 Einfluss von E2 und Jodid auf MCF-12A	79
Abbildung 23 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf 8505C	81
Abbildung 24 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf B-CPAP.....	83
Abbildung 25 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlaktone auf FTC.....	85

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Einfluss von Jodid, Jod und JL auf MCF-7	49
Tabelle 2 Einfluss von Jodid, Jod und JL auf MCF-12A	53
Tabelle 3 Apoptose durch Jodid, Jod und JL auf MCF-7	58
Tabelle 4 Apoptose durch Jodid, Jod und JL bei MCF-12A	59
Tabelle 5 Einfluss von Forskolin auf MCF-7	61
Tabelle 6 Einfluss von Forskolin auf MCF-12A	62
Tabelle 7 Einfluss von Cholera toxin auf MCF-12A	64
Tabelle 8 Einfluss von PE auf MCF-7	66
Tabelle 9 Einfluss von PE auf MCF-12A	67
Tabelle 10 Einfluss von tRA auf MCF-7	69
Tabelle 11 Einfluss von tRA auf MCF-12A	70
Tabelle 12 Einfluss von Rosiglitazone auf MCF-7	72
Tabelle 13 Einfluss von E2 auf MCF-7	74
Tabelle 14 Einfluss von E2 auf MCF-12A	77
Tabelle 15 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlakton auf 8505C	81
Tabelle 16 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlakton auf B-CPAP	82
Tabelle 17 Einfluss von Jod, Jodid und Jodlakton auf FTC	84

10. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Birgit Ander
Geburtsdatum: 04.05.1982
Geburtsort: Augsburg
Familienstand: ledig

Schulbildung

1988 - 1993 Grundschule
 Birkenau Grund- und Volksschule, Augsburg
1993 - 2002 Gymnasium
 Maria-Theresia Gymnasium, Augsburg
06/2002: Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Studium

2003-2009 Studium der Zahnheilkunde
 Ludwig-Maximilians-Universität, München
04/2009: Approbation als Zahnärztin

Dissertation

Seit 2006 Dissertation

11. Literaturverzeichnis

- (2002). "Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50302 women with breast cancer and 96973 women without the disease." Lancet **360**(9328): 187-195.
- Aceves, C., B. Anguiano, et al. (2005). "Is iodine a gatekeeper of the integrity of the mammary gland?" J Mammary Gland Biol Neoplasia **10**(2): 189-196.
- Adamu, S., M. Y. Fatihu, et al. (2007). "Sequential testicular and epididymal damage in Zebu bulls experimentally infected with *Trypanosoma vivax*." Vet Parasitol **143**(1): 29-34.
- Al-Dhaheri, M. H. and B. G. Rowan (2007). "Protein kinase A exhibits selective modulation of estradiol-dependent transcription in breast cancer cells that is associated with decreased ligand binding, altered estrogen receptor alpha promoter interaction, and changes in receptor phosphorylation." Mol Endocrinol **21**(2): 439-456.
- Anselmi, F., V. H. Hernandez, et al. (2008). "ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca^{2+} signals across the inner ear." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(48): 18770-18775.
- Antoniou, A., P. D. Pharoah, et al. (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." Am J Hum Genet **72**(5): 1117-1130.
- Arroyo-Helguera, O., B. Anguiano, et al. (2006). "Uptake and antiproliferative effect of molecular iodine in the MCF-7 breast cancer cell line." Endocr Relat Cancer **13**(4): 1147-1158.
- Arteaga, C. L., M. D. Johnson, et al. (1991). "Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in primary human breast carcinomas." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(23): 10435-10439.
- Arturi, F., E. Ferretti, et al. (2005). "Regulation of iodide uptake and sodium/iodide symporter expression in the mcf-7 human breast cancer cell line." J Clin Endocrinol Metab **90**(4): 2321-2326.
- Barkhem, T., B. Carlsson, et al. (1998). "Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists." Mol Pharmacol **54**(1): 105-112.
- Bartsch, H., J. Nair, et al. (1999). "Dietary polyunsaturated fatty acids and cancers of the breast and colorectum: emerging evidence for their role as risk modifiers." Carcinogenesis **20**(12): 2209-2218.
- Bates, S. E., N. E. Davidson, et al. (1988). "Expression of transforming growth factor alpha and its messenger ribonucleic acid in human breast cancer: its regulation by estrogen and its possible functional significance." Mol Endocrinol **2**(6): 543-555.
- Beatson (1896). "On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases." Lancet: 104-110.
- Bernardi, P., L. Scorrano, et al. (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues." Eur J Biochem **264**(3): 687-701.

