

Aus der  
Medizinischen Klinik und Poliklinik II Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-  
Universität München,  
Direktor: Prof. Dr. B. Göke

**Radioiodtherapie beim Nebennierenrindenkarzinom nach  
gewebespezifischem  
Natrium/Iodid-Symporter Gentransfer (*in vitro*)**

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

vorgelegt von  
**Christiane Leistner**  
aus  
Salzburg  
2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. med. Christine Spitzweg

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Reincke  
Prof. Dr. Claus Belka

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Neziha Cengic

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

Tag der mündlichen Prüfung: 30.07.2009

**Auszüge dieser Arbeit wurden vorab veröffentlicht:**

Cengic N, Leistner C, Unterholzner S, Hirschmann M, Schütz M, Göke B, Beuschlein F, Morris JC, Spitzweg C. Radioiodine therapy of adrenocortical cancer following ACTH-receptor promoter-driven expression of the sodium iodide symporter. **International congress of endocrinology 2004 (Vancouver, Canada).**

## **Meinen Eltern und meiner Großmutter**

# INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG	4
1.1 Das primäre Nebennierenrindenkarzinom (NNR-Karzinom)	4
1.1.1 Epidemiologie	4
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese	4
1.1.3 Klinische Manifestation	4
1.1.4 Therapie und Prognose	5
1.2 Der Natrium/Iodid-Sympporter (NIS)	6
1.2.1 Funktion und Regulation	6
1.2.2 Molekulare Charakterisierung von NIS	9
1.2.3 Extrathyreoidale Expression von NIS	10
1.2.4 NIS und benigne Schilddrüsenerkrankungen	11
1.2.4.1 Schilddrüsenknoten	11
1.2.4.2 Autoimmunerkrankungen	11
1.2.4.3 Kongenitaler Iodtransportdefekt (ITD)	12
1.2.5 NIS und maligne Schilddrüsenerkrankungen	12
1.2.6 NIS und Mammakarzinom	14
1.2.7 NIS als neues therapeutisches Gen	16
1.2.7.1 Grundlagen der NIS-Gentherapie	16
1.2.7.2 Verwendung gewebespezifischer Promotoren	16
1.3 Grundlagen und Ziele der Arbeit	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Molekularbiologische Methoden	18
2.1.1 Herstellung eines Expressionsplasmids	18
2.1.2 Spaltung mit Endonukleasen	19
2.1.3 Agarosegelektrophorese	19
2.1.4 Gelextraktion	19
2.1.5 Ligation	20
2.1.6 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	20
2.1.7 DNA-Minipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.1.8 DNA-Maxipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
2.1.10 DNA-Sequenzierung	23
2.2 Zellkultur und Zelllinie	23

2.2.1 Verwendete Zelllinie	23
2.2.2 Medium und Zellkulturbedingungen	23
2.2.3 Kryokonservierung	24
2.2.4 Proliferationsassay	24
2.2.5 Transfektion	25
2.2.5.1 Puromycin als selektives Antibiotikum	25
2.2.5.2 Transiente Transfektion	25
2.2.5.3 Stabile Transfektion	25
2.3 Iod-Uptake Versuche	26
2.3.1 Iod-Uptake Assay	26
2.3.2 Zeitkinetik	27
2.3.3 Iod-Efflux	27
2.4 Iod-Organifizierung	28
2.4.1 Inkubation der Zellen mit $^{125}\text{I}$	28
2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure	28
2.5 Northern Blot	29
2.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren	29
2.5.2 Konzentrationsbestimmung durch Photometrie	29
2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung der RNA	29
2.5.4 Transfer auf die Nylonmembran	30
2.5.5 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonde	31
2.5.6 Hybridisierung	32
2.5.7 Kontroll-Hybridisierung mit einer $\beta$ -Actin-Sonde	32
2.6 Western Blot	33
2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot-Analyse (Membranpräparation)	33
2.6.2 Protein-Konzentrationbestimmung (Bradford-Proteinbestimmung)	33
2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.6.4 Western Blot-Analyse	34
2.7 Immunzytochemie	34
2.8 Clonogenic Assay	35
2.8.1 Durchführung	35
2.8.2 Färbung und Auswertung	36
2.9 Statistik	36

2.10 Verwendete Geräte	36
2.11 Verwendete Materialien	38
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>42</b>
3.1 Selektion der erfolgreich mit NIS transfizierten Zellen durch Messung der Iod-Akkumulation	42
3.2 Charakterisierung der NIS-induzierten Iod-Akkumulation durch	44
3.2.1 Bestimmung der Zeitkinetik der Iod-Aufnahme	44
3.2.2 Bestimmung der Iod-Organifizierung	45
3.2.3 Bestimmung des Iod-Efflux	45
3.3 Bestätigung der NIS-Expression in Y-1 Zellen nach gewebespezifischem NIS-Gentransfer	46
3.3.1 Nachweis von NIS-mRNA durch Northern-Blot Analyse	46
3.3.2 Nachweis von NIS-Protein durch Western-Blot Analyse	47
3.3.3 Nachweis von Membran-assoziiertem NIS-Protein mittels Immunzytochemie	48
3.4 Nachweis der Zelltoxizität von $^{131}\text{I}$ im <i>in vitro</i> -Clonogenic Assay	48
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>50</b>
4.1 NIS als neues diagnostisches und therapeutisches Gen zur Tumortherapie extrathyreoидaler Tumoren	50
4.1.1 Untersuchung des NIS-Gentransfers in verschiedenen Tumormodellen	50
4.1.1.1 Unselektiver NIS-Gentransfer	50
4.1.1.2 Tumorselektiver NIS-Gentransfer	52
4.1.2 NIS-Gentransfer beim NNR-Karzinom	54
4.2 Optimierung der therapeutischen Effizienz der NIS-Gentherapie	55
4.2.1 Iod-Organifizierung und -Efflux: ihr potentieller Einfluss auf den Therapieerfolg	55
4.2.2 Stimulation des Iod-Uptakes	57
4.2.3 Verwendung alternativer Radionuklide	58
4.3 Ausblicke der NIS-Gentherapie	60
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>62</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>63</b>
<b>7 ABKÜRZUNGEN</b>	<b>82</b>
<b>8 DANKSAGUNG</b>	<b>84</b>
<b>9 LEBENSLAUF</b>	<b>85</b>

# **1 EINLEITUNG**

## **1.1 Das primäre Nebennierenrindenkarzinom (NNR-Karzinom)**

### **1.1.1 Epidemiologie**

Das Karzinom der Nebennierenrinde gehört mit einer jährlichen Inzidenz von 1-2 Neuerkrankungen pro Million Einwohner zu den seltenen malignen Neubildungen des menschlichen Körpers. Die Altersverteilung ist bimodal mit einem ersten Erkrankungsgipfel im Kindesalter und einem Zweiten im 5. Lebensjahrzehnt, darüberhinaus erkranken Frauen etwas häufiger als Männer (Allolio *et al.*, 2002).

### **1.1.2 Ätiologie und Pathogenese**

Starker Tabakkonsum bei Männern sowie die Einnahme oraler Kontrazeptiva bei Frauen werden als Risikofaktoren für das Auftreten des NNR-Karzinoms diskutiert (Hsing *et al.*, 1996).

Die Pathogenese des NNR-Karzinoms auf molekularer Ebene bleibt bis heute weitgehend ungeklärt. Allerdings konnten in den letzten Jahren anhand verschiedener hereditärer Tumorsyndrome, welche mit der Entwicklung von NNR-Karzinomen einhergehen, neue Erkenntnisse gewonnen werden. So zeigten sich auch in sporadischen NNR-Karzinomen oft Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen (pathogenetisch bedeutsam beim LiFraumeni-Syndrom) oder eine IGF-II-Überexpression (Beckwith-Wiedemann-Syndrom) (Allolio *et al.*, 2002).

Auch ein Allelverlust des ACTH-Rezeptorgens, wobei ACTH eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der Nebenniere spielt, konnte bei einer Vielzahl der untersuchten NNR-Karzinome nachgewiesen werden (Allolio *et al.*, 2002; Beuschlein *et al.*, 2001).

Zusammenfassend lässt sich jedoch sagen, dass zur genaueren Aufklärung der komplexen Tumorgenese des NNR-Karzinoms noch weitere Forschungsergebnisse benötigt werden.

### **1.1.3 Klinische Manifestation**

Die klinische Manifestation des NNR-Karzinoms ist abhängig vom Ausmass der hormonellen Aktivität des Tumors, wobei insgesamt die hormonsezernierenden Karzinome mit etwa 60 % gegenüber den nicht-funktionellen Malignomen überwiegen (Allolio *et al.*, 2004).

Patienten mit hormonell inaktiven NNR-Karzinomen werden meist auffällig durch lokale Beschwerden aufgrund zunehmender Tumorgrösse (Allolio *et al.*, 2002). Auch pathologische Frakturen als Ausdruck einer bereits stattgefundenen Knochen-Metastasierung können zur Erstdiagnose führen (Allolio *et al.*, 2004).

Die weitaus häufigeren hormonaktiven Karzinome hingegen äussern sich charakteristischerweise aufgrund der durch die Hormonhypersekretion verursachten Symptome. Hierbei stellt das Auftreten eines Cushing-Syndroms (mit oder ohne Virilisierung), hervorgerufen durch die autonome Produktion von Kortisol durch die Tumorzellen (Icard *et al.*, 2001), die häufigste Manifestationsform dar. Weiterhin kommt es auch häufig zu einer Überproduktion von Androgenen und Östrogenen, Aldosteronsezernierende Tumoren treten hingegen eher selten auf (Allolio *et al.*, 2002).

Interessanterweise zeigen NNR-Karzinome auch im fortgeschrittenen Stadium nur selten eine ausgeprägte B-Symptomatik (Fieber, Gewichtsverlust, Nachschweiss) (Allolio *et al.*, 2002 & 2004).

#### **1.1.4 Therapie und Prognose**

Bis heute ist die vollständige operative Entfernung des Tumors der einzige kurative Therapieansatz. Dabei ist oft nicht nur die Entfernung der betroffenen Nebenniere und der drainierenden regionalen Lymphknoten, sondern auch eine *en-bloc* Resektion von mitbefallenen Organen wie Niere, Milz, Leber oder auch des Pankreas notwendig (Allolio *et al.*, 2002; Icard *et al.*, 2001).

Für den Fall eines häufig auftretenden Lokalrezidivs, bei inkompletter Tumor-Resektion sowie höheren Tumorstadien stehen eine Reihe weiterer Therapieoptionen wie Strahlentherapie, das Adrenolytikum Mitotane oder eine zytostatische Polychemotherapie (mit z.B. Etoposid, Cisplatin oder Doxorubicin) zur Verfügung (Allolio *et al.*, 2002).

Die Prognose des NNR-Karzinoms bleibt jedoch trotz multimodaler Therapieansätze sehr schlecht mit einer mittleren Überlebenszeit von ca. 3 Monaten beim unbehandelten Patienten (MacFarlane DA, 1958). In verschiedenen Studien wird die 5-Jahres-Überlebensrate bei behandelten Patienten in Abhängigkeit vom Tumorstadium zwischen 23-60 % angegeben (Allolio *et al.*, 2004).