- Bernstein, L. (2006). "The risk of breast, endometrial and ovarian cancer in users of hormonal preparations." Basic Clin Pharmacol Toxicol **98**(3): 288-296.
- Birkenfeld, H. P., B. S. McIntyre, et al. (1996). "Protein kinase C isoenzyme expression in normal mouse mammary epithelial cells grown in primary culture." Proc Soc Exp Biol Med **213**(1): 65-70.
- Biscardi, J. S., R. C. Ishizawar, et al. (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer." Breast Cancer Res **2**(3): 203-210.
- Boeynaems, J. M. and W. C. Hubbard (1980). "Transformation of arachidonic acid into an iodolactone by the rat thyroid." J Biol Chem **255**(19): 9001-9004.
- Bonofiglio, D., S. Aquila, et al. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activates p53 gene promoter binding to the nuclear factor-kappaB sequence in human MCF7 breast cancer cells." Mol Endocrinol **20**(12): 3083-3092.
- Bonofiglio, D., S. Gabriele, et al. (2005). "Estrogen receptor alpha binds to peroxisome proliferator-activated receptor response element and negatively interferes with peroxisome proliferator-activated receptor gamma signaling in breast cancer cells." Clin Cancer Res **11**(17): 6139-6147.
- Carrasco, N. (1993). "Iodide transport in the thyroid gland." Biochim Biophys Acta **1154**(1): 65-82.
- Chen, P., K. Gupta, et al. (1994). "Cell movement elicited by epidermal growth factor receptor requires kinase and autophosphorylation but is separable from mitogenesis." J Cell Biol **124**(4): 547-555.
- Cho, J. Y., R. Leveille, et al. (2000). "Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na⁺/I⁻ symporter expression in mammary glands." J Clin Endocrinol Metab **85**(8): 2936-2943.
- Colditz, G. A. (1998). "Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer." J Natl Cancer Inst **90**(11): 814-823.
- Connolly, J. M., E. M. Gilhooly, et al. (1999). "Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algal source of docosahexaenoic acid, on MDA-MB-231 breast cancer cell growth and apoptosis in nude mice." Nutr Cancer **35**(1): 44-49.
- Dai, G., O. Levy, et al. (1996). "Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter." Nature **379**(6564): 458-460.
- Dohan, O., A. De la Vieja, et al. (2003). "The sodium/iodide Symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance." Endocr Rev **24**(1): 48-77.
- Dugrillon, A., G. Bechtner, et al. (1990). "Evidence that an iodolactone mediates the inhibitory effect of iodide on thyroid cell proliferation but not on adenosine 3',5'-monophosphate formation." Endocrinology **127**(1): 337-343.
- Dugrillon, A. and R. Gartner (1995). "delta-Iodolactones decrease epidermal growth factor-induced proliferation and inositol-1,4,5-trisphosphate generation in porcine thyroid follicles--a possible mechanism of growth inhibition by iodide." Eur J Endocrinol **132**(6): 735-743.

- Dunnwald, L. K., M. A. Rossing, et al. (2007). "Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients." Breast Cancer Res **9**(1): R6.
- Eggo, M. C., L. K. Bachrach, et al. (1986). "Disparate uptake of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and $^{125}\text{I}^-$ in thyroid cells in culture." Horm Metab Res **18**(3): 167-172.
- Ekholm, R. and U. Bjorkman (1997). "Glutathione peroxidase degrades intracellular hydrogen peroxide and thereby inhibits intracellular protein iodination in thyroid epithelium." Endocrinology **138**(7): 2871-2878.
- Eng, P. H., G. R. Cardona, et al. (1999). "Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein." Endocrinology **140**(8): 3404-3410.
- Eskin, B. A. (1970). "Iodine metabolism and breast cancer." Trans N Y Acad Sci **32**(8): 911-947.
- Eskin, B. A. (1977). "Iodine and mammary cancer." Adv Exp Med Biol **91**: 293-304.
- Eskin, B. A., C. E. Grotkowski, et al. (1995). "Different tissue responses for iodine and iodide in rat thyroid and mammary glands." Biol Trace Elem Res **49**(1): 9-19.
- Eskin, B. A., R. Shuman, et al. (1975). "Rat mammary gland atypia produced by iodine blockade with perchlorate." Cancer Res **35**(9): 2332-2339.
- Fabien, N., A. Fusco, et al. (1994). "Description of a human papillary thyroid carcinoma cell line. Morphologic study and expression of tumoral markers." Cancer **73**(8): 2206-2212.
- Faggiano, A., B. Caillou, et al. (2007). "Functional characterization of human thyroid tissue with immunohistochemistry." Thyroid **17**(3): 203-211.
- Farid, N. R., Y. Shi, et al. (1994). "Molecular basis of thyroid cancer." Endocr Rev **15**(2): 202-232.
- Fenton, M. S., K. M. Marion, et al. (2008). "Identification of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response element modulator as an activator of the human sodium/iodide symporter upstream enhancer." Endocrinology **149**(5): 2592-2606.
- Fontana, J. A., G. Miksis, et al. (1987). "Inhibition of human mammary carcinoma cell proliferation by retinoids and intracellular cAMP-elevating compounds." J Natl Cancer Inst **78**(6): 1107-1112.
- Forsyth, I. A. (1991). "The mammary gland." Baillieres Clin Endocrinol Metab **5**(4): 809-832.
- Freter, C. E., M. E. Lippman, et al. (1988). "Alterations in phosphoinositide metabolism associated with 17 beta-estradiol and growth factor treatment of MCF-7 breast cancer cells." Mol Endocrinol **2**(2): 159-166.
- Fujimoto, N. and B. S. Katzenellenbogen (1994). "Alteration in the agonist/antagonist balance of antiestrogens by activation of protein kinase A signaling pathways in breast cancer cells: antiestrogen selectivity and promoter dependence." Mol Endocrinol **8**(3): 296-304.

- Funahashi, H., T. Imai, et al. (1999). "Wakame seaweed suppresses the proliferation of 7,12-dimethylbenz(a)-anthracene-induced mammary tumors in rats." Jpn J Cancer Res **90**(9): 922-927.
- Furlanetto, T. W., L. Q. Nguyen, et al. (1999). "Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells." Endocrinology **140**(12): 5705-5711.
- Garcia-Solis, P., Y. Alfaro, et al. (2005). "Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinogenesis by molecular iodine (I₂) but not by iodide (I⁻) treatment Evidence that I₂ prevents cancer promotion." Mol Cell Endocrinol **236**(1-2): 49-57.
- Gartner, R. (1992). "Thyroid growth in vitro." Exp Clin Endocrinol **100**(1-2): 32-35.
- Gartner, R., P. Rank, et al. (2010). "The role of iodine and delta-iodolactone in growth and apoptosis of malignant thyroid epithelial cells and breast cancer cells." Hormones (Athens) **9**(1): 60-66.
- Gartner, R., D. Schopohl, et al. (1997). "Regulation of transforming growth factor beta 1 messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles in vitro by growth factors, iodine, or delta-iodolactone." Thyroid **7**(4): 633-640.
- Ghent, W. R., B. A. Eskin, et al. (1993). "Iodine replacement in fibrocystic disease of the breast." Can J Surg **36**(5): 453-460.
- Goretzki, P. E., A. Frilling, et al. (1990). "Growth regulation of normal thyroids and thyroid tumors in man." Recent Results Cancer Res **118**: 48-63.
- Hammami, M. M. and S. Bakheet (1996). "Radioiodine breast uptake in nonbreastfeeding women: clinical and scintigraphic characteristics." J Nucl Med **37**(1): 26-31.
- Hofbauer, L. C., M. Rafferzeder, et al. (1995). "Insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles is regulated by thyrotropin and iodine." Eur J Endocrinol **132**(5): 605-610.
- Horwitz, K. B., Y. Koseki, et al. (1978). "Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen." Endocrinology **103**(5): 1742-1751.
- Horwitz, K. B. and W. L. McGuire (1980). "Studies on mechanisms of estrogen and antiestrogen action in human breast cancer." Recent Results Cancer Res **71**: 45-58.
- Ito, T., T. Seyama, et al. (1993). "In vitro irradiation is able to cause RET oncogene rearrangement." Cancer Res **53**(13): 2940-2943.
- Kairouz, R. and R. J. Daly (2000). "Tyrosine kinase signalling in breast cancer: modulation of tyrosine kinase signalling in human breast cancer through altered expression of signalling intermediates." Breast Cancer Res **2**(3): 197-202.
- Kang, J. H., J. K. Chung, et al. (2006). "Evaluation of transcriptional activity of the oestrogen receptor with sodium iodide symporter as an imaging reporter gene." Nucl Med Commun **27**(10): 773-777.
- Kawasaki, H., G. M. Springett, et al. (1998). "A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1." Science **282**(5397): 2275-2279.
- Kiess, W. and B. Gallaher (1998). "Hormonal control of programmed cell death/apoptosis." Eur J Endocrinol **138**(5): 482-491.