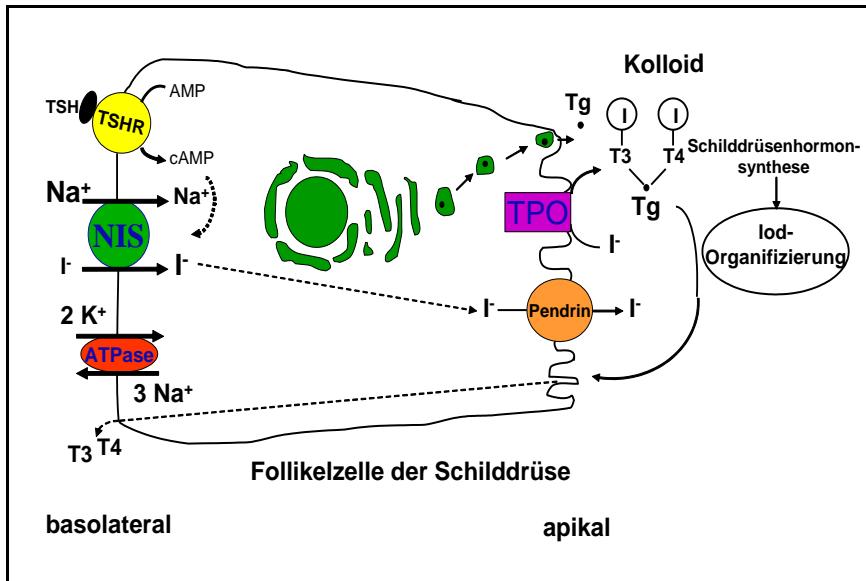
Daher ist die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze, wie gezielter gentherapeutischer Strategien, dringend erforderlich.

## 1.2 Der Natrium/Iodid-Syporter (NIS)

### 1.2.1 Funktion und Regulation

Die Schilddrüsenhormone Triiodthyronin ( $T_3$ ) und Thyroxin ( $T_4$ ) spielen im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle durch ihre Wirkung auf den Stoffwechsel nahezu aller Organsysteme und ihren Einfluss bei der Entwicklung des Nervensystems, wobei das durch die Nahrung aufgenommene Iod ein wichtiger Bestandteil der Schilddrüsenhormone ist. Der Mechanismus der Iod-Aufnahme in die Schilddrüse wurde in den letzten Jahrzehnten bereits ausführlich untersucht. Wir wissen heute, dass hierbei der Natrium/Iodid-Syporter (NIS) eine zentrale Rolle spielt, ein membranständiges Glykoprotein, welches nicht nur die Aufnahme des Iodids aus dem Blut ermöglicht, sondern in der Schilddrüse auch eine 20 - 40fache Anreicherung gegenüber der Konzentration im Blutplasma erlaubt. Im Rahmen des NIS-vermittelten Iod-Transports wird an der Basolateralmembran der Thyreozyten ein  $I^-$ -Ion gegen seinen elektrochemischen Gradienten über einen aktiven Transportmechanismus zusammen mit 2  $Na^+$ -Ionen in das Zellinnere transportiert. Die treibende Kraft stellt hierbei der Natriumgradient dar, welcher wiederum durch eine  $Na^+/K^+$ -ATPase aufrechterhalten wird (Carrasco N, 1993). Daraufhin werden die  $I^-$ -Ionen an der apikalen Seite der Zellen durch einen als Iod-Efflux bezeichneten Prozess in das Kolloid weitertransportiert. Hierbei scheinen sowohl der  $Cl^-/I^-$ -Transporter Pendrin (Scott *et al.*, 1999) als auch der später identifizierte AIT (apikaler Iodidtransporter) (Rodriguez *et al.*, 2002) eine Rolle zu spielen. An der Grenze zwischen apikaler Membran und Kolloid findet dann die von dem Enzym Thyreoperoxidase (TPO) katalysierte Organifizierung der Iodid-Ionen statt, womit die Oxidation des Iodids und die darauffolgende Koppelung an Tyrosylreste des Thyreoglobulins (Tg) bezeichnet wird. Durch Koppelung von Iodtyrosinresten werden  $T_3$  und  $T_4$  gebildet und an Tg gebunden im Schilddrüsenkolloid gespeichert, um bei Bedarf nach hydrolytischer Abspaltung ins Blut abgegeben zu werden (Carrasco N, 1993), (**siehe Abb. 1**).

Neben Iodid werden auch eine Reihe anderer Anionen, wie z.B.  $Br^-$ ,  $ClO_3^-$ ,  $SCN^-$ ,  $SeCN^-$ ,  $TcO_4^-$ ,  $ReO_4^-$ ,  $At^-$  oder  $NO_3^-$ , von NIS in die Thyreozyten transportiert (Carlin *et al.*, 2002; Dohan *et al.*, 2003a). Die Anionen Thiocyanat ( $SCN^-$ ) und Perchlorat ( $ClO_4^-$ ) stellen dabei potente kompetitive Inhibitoren des NIS-vermittelten Iod-Transportes dar (Wolf FJ, 1964).



**Abb. 1: Schematische Darstellung der Iod-Aufnahme und Organifizierung in Schilddrüsenzellen (aus: Spitzweg et al., 2001a).**

Die Regulation der NIS-Aktivität ist vielschichtig und schon seit Jahren Gegenstand verschiedenster Forschungsarbeiten.

Die Stimulation der Iod-Aufnahme via NIS in die Follikelzellen erfolgt vor allem über das Hormon TSH (Thyreоidea-stimulierendes Hormon), welches in der Adenohypophyse produziert wird (Vassart & Dumont, 1992). TSH bindet an seinen, an der basolateralen Membran der Thyreozyten lokalisierten Rezeptor und erhöht über eine Aktivierung des Adenylatzyklase-cAMP-Wegs die Expression von NIS-mRNA und NIS-Protein sowie die Iod-Akkumulation (Kogai et al., 1997; Weiss et al., 1984). Dies konnte in mehreren Versuchen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, in menschlichen sowie tierischen Schilddrüsen-Zelllinien nachgewiesen werden (Kogai et al., 1997 & 2000b; Levy et al., 1997; Saito et al., 1997). Ein TSH-Entzug führt hingegen gleichermaßen zu einem Rückgang des Iod-Uptakes und der intrazellulären cAMP-Konzentration (Weiss et al., 1984).

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass NIS eine Halbwertszeit von ca. 5 Tagen aufweist, die sich in Abwesenheit von TSH auf 3 Tage verkürzt (Riedel et al., 2001). In derselben Studie wurde gezeigt, dass TSH eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Phosphorylierung des NIS-Proteins spielt, welche für die Lokalisation von NIS in der Zelle und sein korrektes Targeting zur Zellmembran von Bedeutung ist. In Abwesenheit von TSH kommt es zu einer Umverteilung des membranständigen NIS in intrazelluläre Kompartimente, wodurch die Zelle die Fähigkeit zur Iod-Aufnahme aus dem Plasma verliert.

Neben TSH zeigt auch der autokrine Faktor Adenosin einen stimulierenden Effekt auf die NIS-Protein Expression und den Iod-Uptake in Ratten-Thyreozyten (Harii *et al.*, 1999).

Neben den oben angeführten Stimulanzien konnten auch eine Reihe von Inhibitoren der NIS-Expression und -Funktion identifiziert werden.

Schon 1923 war bekannt, dass hohe Plasma-Konzentrationen an Iod die Schilddrüsenfunktion hemmen (Plummer HS, 1923). 1948 wiesen Wolff und Chaikoff in einem *in vivo*-Versuch an Ratten die Blockade der Iod-Organifizierung bei Erreichen eines gewissen Grenzwertes des Iod-Blutgehalts nach, ein Effekt, der nach den beiden Erstbeschreibern „Wolff-Chaikoff-Effekt“ genannt wurde. In späteren Experimenten wurde entdeckt, dass nicht die Plasma-, sondern die intrathyreoidale Iod-Konzentration entscheidend für die Inhibition der Iod-Organifizierung und damit der Schilddrüsenhormonsynthese ist (Raben MS, 1949). Ausserdem kommt es im weiteren Verlauf zu einer Adaptation an den „Wolff-Chaikoff-Effekt“, d.h. die Organifizierung wird wieder in Gang gesetzt und die Hormonsynthese normalisiert sich (sogenannter „Escape vom Wolff-Chaikoff-Effekt“) (Braverman & Ingbar, 1963). Die Erklärung für dieses Phänomen scheint eine Suppression des Iod-Transports in die Zellen zu sein, woraufhin die daraus resultierende erniedrigte intrathyreoidale I<sup>-</sup>-Konzentration die Organifizierung wieder ankurbelt. Diese These wurde durch *in vivo*- und *in vitro*-Studien unterstützt, die zeigten, dass die Applikation von Iod eine Verminderung der NIS-mRNA- und Protein-Expression, und damit eine erniedrigte Iod-Akkumulation in der Schilddrüse bewirkt (Eng *et al.*, 1999; Spitzweg *et al.*, 1999b; Uyttersprot *et al.*, 1997). Ein Mangel an Iod hingegen führte in Ratten-Schilddrüsen zu einer erhöhten NIS-mRNA-Expression (Schröder-van der Elst *et al.*, 2001).

Zusätzlich wurde eine Reihe von Zytokinen untersucht, welche die NIS-Funktion in Thyreozyten modulieren. Diese Zytokine werden entweder von den Schilddrüsenzellen oder von eingewanderten Entzündungszellen gebildet, z.B. im Falle einer Thyreoiditis de Quervain (Ajjan *et al.*, 1998b). So konnten Spitzweg *et al.* (1999b) zeigen, dass TNF $\alpha$  die TSH-induzierte Expression von NIS-mRNA und den Iod-Uptake in FRTL-5 Zellen (Schilddrüsenzellen der Ratte) hemmt. Ein ähnlicher Effekt konnte in dieser Untersuchung mit den Interleukinen IL-6, IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erzielt werden. Auch TGF- $\beta$ , das Enzym Sphingomyelinase und IFN- $\gamma$  senkten die NIS-mRNA-Expression und den Iod-Uptake in FRTL-5 Zellen (Ajjan *et al.*, 1998b; Pekary *et al.*, 1997 & 1998). Diese Wirkung von IFN- $\gamma$  konnte auch *in vivo* an transgenen Mäusen, die in ihrer Schilddrüse IFN- $\gamma$  exprimieren, bestätigt werden: die Tiere litten an Wachstumsverzögerung und einem fast vollständigen

Funktionsverlust der Schilddrüse, der sich auf molekularer Ebene in einer supprimierten NIS-Expression und einem verminderten Iod-Uptake ausdrückte (Caturegli *et al.*, 2000).

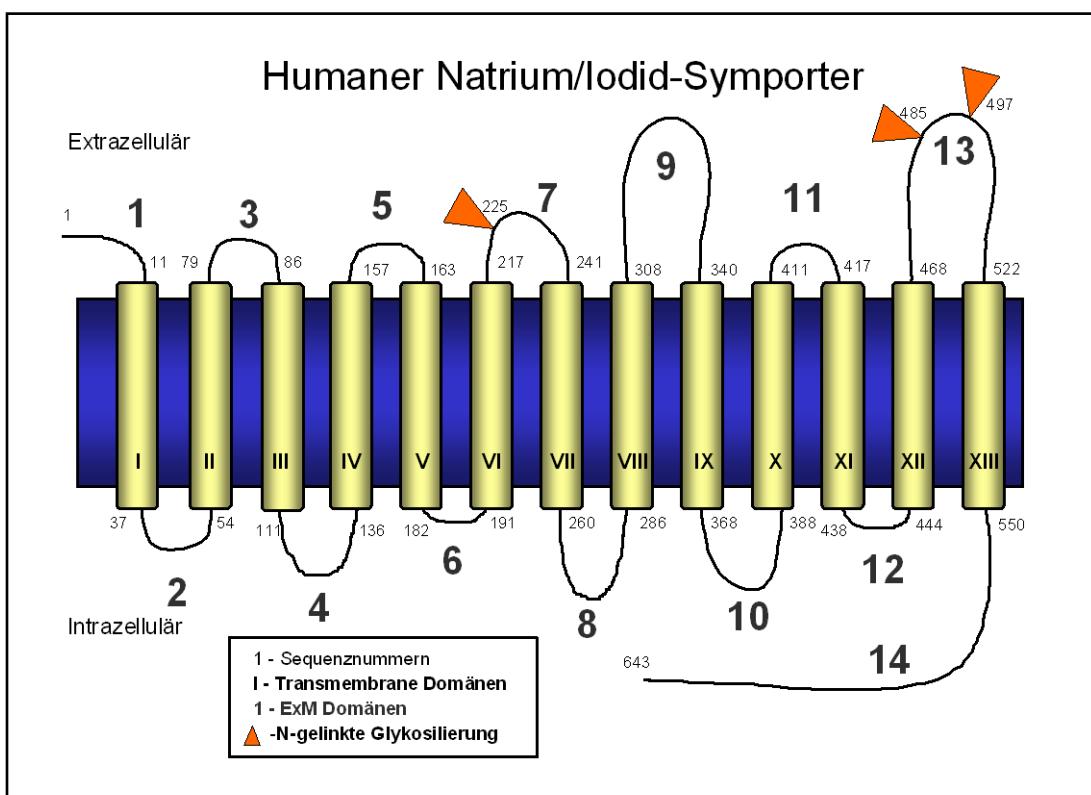
Zusätzlich inhibierte auch Thyreoglobulin (Tg) im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die NIS-Expression und Transkription schilddrüsenspezifischer Gene, z.B. der Schilddrüsenperoxidase (Kohn *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 1999).