- Kilbane, M. T., R. A. Ajjan, et al. (2000). "Tissue iodine content and serum-mediated ^{125}I uptake-blocking activity in breast cancer." J Clin Endocrinol Metab **85**(3): 1245-1250.
- Klijn, J. G., P. M. Berns, et al. (1992). "The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients." Endocr Rev **13**(1): 3-17.
- Knostman, K. A., J. Y. Cho, et al. (2004). "Signaling through 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and phosphoinositide-3 kinase induces sodium/iodide symporter expression in breast cancer." J Clin Endocrinol Metab **89**(10): 5196-5203.
- Kogai, T., Y. Kanamoto, et al. (2004). "Systemic retinoic acid treatment induces sodium/iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models." Cancer Res **64**(1): 415-422.
- Kogai, T., Y. Kanamoto, et al. (2005). "Differential regulation of sodium/iodide symporter gene expression by nuclear receptor ligands in MCF-7 breast cancer cells." Endocrinology **146**(7): 3059-3069.
- Kogai, T., J. J. Schultz, et al. (2000). "Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(15): 8519-8524.
- Kogai, T., K. Taki, et al. (2006). "Enhancement of sodium/iodide symporter expression in thyroid and breast cancer." Endocr Relat Cancer **13**(3): 797-826.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- Krstic, M., S. P. Sovilj, et al. (2010). "New ruthenium(II) complexes with N-alkylphenothiazines: synthesis, structure, in vivo activity as free radical scavengers and in vitro cytotoxicity." Eur J Med Chem **45**(9): 3669-3676.
- Lamb, J., M. H. Ladha, et al. (2000). "Regulation of the functional interaction between cyclin D1 and the estrogen receptor." Mol Cell Biol **20**(23): 8667-8675.
- Langer, R., C. Burzler, et al. (2003). "Influence of iodide and iodolactones on thyroid apoptosis. Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles." Exp Clin Endocrinol Diabetes **111**(6): 325-329.
- Lebedeva, I. V., Z. Z. Su, et al. (2003). "Restoring apoptosis as a strategy for cancer gene therapy: focus on p53 and mda-7." Semin Cancer Biol **13**(2): 169-178.
- Lehmann, P., P. Rank, et al. (2006). "Dose-related influence of sodium selenite on apoptosis in human thyroid follicles in vitro induced by iodine, EGF, TGF-beta, and H₂O₂." Biol Trace Elem Res **112**(2): 119-130.
- Levenson, A. S. and V. C. Jordan (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line." Cancer Res **57**(15): 3071-3078.
- Lippman, M., G. Bolan, et al. (1976). "The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture." Cancer Res **36**(12): 4595-4601.
- Lowe, W. L., Jr., R. Fu, et al. (1997). "Growth factor-induced transcription via the serum response element is inhibited by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in MCF-7 breast cancer cells." Endocrinology **138**(6): 2219-2226.