Weiterhin konnte *in vitro* eine supprimierende Wirkung des Hormons T<sub>3</sub> sowie des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason auf Iod-Akkumulation und NIS-Expression in FRTL-5 Zellen gezeigt werden (Spitzweg *et al.*, 1999b).

Auch das Östrogen Estradiol bewirkte in der Schilddrüse eine Zunahme des Zellwachstums bei gleichzeitiger Abnahme der NIS-Expression (Furlanetto *et al.*, 1999), womit die erhöhte Strumaprävalenz bei Frauen erklärt werden könnte.

### **1.2.2 Molekulare Charakterisierung von NIS**

Der Klonierung der cDNA des NIS-Gens von Ratten (rNIS) in der Gruppe um Nancy Carrasco 1996 (Dai *et al.*, 1996) folgten die Identifizierung der cDNA des humanen NIS (Smanik *et al.*, 1996) und des Maus-NIS (Pinke *et al.*, 2001) sowie die Herstellung NIS-spezifischer Antikörper (Castro *et al.*, 1999a; Levy *et al.*, 1997). Dies ermöglichte die genaue molekulare Charakterisierung von NIS, bei dem es sich um ein aus 643 Aminosäuren bestehendes Glykoprotein handelt, dessen Genlokus sich auf Chromosom 19p13 befindet und welches - je nach dem Grad der Glykosilierung - eine molekulare Masse von 70-90 kDa aufweist (Smanik *et al.*, 1997). Es besteht aus 13 Transmembransegmenten, wobei der Amino-Terminus extrazellulär lokalisiert ist und der Carboxy-Terminus in Richtung des Cytosols weist (Levy *et al.*, 1998b), (**siehe Abb. 2**). rNIS hingegen besteht ebenso wie die NIS-cDNA von Mäusen aus lediglich 618 Aminosäuren (Dai *et al.*, 1996; Perron *et al.*, 2001), wobei eine grosse Homologie zum humanen NIS besteht (Pinke *et al.*, 2001).



**Abb. 2: Der Natrium-Iodid-Syporter, ein intrinsisches Membranprotein mit 13 transmembranösen und 14 extramembranösen Domänen (aus: Spitzweg *et al.*, 2001a).**

### 1.2.3 Extrathyreoidale Expression von NIS

Schon lange ist bekannt, dass auch andere Gewebe wie der Magen, die laktierende Mamma, Speichel- und Tränendrüsen zur Aufnahme von Iod aus dem Blutstrom fähig sind (Brown-Grant K, 1961). Nach Klonierung von NIS und Entwicklung spezifischer NIS-Antikörper konnte gezeigt werden, dass auch der extrathyreoidale Iod-Transport wahrscheinlich durch NIS vermittelt wird. So konnten Spitzweg *et al.* (1998) und Tazebay *et al.* (2000) die Expression von NIS in der laktierenden Mamma nachweisen, wodurch dem Neugeborenen das für die Entwicklung von Nervensystem, Muskeln und Lungen notwendige Iodid zur Schilddrüsenhormon-Synthese bereitgestellt wird (Carrasco N, 1993). Weiterhin wurde auch eine NIS-Expression in Speichel- und Tränendrüsen, Niere, Darmmukosa sowie Plazenta beobachtet, wobei die genaue Funktion von NIS in diesen Geweben zum Teil noch geklärt werden muss (Bidart *et al.*, 2000; Jhiang *et al.*, 1998; Spitzweg *et al.*, 1998 & 2001d).

## **1.2.4 NIS und benigne Schilddrüsenerkrankungen**

### **1.2.4.1 Schilddrüsenknoten**

Im normalen Schilddrüsengewebe lässt sich der basolateral lokalisierte NIS nur in einer Minderheit der Thyreozyten nachweisen, welche sich zumeist in unmittelbarer Nähe der Kapillaren befinden (Caillou *et al.*, 1998). Zu einer Steigerung sowohl der NIS-Expression als auch der Iod-Aufnahme kommt es jedoch nachweislich in den sogenannten „heissen Knoten“, die klinisch eine Hyperthyreose verursachen. Diese gesteigerte Iod-Akkumulation bildet auch die Grundlage zur Radioiodtherapie, auf welche in einem folgenden Abschnitt noch genauer eingegangen werden wird.

„Kalte Knoten“ weisen hingegen meist eine erniedrigte Expression von NIS auf (Joba *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 2001). Auch ein verminderter Einbau von NIS in die Zellmembran, d.h. ein defektes Zellmembran-Targeting, wird als pathophysiologisches Korrelat der nicht-funktionellen „kalten Knoten“ diskutiert (Tonacchera *et al.*, 2001).

### **1.2.4.2 Autoimmunerkrankungen**

Der Morbus Basedow ist eine Autoimmunerkrankung mit thyreoidalen und extrathyreoidalen Manifestationen. Hierbei führen stimulierende TSH-Rezeptor-Antikörper zu einer überschiessenden Produktion von Schilddrüsenhormonen. Saito *et al.* (1997) konnten eine durch die TSH-Rezeptor-Antikörper induzierte Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration nachweisen. Diese bewirkte wiederum eine bis auf das Vierfache erhöhte Expression von NIS-mRNA und -Protein mit daraus resultierendem gesteigertem Iod-Uptake. Wie im Falle der funktionellen autonomen Adenome ist auch beim Morbus Basedow aufgrund der stimulierten NIS-Expression die Behandlung mit  $^{131}\text{I}$  möglich.

Bei der Hashimoto-Thyreoiditis, einer weiteren Autoimmunerkrankung der Schilddrüse, zeigt sich hingegen eine Verminderung der NIS-Expression, die gut mit der bei dieser Erkrankung im chronischen Stadium meist vorliegenden Hypothyreose und der verminderten Radionuklidaufnahme im Rahmen einer Schilddrüsenszintigraphie korreliert (Caillou *et al.*, 1998; Spitzweg C, 2003a).

Weiterhin konnten in Seren von Patienten mit autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen nicht nur die jeweils bereits bekannten Auto-Antikörper gegen den TSH-Rezeptor, Tg oder TPO nachgewiesen werden, sondern auch Antikörper gegen das NIS-Protein (Ajjan *et al.*, 2000; Endo *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 1997). In mehreren Studien wurde ein hemmender Effekt dieser NIS-Antikörper auf die Iod-Akkumulation in NIS-transfizierten Zellen nachgewiesen

(Ajjan *et al.*, 1998a & 2000; Endo *et al.*, 1996). Die genaue Bedeutung von NIS als Auto-Antigen bleibt allerdings noch in weiterführenden Studien zu untersuchen.

#### 1.2.4.3 Kongenitaler Iodtransportdefekt (ITD)

Der autosomal-rezessiv vererbte kongenitale Iodtransportdefekt äussert sich klinisch in einer latenten oder auch manifesten Hypothyreose, einer Struma, einer erniedrigten Speichel/Plasma-Iod-Ratio und einer verminderten Iod-Akkumulation in der Schilddrüse (Stanbury & Dumont, 1983). Pathophysiologisch resultiert der Iodtransportdefekt in einer verminderten Iod-Aufnahme und damit in einer Herabsetzung der Schilddrüsenhormon-Synthese.

Bisher konnten zahlreiche verschiedene Mutationen des NIS-Gens als Grundlage kongenitaler Iodtransportdefekte identifiziert werden (De la Vieja *et al.*, 2004; Dohan *et al.*, 2003b; Szinnai *et al.*, 2006). Einige dieser durch einen Basenpaaraustausch entstandenen Mutationen wurden bisher auch auf molekularer Ebene näher untersucht. So gibt z.B. bei der T354P Mutation eine fehlende Hydroxylgruppe den Ausschlag zum Funktionsverlust (Levy *et al.*, 1998a), während die G395R Mutation zum Austausch einer kurzen gegen eine lange Seitenkette führt, was wiederum die NIS-Aktivität herabsetzt (Dohan *et al.*, 2002). Bei der Q267E Mutation wurde zunächst von einem fehlerhaften Zellmembran-Targetings des NIS-Proteins ausgegangen (Pohlenz *et al.*, 2000). In einer neueren Studie konnte diese Annahme allerdings widerlegt werden, es zeigte sich, dass eine erniedrigte maximale Umsatzgeschwindigkeit für die Funktionsminderung verantwortlich ist (De la Vieja *et al.*, 2004).

#### 1.2.5 NIS und maligne Schilddrüsenerkrankungen

Die Expression von NIS in den Zellen differenzierter papillärer oder folliculärer Schilddrüsenkarzinome bildet die Grundlage einer seit Jahrzehnten etablierten, effektiven Tumortherapie. So macht man sich die NIS-Expression des Tumorgewebes und seiner Metastasen bereits bei der diagnostischen GanzkörperSzintigraphie mit  $^{131}\text{I}$  zu Nutze. Darüberhinaus ermöglicht die NIS-vermittelte Iod-Aufnahmekaktivität nach operativer totaler Thyreoidektomie eine postoperative Radionuklidtherapie mit  $^{131}\text{I}$ , wodurch eine Elimination von vorhandenem Karzinom-Restgewebe sowie eventuell vorhandener Metastasen möglich ist. Durch diese Therapieoption wird die Prognose des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms mit einer 10-Jahres-Überlebensrate um die 90 % entscheidend verbessert (Mazzaferri & Jhiang, 1994; Mazzaferri & Kloos, 2001).

Dennoch lässt sich in den meisten Schilddrüsenkarzinomen eine im Vergleich zu gesundem Gewebe verminderte Iod-Aufnahmefähigkeit der Tumorzellen nachweisen.

Untersuchungen der NIS-Expression auf RNA-Ebene mittels PCR und/oder Northern-Blot-Analyse zeigten dabei in einem Grossteil der Schilddrüsenkarzinome eine deutlich verminderte oder sogar fehlende NIS-RNA-Expression (Arturi *et al.*, 1998; Lazar *et al.*, 1999; Smanik *et al.*, 1996). Zusätzlich wurde eine Assoziation zwischen höheren Tumorstadien und niedrigeren NIS-Expressionsniveaus beobachtet (Lazar *et al.*, 1999). Park und Kollegen berichteten ähnliche Ergebnisse, konnten aber zusätzlich zeigen, dass von der NIS-RNA-Expression des Primärtumors keine Rückschlüsse auf die Ausprägung der Expression in den entsprechenden Lymphknotenmetastasen gezogen werden können (Park *et al.*, 2000).