- Maemura, M., Y. Iino, et al. (1998). "Inhibitory effects of an antiestrogen, toremifene, on the phorbol ester-induced adhesive capacity of breast carcinoma cells." Int J Oncol **13**(5): 981-985.
- Mazzaferri, E. L. and J. Robyn (1996). "Postsurgical management of differentiated thyroid carcinoma." Otolaryngol Clin North Am **29**(4): 637-662.
- McDonnell, T. J., P. Troncoso, et al. (1992). "Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer." Cancer Res **52**(24): 6940-6944.
- Messina, M., W. McCaskill-Stevens, et al. (2006). "Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings." J Natl Cancer Inst **98**(18): 1275-1284.
- Mettlin, C. (1999). "Global breast cancer mortality statistics." CA Cancer J Clin **49**(3): 138-144.
- Morris, J. C., 3rd, G. Ranganathan, et al. (1988). "The effects of transforming growth factor-beta on growth and differentiation of the continuous rat thyroid follicular cell line, FRTL-5." Endocrinology **123**(3): 1385-1394.
- Nagata, S. (1997). "Apoptosis by death factor." Cell **88**(3): 355-365.
- Nilsson, S., S. Makela, et al. (2001). "Mechanisms of estrogen action." Physiol Rev **81**(4): 1535-1565.
- Noh, D. Y., S. H. Shin, et al. (1995). "Phosphoinositide-specific phospholipase C and mitogenic signaling." Biochim Biophys Acta **1242**(2): 99-113.
- Normanno, N. and F. Ciardiello (1997). "EGF-related peptides in the pathophysiology of the mammary gland." J Mammary Gland Biol Neoplasia **2**(2): 143-151.
- Payne, S. J., R. L. Bowen, et al. (2008). "Predictive markers in breast cancer--the present." Histopathology **52**(1): 82-90.
- Pekary, A. E. and J. M. Hershman (1998). "Tumor necrosis factor, ceramide, transforming growth factor-beta1, and aging reduce Na⁺/I⁻ symporter messenger ribonucleic acid levels in FRTL-5 cells." Endocrinology **139**(2): 703-712.
- Perron, B., A. M. Rodriguez, et al. (2001). "Cloning of the mouse sodium iodide symporter and its expression in the mammary gland and other tissues." J Endocrinol **170**(1): 185-196.
- Pisarev MA, G. R. (2000). "Thyroid autoregulation by iodine." The Thyroid: pp, 85-90.
- Ravdin, P. M., S. Green, et al. (1992). "Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study." J Clin Oncol **10**(8): 1284-1291.
- Rillema, J. A., C. H. Williams, et al. (2002). "Effect of insulin on iodide uptake in mouse mammary gland explants." Exp Biol Med (Maywood) **227**(1): 32-35.
- Rillema, J. A., T. X. Yu, et al. (2000). "Effect of prolactin on sodium iodide symporter expression in mouse mammary gland explants." Am J Physiol Endocrinol Metab **279**(4): E769-772.

- Ronckers, C. M., C. A. Erdmann, et al. (2005). "Radiation and breast cancer: a review of current evidence." Breast Cancer Res **7**(1): 21-32.
- Rose, D. P. and T. E. Davis (1979). "Plasma triiodothyronine concentrations in breast cancer." Cancer **43**(4): 1434-1438.
- Rowland, F. S., D. R. Blake, et al. (1998). "Abstracts of the 6th FECS Conference 1998 Lectures." Environ Sci Pollut Res Int **5**(3): 119-196.
- Rubis, B., S. Grodecka-Gazdecka, et al. (2004). "Contribution of protein kinase A and protein kinase C signalling pathways to the regulation of HSD11B2 expression and proliferation of MCF-7 cells." Acta Biochim Pol **51**(4): 919-924.
- Schroder-van der Elst, J. P., D. van der Heide, et al. (2001). "The expression of the sodium/iodide symporter is up-regulated in the thyroid of fetuses of iodine-deficient rats." Endocrinology **142**(9): 3736-3741.
- Sheffield, L. G. and C. W. Welsch (1985). "Cholera-toxin-enhanced growth of human breast cancer cell lines in vitro and in vivo: interaction with estrogen." Int J Cancer **36**(4): 479-483.
- Shoyab, M., V. L. McDonald, et al. (1988). "Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6528-6532.
- Shrivastava, A., M. Tiwari, et al. (2006). "Molecular iodine induces caspase-independent apoptosis in human breast carcinoma cells involving the mitochondria-mediated pathway." J Biol Chem **281**(28): 19762-19771.
- Smanik, P. A., K. Y. Ryu, et al. (1997). "Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter." Endocrinology **138**(8): 3555-3558.
- Smyth, P. P. (1997). "The thyroid and breast cancer: a significant association?" Ann Med **29**(3): 189-191.
- Smyth, P. P. (2003). "The thyroid, iodine and breast cancer." Breast Cancer Res **5**(5): 235-238.
- Smyth, P. P., D. F. Smith, et al. (1996). "A direct relationship between thyroid enlargement and breast cancer." J Clin Endocrinol Metab **81**(3): 937-941.
- Snedeker, S. M., C. F. Brown, et al. (1991). "Expression and functional properties of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor during mouse mammary gland ductal morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(1): 276-280.
- Soule, H. D., J. Vazquez, et al. (1973). "A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma." J Natl Cancer Inst **51**(5): 1409-1416.
- Spitzweg, C., W. Joba, et al. (1998). "Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa." J Clin Endocrinol Metab **83**(5): 1746-1751.
- Spitzweg, C. and J. C. Morris (2002). "The sodium iodide symporter: its pathophysiological and therapeutic implications." Clin Endocrinol (Oxf) **57**(5): 559-574.

- Stoddard, F. R., 2nd, A. D. Brooks, et al. (2008). "Iodine alters gene expression in the MCF7 breast cancer cell line: evidence for an anti-estrogen effect of iodine." Int J Med Sci **5**(4): 189-196.
- Strum, J. M. (1978). "Site of iodination in rat mammary gland." Anat Rec **192**(2): 235-244.
- Sutherland, E. W. (1972). "Studies on the mechanism of hormone action." Science **177**(47): 401-408.
- Takatani, O., T. Okumoto, et al. (1989). "Relationship between the levels of serum thyroid hormones or estrogen status and the risk of breast cancer genesis in Japanese women." Cancer Res **49**(11): 3109-3112.
- Tazebay, U. H., I. L. Wapnir, et al. (2000). "The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer." Nat Med **6**(8): 871-878.
- Tessaro, S., J. U. Beria, et al. (2001). "[Oral contraceptive and breast cancer: a case-control study]." Rev Saude Publica **35**(1): 32-38.
- Thomas, B. S., R. D. Bulbrook, et al. (1986). "Thyroid function and the incidence of breast cancer in Hawaiian, British and Japanese women." Int J Cancer **38**(3): 325-329.
- Tsai, H. W., J. A. Katzenellenbogen, et al. (2004). "Protein kinase A activation of estrogen receptor alpha transcription does not require proteasome activity and protects the receptor from ligand-mediated degradation." Endocrinology **145**(6): 2730-2738.
- Unterholzner, S., M. J. Willhauck, et al. (2006). "Dexamethasone stimulation of retinoic Acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of ^{131}I in breast cancer cells." J Clin Endocrinol Metab **91**(1): 69-78.
- van der Geer, P., T. Hunter, et al. (1994). "Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways." Annu Rev Cell Biol **10**: 251-337.
- van der Laan, B. F., J. L. Freeman, et al. (1995). "Expression of growth factors and growth factor receptors in normal and tumorous human thyroid tissues." Thyroid **5**(1): 67-73.
- Vorherr, H. (1987). "Thyroid function in benign and malignant breast disease." Eur J Cancer Clin Oncol **23**(3): 255-257.
- Watanabe, T., S. Inoue, et al. (1997). "Agonistic effect of tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen receptor subtype: functional difference between estrogen receptors alpha and beta." Biochem Biophys Res Commun **236**(1): 140-145.
- Willhauck, M. J., B. Sharif-Samani, et al. (2008). "Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts in vivo after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone." Breast Cancer Res Treat **109**(2): 263-272.
- Willingham, M. C. (1999). "Cytochemical methods for the detection of apoptosis." J Histochem Cytochem **47**(9): 1101-1110.
- Zhivotovsky, B. and S. Orrenius (2003). "Defects in the apoptotic machinery of cancer cells: role in drug resistance." Semin Cancer Biol **13**(2): 125-134.
- Zivadinovic, D., B. Gametchu, et al. (2005). "Membrane estrogen receptor-alpha levels in MCF-7 breast cancer cells predict cAMP and proliferation responses." Breast Cancer Res **7**(1): R101-112.