Im Zuge der Etablierung polyklonaler und monoklonaler Antikörper war im weiteren Verlauf die Möglichkeit gegeben, die Expression von NIS auch auf Proteinebene zu untersuchen. Auch hierbei zeigte sich in den Studien verschiedener Arbeitsgruppen in der Regel eine erniedrigte oder fehlende Expression des NIS-Proteins in Schilddrüsenkarzinomen (Castro *et al.*, 1999b; Jhiang *et al.*, 1998 & 2000; Spitzweg C, 2003a). Bemerkenswerterweise ging eine verminderte NIS-Expression in der Regel mit einer ebenfalls erniedrigten Expression des TSH-Rezeptors in den Zellen einher. Aufgrund der bekanntmassen stimulierenden Wirkung von TSH auf die NIS-Expression könnte die verminderte TSH-Rezeptorexpression mitverantwortlich für die Abnahme des NIS-Proteins in Karzinomzellen sein (Spitzweg C, 2003a).

Im Gegensatz dazu konnten Saito *et al.* in 7 von insgesamt 17 untersuchten papillären Schilddrüsenkarzinomen (ca. 41 %) eine signifikant gesteigerte Expression von NIS nachweisen (Saito *et al.*, 1998). 2001 zeigten Dohan *et al.*, dass zwar ca. 70 % ihrer untersuchten Schilddrüsenkarzinom-Gewebeproben eine erhöhte Expression von NIS aufwiesen, die jedoch überwiegend intrazellulär nachzuweisen war, was aufgrund des defekten Membran-Targeting von NIS die verminderte Iod-Aufnahme in Schilddrüsenkarzinomen trotz erhöhter NIS-Expressionsniveaus erklärt.

Um die verminderte Radioiod-Aufnahme aufgrund reduzierter NIS-Expression und/oder fehlerhaftem Membran-Targeting von NIS zu kompensieren, macht man sich in der Praxis insbesondere im Hinblick auf die Therapie mit  $^{131}\text{I}$  die TSH-Stimulation von NIS zunutze. Um die NIS-vermittelte Radioiod-Akkumulation in Schilddrüsenkarzinomen und Metastasen für diagnostische und therapeutische Zwecke zu steigern, wird hierbei eine endogene TSH-Stimulation durch Induktion einer Hypothyreose nach Absetzen der

Schilddrüsenhormonsubstitution oder eine exogene TSH-Stimulation durch die Applikation von rekombinantem humanem TSH durchgeführt (Spitzweg C, 2007a).

In etwa 30 % der Fälle führt jedoch die Abnahme der Tumorzellendifferenzierung zu einem Verlust der Radioiod-Akkumulationsfähigkeit (als Folge einer verminderten NIS-Expression) und TSH-Regulation (aufgrund einer verminderten TSH-Rezeptor-Expression), was die therapeutische Effizienz der Radioiodtherapie einschränkt und die Prognose signifikant verschlechtert. Daher wurden in den letzten Jahren verschiedene Ansätze zur Redifferenzierung untersucht, mit dem Ziel die Radioiod-Aufnahmekapazität im Tumor wiederherzustellen. Die Behandlung mit Retinoiden zeigte dabei erfolgversprechende Ergebnisse in präklinischen Untersuchungen. Die verminderte Iod-Akkumulation in Schilddrüsenkarzinomzellen konnte in *in vitro*-Versuchen durch Applikation von Retinsäure gesteigert werden. Interessanterweise führte Retinsäure dabei gleichzeitig in gesunden Schilddrüsenzellen zu einer Verminderung der Expression des NIS-Proteins (Schmutzler *et al.*, 1997). Hierdurch könnte möglicherweise der Effekt der Radioiodtherapie durch eine gezielte Verbesserung der  $^{131}\text{I}$ -Aufnahme in die Karzinomzellen bei gleichzeitig erniedrigter Akkumulation im gesunden Gewebe noch gesteigert werden.

Diese erfolgsversprechenden *in vitro*-Ergebnisse mit Retinoiden liessen sich in den bisher durchgeführten klinischen Studien jedoch nur unzureichend bestätigen (Courbon *et al.*, 2006; Grüning *et al.*, 2003; Simon *et al.*, 2002).

Neueren Studien zufolge scheint jedoch die Redifferenzierungs-Therapie mit PPAR $\gamma$ -Agonisten, beispielsweise Rosiglitazone, vielversprechender zu sein. In einer klinischen Phase II-Studie liess sich in etwa 40-50 % der Schilddrüsenkarzinom-Patienten durch die orale Applikation von Rosiglitazone über 2 Monate eine Radioiod-Aufnahme induzieren (Kebebew *et al.*, 2006).

## 1.2.6 NIS und Mammakarzinom

Die bereits weiter oben erwähnte Fähigkeit der laktierenden Mamma zur Aufnahme von Iod aus dem Blutstrom konnte auch für Karzinomzellen der Brustdrüse nachgewiesen werden. So konnten Tazebay *et al.* die Expression von funktionell aktivem NIS in Mammakarzinomen transgener Mäuse per Szintigraphie und Immunoblot nachweisen. Darüberhinaus zeigte sich mittels Immunhistochemie in mehr als 80 % untersuchter humaner Mammakarzinom-Gewebe eine Expression von NIS (Tazebay *et al.*, 2000; Wapnir *et al.*, 2003). Auffallend war dabei der Verlust der basolateralen Orientierung der NIS-Protein-Expression in den

Alveolarepithelzellen in malignem Brustdrüsengewebe, wo NIS-Protein sowohl an der Plasmamembran als auch intrazellulär lokalisiert ist. Diese Ergebnisse konnten in einer Untersuchung von Rudnicka *et al.* (2003) bestätigt werden, die mittels Immunhistochemie in 45 von insgesamt 50 Gewebeproben invasiv duktaler Mammakarzinome eine NIS-Protein-Expression nachweisen konnten. Die hohe Prävalenz der NIS-Expression in humanem Brustdrüsenerkarzinomgewebe legt eine mögliche Rolle von NIS als neuem diagnostischem Marker beim Mammakarzinom nahe.

In diesem Zusammenhang liess sich in 5 von 25 Patientinnen mit Mammakarzinomen eine Akkumulation von  $^{99m}$ Tc-Pertechnetat im Tumor nachweisen, wobei Mammakarzinome mit positivem  $^{99m}$ Tc-Pertechnetat-Scan auch höhere NIS-Expressionsniveaus aufwiesen (Moon *et al.*, 2001). Hierdurch eröffnet sich – in Anlehnung an die diagnostische und therapeutische Anwendung von Radioiod beim Schilddrüsenkarzinom – die Perspektive für ein vergleichbares Potential von Radioiod beim Mammakarzinom. 2004 konnte im Rahmen einer klinischen Pilotstudie in NIS-positiven Mammakarzinom-Metastasen nach Suppression der thyreoidalen NIS-Expression durch  $T_3 \pm$  Methimazol eine Akkumulation von  $^{123}$ I bzw.  $^{99m}$ Tc-Pertechnat *in vivo* nachgewiesen werden, die aufgrund der dosimetrischen Berechnungen einen therapeutischen Effekt von  $^{131}$ I erwarten lässt (Wapnir *et al.*, 2004). Des Weiteren gelang Dadachova und Kollegen in einem transgenen Mammakarzinom-Mausmodell der Nachweis einer signifikanten Radioiod-Aufnahme im Mammakarzinomgewebe, wobei nach Applikation einer therapeutischen  $^{131}$ I-Aktivität eine Verlangsamung des Tumorwachstums erzielt werden konnte. Damit wurde erstmals, zumindestens im Mausmodell, gezeigt, dass das Ausmaß endogener NIS-Expression in Mammakarzinomen für einen therapeutischen Effekt von  $^{131}$ I ausreichen kann (Dadachova *et al.*, 2005).

Kogai und Kollegen zeigten im Jahr 2000, dass sich in einer Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom-Zelllinie (MCF-7) durch die Behandlung mit *all-trans*-Retinsäure die Expression von funktionell aktivem NIS mit konsekutivem selektiv zytotoxischem Effekt von  $^{131}$ I induzieren lässt. Kürzlich wurden diese Beobachtungen auch *in vivo* im Mausmodell bestätigt (Kogai *et al.*, 2000a & 2004).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich diese durch *all-trans*-Retinsäure induzierte Iod-Aufnahmefähigkeit in Mammakarzinomzellen (MCF-7) und der daraus resultierende therapeutische Effekt von  $^{131}$ I durch die Kombination mit Dexamethason signifikant steigern lässt (Unterholzner *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurden diese Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe *in vivo* in Mammakarzinom-Xenotransplantaten bestätigt, wobei sich

nach systemischer Behandlung mit *all-trans*-Retinsäure und Dexamethason eine signifikante Akkumulation von  $^{123}\text{I}$  induzieren liess (Willhauck *et al.*, 2007a).

Zusammenfassend lässt der Nachweis von funktionell aktivem NIS in der Brustdrüse in Anlehnung an die Radioiodtherapie beim Schilddrüsenkarzinom an ein vergleichbares Potential von Radioiod bei der Behandlung des Mammakarzinoms denken. Ausserdem könnte NIS aufgrund seiner hohen Expressionsrate in malignem Brustdrüsengewebe auch eine wichtige Rolle als neuer diagnostischer Tumormarker spielen.

### **1.2.7 NIS als neues therapeutisches Gen**

#### **1.2.7.1 Grundlagen der NIS-Gentherapie**

Die Klonierung und Charakterisierung des NIS-Gens führte in den letzten Jahren zur Entwicklung eines neuen zytoreduktiven Gentherapie-Ansatzes, basierend auf einer gezielten Expression von funktionell aktivem NIS in extrathyreoidalen Tumoren via Gentransfer. Die dadurch neu erworbene Fähigkeit der Tumorzellen zur Iod-Akkumulation ermöglicht nicht nur das nicht-invasive Imaging der NIS-Genexpression via  $^{124}\text{I}$ -PET-Imaging oder  $^{123}\text{I}$ - bzw.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Szintigraphie, sondern auch die gezielte Tumortherapie durch die Applikation von  $^{131}\text{I}$ . Die Vorteile dieser innovativen Therapieoption entsprechen denen der schon seit 60 Jahren etablierten Radioiodtherapie beim Schilddrüsenkarzinom: Zum einen werden ausser einer vorübergehenden leichten Entzündung der Speicheldrüsen kaum Nebenwirkungen beschrieben. Weiterhin wird durch die gezielte Aufnahme des Radionuklids in die Tumorzellen die toxische Wirkung auf den Rest des Körpers minimiert – ganz im Gegensatz zu einer systemischen Chemotherapie.

Der gleichzeitige Schutz der ebenfalls Iod speichernden Schilddrüse wird durch die orale Vorbehandlung mit  $\text{T}_3$  gewährleistet, wodurch die TSH-regulierte NIS-Expression in der Schilddrüse vermindert wird (Wapnir *et al.*, 2004). In mehreren *in vitro* und *in vivo* Experimenten konnte die Durchführbarkeit und Effizienz dieses neuen Therapiekonzeptes bereits eindrucksvoll bewiesen werden, wie ein späteres Kapitel ausführlich darstellen wird (Dingli *et al.*, 2003a-c; Mazzaferri & Robyn, 1996; Spitzweg *et al.*, 2001b,c & 2002).

#### **1.2.7.2 Verwendung gewebespezifischer Promotoren**

Um eine selektive Expression des NIS-Gens im Zielgewebe zu erreichen und somit die Toxizität von  $^{131}\text{I}$  auf andere Organe so gering wie möglich zu halten, kann der NIS-

Gentransfer unter Verwendung eines gewebespezifischen Promoters durchgeführt werden, um damit ein transkriptionelles Targeting zu erreichen.

Spitzweg *et al.* (1999a & 2001b) konnten mit dieser Methode unter Verwendung des Prostata-spezifischen PSA-Promoters erstmalig in einer humanen Prostatakarzinom-Zelllinie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Prostata-selektive therapeutisch wirksame Akkumulation von  $^{131}\text{I}$  induzieren.

Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten gewebespezifischen Promoter handelt es sich um den Promoter für das ACTH-Rezeptor-Gen, der 1997 von Naville *et al.* charakterisiert wurde. Durch die Bindung des Hormons ACTH (Adrenocorticotropin) an seinen Rezeptor wird in der Nebennierenrinde die Produktion der lebensnotwendigen Mineralo- und Glukokortikoide induziert (Saez *et al.*, 1981).

### **1.3 Grundlagen und Ziele der Arbeit**

In den letzten Jahren kristallisierte sich zunehmend das enorme Potential von NIS als neuem diagnostischem und therapeutischem Gen in der molekularen Onkologie heraus. Hierbei stehen insbesondere die Möglichkeit einer gewebespezifischen Expression von NIS mittels transkriptionellem Targeting und die damit erreichbare selektive Behandlung mit  $^{131}\text{I}$  im Mittelpunkt. Aufgrund des Mangels an kurativen Therapiemöglichkeiten beim primären Nebennierenrindenkarzinom stellt dieses aus unserer Sicht ein ideales Tumormodell zur Entwicklung eines neuen NIS-basierten Gentherapieansatzes dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, durch einen ACTH-Rezeptor Promoter-gesteuerten Gentransfer eine gewebespezifische Expression von NIS in der murinen Nebennierenrindenkarzinom-Zelllinie Y-1 zu induzieren. Anschliessend wurde die Gewebespezifität des NIS-Gentransfers sowie die Expression von NIS mit Hilfe von Northern- und Western-Blot sowie Immunzytologie untersucht. Schliesslich wurde *in vitro* in einem Clonogenic Assay der therapeutische Effekt von  $^{131}\text{I}$  in Nebennierenrindenkarzinom-Zellen nach ACTH-Rezeptor Promoter gesteuertem NIS-Gentransfer untersucht.

Die Grundlage für diese Studie lieferte die Zusammenarbeit des Labors von PD Dr. C. Spitzweg der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern der LMU München mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. John C. Morris am Department of Endocrinology an der Mayo-Clinic in Rochester/Minnesota/USA und dem Labor von Prof. Dr. Felix Beuschlein der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU München.

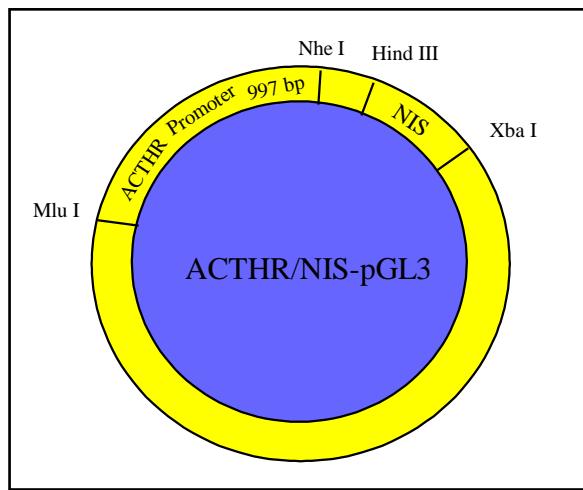
## 2 MATERIAL UND METHODEN

Alle Versuche wurden im Labor von Frau PD Dr. C. Spitzweg in der II. Medizinischen Klinik des Klinikums Großhadern durchgeführt. Bezugsquellen sind in Klammern angegeben.

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Herstellung eines Expressionsplasmids

Die full-length NIS-cDNA wurde über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *XbaI* (Roche, Penzberg, Deutschland) aus dem CMV-NIS-pcDNA3 Expressionsplasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. S. M. Jhiang, Ohio State University, Columbus, OH, USA) ausgeschnitten, aufgereinigt und in den pGL3-Vektor ligiert (Clontech, Heidelberg, Deutschland).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des NIS-Expressionsvektors ACTHR/NIS-pGL3 unter Verwendung des ACTH-Rezeptor Promoters.**

Aus dem pGL3-Vektor war zuvor, ebenfalls mit Hilfe der Enzyme *HindIII* und *XbaI*, die Luciferase-cDNA (1700 bp) herausgeschnitten worden. Nach einem Restriktionsverdau des NIS-cDNA enthaltenden pGL3-Vektors (NIS-pGL3) mit *MluI* und *NheI* (Roche) wurde das ACTH-Rezeptor Promoter-Fragment (997 bp) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Felix Beuschlein, Innenstadtklinikum der LMU München, Deutschland) in NIS-pGL3 hineinligiert. An den ACTH-Rezeptor Promoter waren zuvor mittels

Polymerasekettenreaktion (PCR)-Amplifikation die benötigten Schnittstellen für *MluI* und *NheI* angehängt worden.

Der resultierende Expressionsvektor ACTHR/NIS-pGL3 (**siehe Abb. 3**) wurde aufgereinigt und mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

Die Herstellung eines Kontrollvektors, welcher nur die cDNA des ACTH-Rezeptor Promoter-Fragmentes ohne die NIS-cDNA enthielt, erfolgte nach dem gleichen Prinzip (ACTHR-pGL3).

### **2.1.2 Spaltung mit Endonukleasen**

Doppelsträngige DNA wurde wie bereits oben erwähnt mit Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch gespalten. Dieser Restriktionsverdau erfolgte jeweils unter Einhaltung der vom Hersteller (Roche) empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen. Bei Verdau der DNA-Probe mit mehreren Enzymen wurde jeweils der Puffer gewählt, in dem jedes der Enzyme eine möglichst hohe Aktivität aufwies. Pro 1 µg zu schneidender DNA wurden 1 bis 2 Einheiten Enzym in 200 µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug bei 37 °C mindestens 3 h, in den meisten Fällen wurde jedoch über Nacht inkubiert. Der Erfolg des enzymatischen Verdaus wurde jeweils anhand einer gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente kontrolliert.

### **2.1.3 Agarosegelelektrophorese**

Das Agarosegel zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde aus 0,7 g Agarose (Life Technologies, Bochum, Deutschland) und 100 ml 1 x TBE-Puffer sowie 6 µl Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Die DNA-Proben wurden mit jeweils 2 µl Loading Buffer (10 x Blue Juice Gel Loading Buffer, Invitrogen, Karlsruhe) ebenso wie 6-8 µl einer DNA-Leiter (Ready Load 1 Kb DNA Ladder, Invitrogen) auf das Gel zur elektrophoretischen Trennung aufgetragen (1 h bei 68 Volt). Danach wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert und die DNA-Fragmente anhand des mitgelaufenen Markers nach Anzahl ihrer Basenpaare identifiziert.

### **2.1.4 Gelextraktion**

Die Gelextraktion erfolgte unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction“-Protokolls (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dabei wurden zuerst die zu isolierenden DNA-Fragmente nach Auftrennung und Identifizierung mittels Gelelektrophorese mit einem scharfen Skalpell

aus dem Gel herausgetrennt. Dann wurde dem Gelstück zuerst die 3fache Menge seines Gewichts an QG-Puffer (Qiagen) hinzugefügt und die entstandene Mischung für mindestens 10 min unter wiederholtem vorsichtigem Mischen bei 50 °C inkubiert, bis sich das Gel vollständig im Puffer gelöst hatte. Im Anschluss daran wurde die dem Gel-Gewicht entsprechende Menge an Isopropanol (Merck) hinzugefügt und die Flüssigkeit in die bereitgestellte QIAquick Spin Aufreinigungssäule (Qiagen) überführt, für 1 min bei Maximalgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Nach Hinzupipettieren von weiteren 500 µl QG-Puffer (Qiagen) wurde erneut zentrifugiert und verworfen, gefolgt von zwei weiteren Zentrifugationen mit je 750 µl PE-Puffer (Qiagen), um alle Ethidiumbromidreste gründlich zu entfernen. Dann wurde die Säule für 2 min bei Maximalgeschwindigkeit trocken zentrifugiert und in ein neues, steriles Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>O (pH 8) wurde erneut für 10 min inkubiert und im Anschluss daran noch einmal 2 min bei Maximalgeschwindigkeit zentrifugiert. In dem Eluat befanden sich die zu isolierenden DNA-Fragmente.

### **2.1.5 Ligation**

Die full-length NIS-cDNA sowie die ACTH-Rezeptor Promoter-cDNA wurden im Rahmen zweier Ligationen in den pGL3-Expressionsvektor ligiert. Das molare Verhältnis von Insert- zu Vektor-DNA betrug je nach Versuchsansatz 1:1, 3:1 und 10:1. Die Reaktion fand in 20 µl Gesamtvolumen in DNase freiem H<sub>2</sub>O nach Zugabe von insgesamt 100 ng Vektor- und Insert-DNA und 1 Einheit T4-Ligase (Rapid DNA Ligation Kit, Roche) während einer 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur statt. Der Ligationsansatz wurde danach direkt zur Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien benutzt.

### **2.1.6 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA**

Vektor-DNA wurde nach dem „MAX Efficiency DH5α™ Competent Cells“-Protokoll (Life Technologies) im Rahmen einer Transformation in kompetente *E. coli* Bakterien (Life Technologies) transferiert und vermehrt. Dabei wurden jeweils 100 µl Bakterien und 5 ng verdünnte Plasmid-DNA in einem vorgekühlten Propylen-Reagenzröhrchen gemischt, 30 min auf Eis und im Anschluss daran für 45 sec bei 42 °C inkubiert. Nach Inkubation für 2 min auf Eis wurden 900 µl SOC-Medium (Invitrogen) zu den Bakterien gegeben und diese für 1 h bei 225 U und Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss daran folgte das Ausplatieren der Bakterien in verschiedenen Verdünnungsstufen (1:1, 1:10, 1:100) auf LB (QBIogene,

Heidelberg, Deutschland)/Ampicillin(Sigma)-Platten, welche dann bei 37 °C über Nacht inkubiert wurden.

### **2.1.7 DNA-Minipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA**

Die Minipräparationen wurden unter Verwendung des „QIAprep Spin Miniprep-Kits“ (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Dabei wurde zunächst eine mit dem gewünschten Plasmid transformierte und über Nacht gewachsene Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium und 12,5 µl Ampicillin gelöst und für 8 h bei 225 U und 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden 2 ml der Bakteriensuspension bei 6000 U für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl P1-Puffer (Qiagen) resuspendiert. Nach Zugabe von weiteren 250 µl P2-Puffer (Qiagen) und vorsichtigem Mischen wurde für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 350 µl N3-Puffer (Qiagen) hinzugefügt und erneut gemischt wurde. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 13.000 U, in welcher die in den vorherigen Schritten lysierten Bakterien abgetrennt wurden, wurde der die DNA enthaltende Überstand in eine QIA-Prep-Säule (Qiagen) transferiert. Nach einer 60sekündigen Trockenzentrifugation wurde die Säule noch zweimal für je 1 min zentrifugiert, zuerst nach Zugabe von 500 µl PB-Puffer (Qiagen) und danach nach Zugabe von 750 µl PE-Puffer (Qiagen). Diese Schritte dienten der Reinigung der Plasmid-DNA von Endonukleasen und Salzen. Einer erneuten Trockenzentrifugation folgte daraufhin die Überführung der Säule in ein neues steriles Reaktionsgefäß und der Zusatz von 50 µl EB-Puffer (Qiagen). Nach einer 10minütigen Inkubationszeit, in welcher die Plasmid-DNA durch den Puffer aus dem Filter herausgelöst wurde, erfolgte eine 2minütige Abzentrifugation. Die erbeutete Plasmid-DNA wurde durch mehrfache diagnostische Restriktionsverdau mit anschliessender Gelelektrophorese auf ihre Korrektheit hin überprüft. Nach der nachgewiesenen erfolgreichen Transformation wurde das Plasmid in einer DNA-Maxipräparation in grösserer Menge isoliert.

### **2.1.8 DNA-Maxipräparationen zur Isolierung von Plasmid-DNA**

Die DNA-Maxipräparationen wurden unter Verwendung des „EndoFree Plasmid Maxi-Kits“ (Qiagen) durchgeführt. Dafür wurden 2 ml der bereits für die Minipräparation verwendeten Bakteriensuspension in 100 ml LB-Medium unter Zusatz von 250 µl Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt (225 U). Die Bakteriensuspension wurde danach bei 4 °C und 3000 U (= 6000 g) für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das

geerntete bakterielle Pellet in 10 ml P1-Puffer (Qiagen) unter Zusatz von 10 µl RNase A (Qiagen) gründlich resuspendiert. Im Anschluss an die Zugabe von 10 ml P2-Puffer (Qiagen) erfolgte eine 5minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurden 10 ml eiskalter P3-Puffer (Qiagen) zu der Suspension gegeben, sofort vorsichtig gemischt und das Reaktionsgefäß für 20 min auf Eis gestellt, wodurch die Präzipitation von unerwünschter genomicscher Bakterien-DNA, denaturierten Proteinen sowie Resten der Bakterienzellwand verstärkt wurde. Durch eine folgende Zentrifugation für 30 min bei 11.000 U (= 20 000 g) und 4 °C wurde die im Überstand gelöste Plasmid-DNA vom Präzipitat abgetrennt. Nach Überführung dieses Überstandes in ein neues sterilisiertes Reaktionsgefäß wurde die Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen für 15 min wiederholt. Währenddessen wurde eine Qiagen Tip 500-Säule (Qiagen) mit 10 ml QBT-Puffer (Qiagen) äquilibriert. Dann wurde der durch die Zentrifugation erhaltene klare Überstand über die Säule gefiltert und diese im Anschluss daran zweimal mit je 30 ml QC-Puffer (Qiagen) gewaschen, um die Kontamination der Plasmid-DNA zu reduzieren. Durch 15 ml des Elutions-Puffers QT (Qiagen) wurde im Folgenden die superhelikale Plasmid-DNA herausgewaschen und mit 10,5 ml Isopropanol (Merck) bei Raumtemperatur gefällt. Nach Abzentrifugation des Präzipitats für 30 min bei 11.000 U (= 20.000 g) und 4 °C und dem Waschen des Pellets mit 5 ml 70%igem RNase freiem Ethanol wurde erneut für 10 min zentrifugiert (4 °C, 11.000 U). Die erhaltene isolierte DNA wurde nach Verwerfen des Überstandes für ca. 10 min unter dem Abzug getrocknet und in ca. 150 µl H<sub>2</sub>O (pH 8) aufgenommen. Im Anschluss wurde eine erneute Überprüfung des Plasmids mit Hilfe eines diagnostischen Restriktionsverdaus und folgender Gelelektrophorese vorgenommen.

## 2.1.9 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde unter Verwendung des „Expand High Fidelity PCR Systems“ (Roche) durchgeführt.

Zu Beginn wurden 0,5 µl der ACTHR Promoter-cDNA mit 10 mM dNTPs (Roche), 0,75 µl der High Fidelity Taq-Polymerase (Roche), 5 µl 10 x Puffer (Roche) sowie jeweils 50 pmol Sense- und Antisense-Primer (Thermo BioSciences, Ulm, Deutschland) vorsichtig gemischt und mit H<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 50 µl aufgenommen. Die Bedingungen für die PCR wurden Primer-abhängig optimiert. Die Denaturierung der DNA erfolgte zuerst für 6 und dann für 1 min bei 94 °C, im Anschluss fand die Anlagerung der Primer bei 60 °C für 2 min statt. Danach erfolgte für 3 min bei 72 °C die DNA-Synthese. Diese Zyklen wurden 35mal wiederholt. Zum Abschluss erfolgte eine Endsynthese für 10 min bei 72 °C. Die PCR-

Produkte konnten einige Stunden bei 4 °C oder langfristig bei -20 °C gelagert werden, bevor sie mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert wurden.

### **2.1.10 DNA-Sequenzierung**

Vor Durchführung der Transfektion wurde der korrekte Aufbau des hergestellten Plasmids durch eine DNA-Sequenzierung nochmals bestätigt. Diese Sequenzierung erfolgte bei der Firma „Medigenomix“ in München, Deutschland.

## **2.2 Zellkultur und Zelllinie**

### **2.2.1 Verwendete Zelllinie**

Bei den in dieser *in vitro* Versuchsreihe verwendeten Zellen handelt es sich um die murine Nebennierenrindenkarzinom-Zelllinie Y-1 (American Type Culture Collection-ATCC, Manassas, VA, USA). Diese adhärenten, epithelialen Zellen produzieren Steroidhormone, deren Sekretion durch ACTH stimulierbar ist (ATCC-Nr. CCL-79).

### **2.2.2 Medium und Zellkulturbedingungen**

Alle Zellkultur-Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen und unter Verwendung von sterilen Materialien, Geräten, Lösungen und Medien. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und unter Anreicherung der Luft mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

Die Y-1 Zellen wurden in 175 cm<sup>2</sup> bzw. 75 cm<sup>2</sup> Flaschen mit 25 ml bzw. 12 ml Medium bei 70%iger Konfluenz kultiviert. Als Medium wurde DMEM-(high glucose)-Medium (GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) - supplementiert mit 2,5 % fetalem Kälberserum (Invitrogen), 7,5 % Pferdeserum und 0,85 % Penicillin/Streptomycin (Gibco) - verwendet. Dem Medium der stabil transfizierten Y-1 Klone wurde noch das Selektivantibiotikum Puromycin in einer Konzentration von 6 µg/ml beigegeben. Das Medium wurde jeden 2.- 3. Tag gewechselt oder die Zellen bei mehr als 70 % Konfluenz wie folgt passagiert.

Im Falle der Y-1 Zellen wurde zuerst das Kulturmedium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 5 ml hinzugefügtem 1 x PBS-Puffer durch vorsichtiges Hin- und Herwenden der Flasche gewaschen. Danach wurde der Puffer wieder abgesaugt, die Zellen mit 1-2 ml 0,5 g Trypsin/0,2 g EDTA (Life Technologies, Inc., Karlsruhe, Deutschland)

benetzt und für 1 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Trypsin abgesaugt und - nach weiteren 2 min Inkubation bei Raumtemperatur – die vollständig vom Untergrund abgelösten Zellen mit 10 ml frischem Medium vom Flaschenboden abgewaschen. Nachdem durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren eine gleichmässige Zellsuspension erhalten worden war, wurden die gelösten Zellen entweder auf neue Zellkulturflaschen verteilt oder für die verschiedenen Experimente in 6-Well Platten mit der erforderlichen Zellzahl unter Zuhilfenahme einer Neubauer-Zählkammer ausgesät.

Im Falle der stabil transfizierten Klone wurde anstelle des Trypsins 5 ml der schonenderen Accutase (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland) hinzugegeben und die Zellen für 10 min im Brutschrank inkubiert. Dann wurde der noch nicht in der Accutase gelöste Zellanteil mit weiteren 10 ml Medium vom Flaschenboden abgewaschen und die gesamte Zellsuspension 5 min lang bei 1200 U zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde mit frischem Medium resuspendiert und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

### **2.2.3 Kryokonservierung**

Rückzufrierende Zellen der jeweiligen Passagen wurden ebenfalls zuerst mit 5 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen und im Anschluss daran mit 2 ml Trypsin/EDTA für 2 min im Brutschrank inkubiert. Nach Abwaschen der Zellen vom Flaschenboden, wurde die Suspension 5 min lang bei 1200 U zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde dann im Einfriermedium, bestehend aus 95%igem fetalem Kälberserum und 5%igem DMSO (Sigma), resuspendiert und, im Anschluss an eine 24stündige Zwischenlagerung bei -80 °C im Isopropanol-Behälter, im Stickstofftank bei -180 °C aufbewahrt.

### **2.2.4 Proliferationsassay**

Der Proliferationsassay wurde unter Verwendung des kommerziell erhältlichen MTS-Assay (Promega Corp., Mannheim, Deutschland) nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Am Tag vor dem Versuch wurden die Zellen mit einer Dichte von  $6 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Nach Absaugen des Mediums wurde den Zellen zunächst 0,5 ml Phenol-freies RPMI-Medium (Gibco) zugegeben. Im Anschluss daran wurden in jedes Well 100 µl des frisch hergestellten MTS (3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)/PMS (phenazine methosulfate solution)-Reagenz (Promega) Gemischs hinzupipettiert und die Zellen bei 37 °C für 1,5 h

inkubiert. Die Absorption des entstandenen Formazan-Produkts wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt, die direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen ist.

## 2.2.5 Transfektion

### 2.2.5.1 Puromycin als selektives Antibiotikum

Zur Selektion der erfolgreich mit oben angegebenem Plasmid transfizierten Zellen wurde eine stabile Simultantransfektion mit einem Puromycin-Resistenzplasmid (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. R. Vile, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota, USA) durchgeführt. Das Selektions-Antibiotikum Puromycin (Sigma) wurde in einer Konzentration von 6 µg/ml eingesetzt. Die benötigte Puromycin-Konzentration, die zu einer Absterberate von >75 % der Y-1 Wildtypzellen führte, war zuvor durch einen Proliferationsassay ermittelt worden.

### 2.2.5.2 Transiente Transfektion

Einen Tag vor der Transfektion wurden die verwendeten Y-1 Zellen nach dem oben genauer erläuterten Protokoll (siehe 2.2.2) trypsinisiert und mit einer Zelldichte von  $6 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6 Well-Platten ausgesät, um am nächsten Tag eine 60-70%ige Zellkonfluenz zu erreichen. Daraufhin wurden die Zellen entweder mit dem ACTHR/NIS-pGL3 Vektor oder dem Kontrollvektor transfiziert, und zwar eine Hälfte mittels LipofectAMINE Plus Reagent (Invitrogen/Life Technologies, Inc., Karlsruhe) und die andere Hälfte mittels SuperFect (Qiagen GmbH, Hilden). Beide Versuchsansätze wurden im Medium (Invitrogen) ohne Serum- oder Antibiotikazusatz und nach den genauen Empfehlungen der Hersteller durchgeführt, wobei verschiedene Verhältnisse von eingesetzter DNA-Menge und jeweils verwendetem Transfektionsreagenz ausgetestet wurden. Die genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung erfolgt in Abschnitt 2.2.5.3. Nach 24 h bzw. 48 h Inkubation wurden die Zellen mittels Iod-Uptake Assay (siehe 2.3.1) auf den Transfektionserfolg gescreent, und aus jeder der beiden Versuchsreihen die Versuchsbedingungen mit der höchsten erzielten Iod-Aufnahme für die stabile Transfektion ausgewählt.

### 2.2.5.3 Stabile Transfektion

Die Y-1 Zellen wurden 24 h vor Beginn der stabilen Transfektion, wie bereits oben beschrieben, ausgesät.

Bei der Verwendung von LipofectAMINE Plus (Invitrogen) wurden 2 µg des oben angegebenen ACTHR/NIS-pGL3 Plasmids und 0,1 µg (= 1/20 der eingesetzten Plasmidmenge) des Puromycin-Plasmids vorsichtig mit 6 µl Plus Reagenz (Invitrogen), einem die Komplexbildung anregenden Enhancer, sowie 100 µl reinem Medium (d.h. ohne Serum- oder Antibiotikazusatz) gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden 4 µl LipofectAMINE in weiteren 100 µl Medium zugegeben, und das Gemisch für weitere 15 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der Y-1 Zellen abgesaugt, die Zellen mit 2 ml Medium gewaschen und 800 µl Medium vorgelegt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch gleichmässig auf die Zellen verteilt und im Brutschrank für 24 h inkubiert.

Gleichzeitig wurden unter Verwendung von SuperFect (Qiagen) 4 µg des ACTHR/NIS-pGL3 Plasmids sowie 0,2 µg (= 1/20 der eingesetzten Plasmidmenge) des Puromycin-Plasmids in reines Medium mit einem Endvolumen von 180 µl aufgenommen und vorsichtig vermischt. Danach wurden dem Reaktionsgemisch 20 µl SuperFect Transfection Reagent (Qiagen) hinzugefügt, mit der Pipettenspitze gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um die Komplexbildung zu unterstützen. Währenddessen wurde das Medium der Y-1 Zellen abgesaugt, die Zellen mit 1 x PBS-Puffer kurz gewaschen und 800 µl Medium vorgelegt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch gleichmässig auf die Zellen verteilt und im Brutschrank für 24 h inkubiert.

Nach der 24stündigen Inkubation unter Normalbedingungen wurde das jeweilige Transfektionsmedium abgesaugt und durch 2 ml Komplettmedium, welches mit 6 µg/ml Puromycin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) als Selektivantibiotikum supplementiert worden war, ersetzt. Die überlebenden, d.h erfolgreich transfizierten Klone wurden nach 4-8 Wochen, abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit, mittels Zylindertechnik isoliert, hochgezogen und einem Screening per Iod-Uptake Assay unterworfen.

## **2.3 Iod-Uptake Versuche**

### **2.3.1 Iod-Uptake Assay**

Der Iod-Uptake Assay wurde nach der von Weiss *et al.* 1984 etablierten Methode durchgeführt.

Am Tag vor dem Versuch wurden die Zellen mit einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Im ersten Versuchsschritt wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Inkubationspuffer HBSS (Gibco), das mit 10  $\mu\text{M}$  Natriumiodid (Sigma) und 10 mM HEPES (Merck) supplementiert und auf einen pH von 7,3 eingestellt worden war, kurz gewaschen. Dann wurden zu jedem Well 1 ml Inkubationspuffer, welchem zuvor 0,1  $\mu\text{Ci}$  Na  $^{125}\text{I}/\text{ml}$  (Amersham, Braunschweig, Deutschland) hinzugefügt worden war, hinzupipettiert. Den Kontroll-Wellen wurde zusätzlich 100  $\mu\text{M}$  KClO<sub>4</sub> (Perchlorat), welches selektiv die NIS-vermittelte Iod-Aufnahme in die Zellen hemmt, zugegeben. Die Zellen wurden daraufhin für 35 – 60 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde das radioaktiv versetzte HBSS abgesaugt und die Zellen mit eiskaltem HBSS kurz gewaschen, um das nicht von den Zellen aufgenommene Iod zu entfernen. In einer 20minütigen Inkubation der Zellen in 1 N NaOH (Merck) unter Schütteln bei ca. 300 U wurden die Zellen lysiert und die Radioaktivität im Zell-Lysat im  $\gamma$ -Counter gemessen.

### 2.3.2 Zeitkinetik

Zur Bestimmung des Zeitpunktes der maximalen Iod-Akkumulation in den NIS-transfizierten Zellen wurde eine Zeitkinetik für den Iod-Uptake durchgeführt. Der Versuch entsprach dem unter Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Iod-Uptake Assay, mit dem Unterschied, dass jede 6-Well Platte für eine unterschiedliche Zeitspanne inkubiert wurde (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 oder 60 min). Dann wurde die Reaktion jeweils, wie oben bereits beschrieben, gestoppt, und mit Hilfe des  $\gamma$ -Counters die Radioaktivität bestimmt. Die so ermittelte Inkubationszeit, die zur höchsten Iod-Akkumulation führte, wurde im Folgenden für alle Iod-Uptake Experimente als optimale Inkubationsdauer verwendet.

### 2.3.3 Iod-Efflux

Um die Geschwindigkeit, mit welcher die Zellen das zunächst akkumulierte  $^{125}\text{I}$  wieder verlieren, genau bestimmen zu können, wurde ein Iod-Efflux-Assay nach der Methode von Weiss *et al.* (1984) durchgeführt. Am Tag zuvor in 6-Well Platten ausgesäte Zellen ( $3 \times 10^5$  Zellen/Well) wurden, wie bereits unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben, für 35 min bei 37 °C mit weiter oben beschriebenem Puffer inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Medium 80 min lang alle 5 min durch frisches HBSS (ohne  $^{125}\text{I}$ ) ersetzt. Der  $^{125}\text{I}$ -Gehalt des jeweiligen Überstandes, der dem Iod-Verlust der Zellen in den vorangegangenen 5 min entsprach, wurde im  $\gamma$ -Counter gemessen. Nach Ablauf der 80 min wurde das noch in den Zellen akkumulierte

$^{125}\text{I}$  nach einer 20minütigen Inkubation der Zellen mit 10 N NaOH mittels  $\gamma$ -Counter gemessen.

## 2.4 Iod-Organifizierung

### 2.4.1 Inkubation der Zellen mit $^{125}\text{I}$

Am Tag vor dem Experiment wurden die Zellen in einer Dichte von  $3 \times 10^5$  Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät. Am nächsten Morgen wurde dann zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 1 ml Inkubationspuffer kurz gewaschen. Dann wurde zu jedem Well 1 ml Inkubationspuffer, welchem zuvor 0,1  $\mu\text{Ci}$  Na  $^{125}\text{I}/\text{ml}$  hinzugefügt worden war, hinzupipettiert. Den Kontroll-Wells wurde zusätzlich 100  $\mu\text{M}$   $\text{KClO}_4$ , welches selektiv die Iod-Aufnahme über NIS in die Zellen hemmt, zugegeben. Die Zellen wurden im Anschluss für 35 min bis 3 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert (siehe 2.3.1).

### 2.4.2 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationsdauer wurde der HBSS-Überstand abgenommen und die darin enthaltene Konzentration an freiem, d.h. nicht von den Zellen aufgenommenem  $^{125}\text{I}$  im  $\gamma$ -Counter gemessen. Die Organifizierung wurde dann im Folgenden mit der von Urabe *et al.* (1991) etablierten Methode anhand der Trichloressigsäure-Präzipitation bestimmt. Dabei wurden die Zellen zuerst mit eiskaltem 1 x PBS-Puffer kurz gewaschen, und dann nach Hinzugabe von 100  $\mu\text{l}$  0,1 M NaOH zu jedem Well 10 min lang bei ca. 300 U geschüttelt. Im Anschluss daran wurden die erhaltenen Zelllysate je zweier Wells in einem speziellen  $\gamma$ -Counter Röhrchen zusammenpipettiert und mit 1 ml TCA (Trichloressigsäure)/BSA(Sigma)-Lösung versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Lösung für 1 h bei 4 °C inkubiert, wodurch es zu einem Ausfall der  $^{125}\text{I}$ -bindenden Proteine kam. Diese wurden im Folgenden bei Maximalgeschwindigkeit und 4 °C für 10 min lang abzentrifugiert, mit kaltem 1 x PBS gewaschen, und im Anschluss das präzipitierte, an Proteine gebundene  $^{125}\text{I}$  nach Abnahme des Überstandes im  $\gamma$ -Counter gemessen.

## **2.5 Northern Blot**

### **2.5.1 Isolierung von Ribonukleinsäuren**

Die RNA aus mit dem NIS-Expressionsvektor bzw. dem Kontrollvektor stabil transfizierten Zellen wurde mit Hilfe des „Rneasy Mini Kits“ (Qiagen) gewonnen. Die Zellen wurden in 100 mm-Petrischalen (1,5 Millionen Zellen/Schale) ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 %, wie unter 2.2.2 bereits ausführlich beschrieben, abtrypsinisiert. Das Zelllysat wurde im Anschluss daran abzentrifugiert und das entstandene Pellet mit 600 µl RLT-Puffer (Qiagen) gründlich resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl 70%igem Ethanol erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 13.000 U in der Rneasy Minisäule (Qiagen). Nachdem 700 µl RW1-Puffer (Qiagen) auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert worden war, wurde die Säule zweifach mit 500 µl RPE-Puffer (Qiagen) für 2 min bei 13.000 U gewaschen. Durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser auf die Gelmembran der Säule, Inkubation für 5 min und eine letzte 2minütige Zentrifugation wurde dann die RNA eluiert und bei -80 °C aufbewahrt.

### **2.5.2 Konzentrationsbestimmung durch Photometrie**

Die RNA-Konzentration einer wässrigen Lösung wurde mit einem Spektralphotometer über die UV-Absorption der Ribonukleinsäuren bestimmt. Die Extinktion von 500 µl Lösung wurde in einer Quarzküvette über einen Bereich der Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Verdünnung der RNA-Lösung wurde dabei so gewählt, dass die Werte im Bereich der grössten Messgenauigkeit lagen (1 : 200). Anhand des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Extinktionen konnte der Reinheitsgrad der RNA in Bezug auf Proteinverunreinigungen gemessen werden. Der E260/280 Wert sollte bei reiner RNA um die 1,7 liegen. Die Konzentration der Lösung (µg/µl) wurde dann im Folgenden nach der Formel (Verdünnung x RNA-Faktor x Wert der 260 nm-Messung) / Küvettenvolumen berechnet, wobei der RNA-Faktor einem Wert von 40 entspricht.

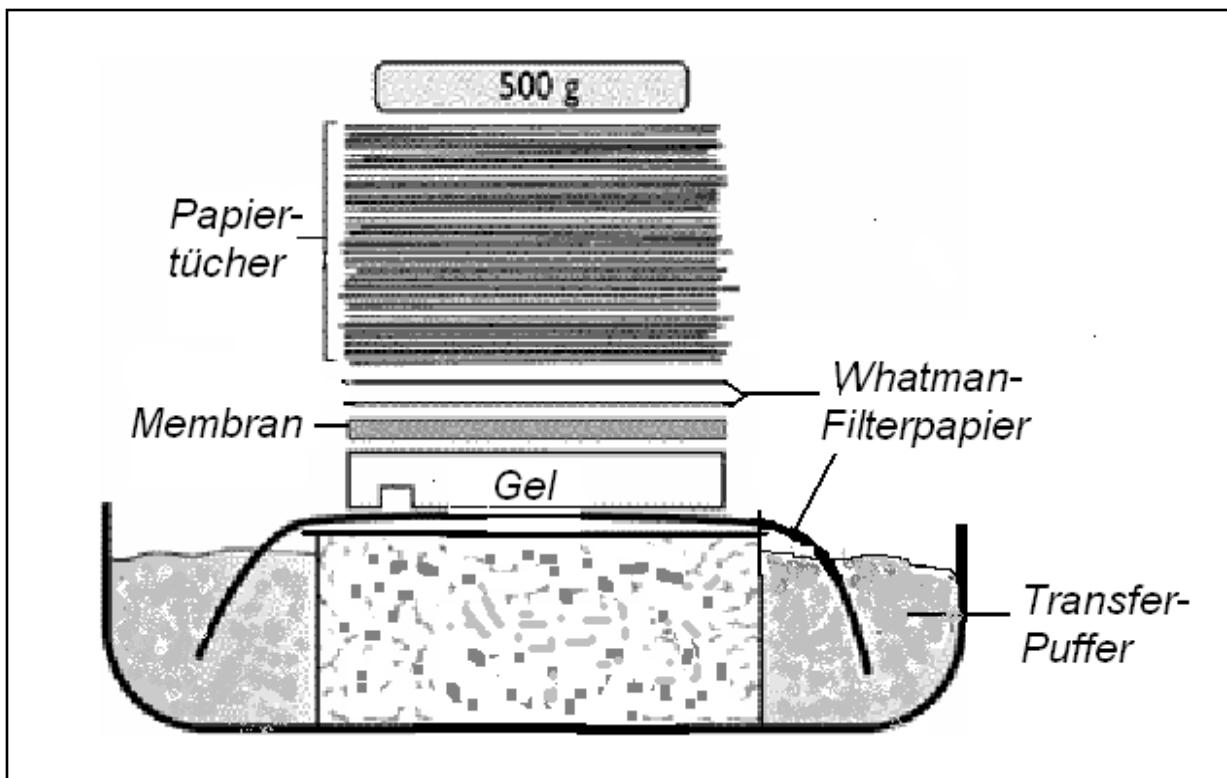
### **2.5.3 Elektrophoretische Auftrennung der RNA**

Im ersten Schritt wurde das RNA-Gel aus 1,5 g Agarose, 108 ml DEPC, 15 ml (10 x) MOPS, 27 ml Formaldehyd und 3 µl Ethidiumbromid hergestellt. Die Gelapparatur wurde im Folgenden für den gesamten Versuch auf einer Magnetröhre platziert, um damit eine kontinuierliche Zirkulation des Puffers während des Versuches zu gewährleisten.

Die bei – 80 °C aufbewahrten RNA-Proben wurden zuerst vorsichtig auf Eis aufgetaut, um im Anschluss für 5 min in einem Heizblock bei 60 °C inkubiert zu werden. Je 10 µg der RNA-Proben sowie 6 µl eines RNA Markers (Bio-Rad) wurden im Folgenden mit 17 µl RNA sample loading buffer (Sigma) vermischt. Alle Proben inklusive der Marker wurden bei 65 °C für 15 min denaturiert und im Anschluss daran auf das Agarosegel, welches zuvor bereits ca. 30 min vorgelaufen war, aufgetragen und bei 52 Volt für 4 h laufen gelassen. Dabei kam es zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA-Fragmente.

#### 2.5.4 Transfer auf die Nylonmembran

Nach Beendigung der 4stündigen Elektrophorese wurde das Gel unter einer UV-Kamera fotografiert und mit einem Skalpell auf die richtige Grösse zurechtgeschnitten. Daraufhin wurde das Gel vorsichtig auf ein mit dem Transferpuffer (20 x SCC) vorbefeuchtetes Whatman-Filterpapier gelegt und glattgestrichen. Auf die Oberfläche des Gels wurde eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham, Freiburg) in Gelgrösse sowie ein weiteres Whatman-Filterpapier und mehrere Papiertücher gelegt und die Gesamtkonstruktion mit 2 kg über Nacht beschwert (**siehe Abb. 4**). Dabei wurde sichergestellt, dass es zu einer ständigen Befeuchtung der Membranen mit dem Transferpuffer kam. Am nächsten Morgen wurde die Nylonmembran, auf welcher sich nun die transferierte RNA befand, sofort mit einem UV-Stratalinker von beiden Seiten cross-gelinkt, unter der UV-Kamera fotografiert, noch feucht in Frischhaltefolie eingeschweisst und eingewickelt in Aluminiumfolie bei Raumtemperatur gelagert.



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Northern Blot-Aufbaus**

## 2.5.5 Radioaktive Markierung der cDNA-Sonde

Dieser Schritt erfolgte unter Verwendung des „Megaprime DNA Labeling Systems“ (Amersham). 25 ng eines NIS-Gen-spezifischen cDNA-Fragments (Nukleotide 1184-1667) wurden auf Eis mit 5 µl eines Random-Primers (Amersham) und DEPC-H<sub>2</sub>O in einem Endvolumen von 26 µl gemischt, bei 95 °C für 5 min denaturiert und im Anschluss sofort wieder auf Eis gestellt. Dann wurde ein zweites Reaktionsgemisch, bestehend aus 5 µl des Reaktionspuffers (Amersham), jeweils 4 µl der Nukleotide dTTP, dGTP und dATP (alle Amersham), 5 µl des radioaktiven ( $\alpha - P^{32}$ ) Deoxyadenosin- 5'- Triphosphats (CTP) sowie 2 µl der DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Amersham), hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Reaktion mit 5 µl 0,2 M EDTA (Invitrogen) gestoppt, und das Gemisch unter Verwendung des „QIAquick Nucleotid Removal Kits“ (Qiagen) aufgereinigt.

Hierbei wurde zuerst die 5fache Menge an PN-Puffer (Qiagen) zugegeben, das Gemisch in die Säule überführt und 1 min bei 6000 U zum Binden der DNA zentrifugiert. Danach wurde zweimalig nach Hinzugabe von je 500 µl PE-Puffer (Qiagen) für 1 min bei 6000 U, und einmal bei 13.000 U für 1 min trocken zentrifugiert. Nach Transfer der Säule in ein neues Reaktionsgefäß wurden 50 µl EB-Puffer (Qiagen) als Elutionsreagens auf die Säule gegeben

und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die folgende 1minütige Zentrifugation bei 13.000 U wurde die entstandene radioaktiv-markierte und somit als Hybridisierungsprobe verwendbare cDNA herausgewaschen und im Anschluss sofort bei ca. 100 °C für 5 min erneut denaturiert.

### **2.5.6 Hybridisierung**

Nun wurde die aufbewahrte Nylonmembran nach kurzem Befeuchten mit DEPC-H<sub>2</sub>O für 30 min bei 68 °C im Hybridisierungspuffer (Express Hyb Solution, BD Clontech Laboratories, Heidelberg, Deutschland) vorhybridisiert. Im Anschluss erfolgte nach Absaugen des Puffers und Zugabe der zuvor in 5 ml Hybridisierungspuffer gelösten radioaktiven cDNA-Sonde die eigentliche Hybridisierung für 1 h bei 68 °C. Dann wurden die Blots dreimal für je 10 min bei Raumtemperatur in 2 x SSC (saline sodium citrate)/0,05 % SDS (sodium dodecylsulfate)-Lösung und einmal für 30 min bei 50 °C in 0,1 x SSC/0,1 % SDS-Lösung gewaschen, wobei die nicht an den Blot gebundene radioaktive cDNA von der Membran entfernt wurde. Die Blots wurden daraufhin bei – 80 °C für ca. 3 Wochen unter Verwendung eines KODAK X-OMAT AR Films (Sigma) exponiert.

### **2.5.7 Kontroll-Hybridisierung mit einer β-Actin-Sonde**

Um die NIS-cDNA vor der Durchführung der Kontroll-Hybridisierung von der Membran zu entfernen, wurde diese dreimal für je 5 min bei 80 °C unter Schütteln mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS-Lösung gewaschen.

Zur Qualitätskontrolle und Quantifizierung der geblotteten RNA wurde die Membran im Anschluss nach dem oben bereits beschriebenen Protokoll erneut hybridisiert unter Verwendung von 25 ng einer humanen β-Actin cDNA-Probe (Clontech), die ebenfalls nach oben beschriebenem Protokoll radioaktiv gelabelt wurde.

Anhand der Computer-gestützten densitometrischen Analyse (ImageJ-Software) der Intensitäten der einzelnen β-Actin Banden wurden die zuvor gemessenen NIS-Intensitäten normalisiert.

## **2.6 Western Blot**

### **2.6.1 Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot-Analyse (Membranpräparation)**

Zuvor in 100 mm-Petrischalen ausgesäte Zellen wurden nach Verwerfen des Mediums kurz mit eiskaltem 1 x PBS-Puffer gewaschen, nach Zugabe von 1 ml Puffer A vom Boden der Kulturschale abgeschabt und das erhaltene Zelllysat auf Eis gut resuspendiert. Die Lösung wurde daraufhin bei 4 °C und 500 g (= 2000 U) für 15 min zentrifugiert und dem erhaltenen Überstand 100 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/ml hinzugegeben, um die darin enthaltenen Proteine zu binden. Nach Inkubation bei 4 °C für 45 min unter kontinuierlichem Schütteln wurde bei 100.000 g (= 25.000 U) und 4 °C für 20 min ultrazentrifugiert. Das erhaltene Pellet, in welchem sich die Membranproteine befanden, wurde nach vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes in 200 µl Puffer B gelöst und bei – 80 °C aufbewahrt.

### **2.6.2 Protein-Konzentrationbestimmung (Bradford-Proteinbestimmung)**

Die Konzentration der Proteinlösung wurde unter Verwendung des „Bio-Rad Protein Assays“ (Bio-Rad, München, Deutschland) bestimmt.

Zuerst wurde eine Proteinstandardkurve aus verschiedenen Verdünnungsstufen (0,2 – 1 mg/ml) einer BSA (bovine serum albumin, Sigma) - Stocklösung unter Zusatz des 1:5 verdünnten Biorad-Konzentrats (Bio-Rad) erstellt. Diese ergab sich aus den OD-Werten der Verdünnungen bei 595 nm nach einer vorausgehenden 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur.

Anhand dieser Standardkurve wurde im Anschluss die Konzentration der Proteinlösung bestimmt.

### **2.6.3 SDS-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE)**

Gleiche Konzentrationen an Membranprotein (je nach Versuch 10, 15 oder 20 µg) wurden mit 10 µl Sample Puffer (NuPage, Invitrogen), 4 µl Reducing Agent (NuPage, Invitrogen) und DNAse-freiem Wasser vorsichtig zu einem Gesamtvolumen von 30 µl gemischt und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Im Anschluss daran wurden die Proben und ebenso der verwendete Marker (Precision Plus Protein, All Blue Standards, Bio-Rad) in die Taschen eines 4-12%igen

Bis-Tris-HCl gepufferten Polyacrylamidgels (NuPage, Invitrogen) pipettiert und im Running Puffer bei 200 Volt für 1 h laufen gelassen.

#### **2.6.4 Western Blot-Analyse**

Im nun folgenden Elektroblotting wurden die Proteine bei 25 Volt im Transfer Puffer für 1 h vom Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45 µm, Invitrogen) transferiert. Im Anschluss an das Elektroblotting wurde die Membran für 1 h unter Schütteln mit 5%iger Milch-TBST (Tris buffered saline and tween)-Lösung geblockt und nach Zugabe eines monoklonalen Maus-Antikörpers gegen die Aminosäurereste 468-643 des NIS-Proteins (Verdünnung 1 : 3000) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. John. C. Morris, Mayo Clinic, Rochester/MN, USA) über Nacht bei 4 °C im Dunklen inkubiert.

Am nächsten Morgen wurde die Membran nach Absaugen des 1. Antikörpers erneut mit TBST gewaschen (1 x für 15 min, und dann 2 x für je 5 min). Dann erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Vector Laboratories), einem mit Peroxidase-gelabeltem Antimaus-Antikörper der Ziege (Verdünnung 1 : 5000, 1 h bei Raumtemperatur). Im Anschluss wurde die Membran für 1 x 15 min und 4 x für je 5 min mit TBST gewaschen, bevor sie für 1 min mit dem ECL-Reagenz (Enhanced chemiluminescence Western Blot detection Reagent, Amersham, Braunschweig, Deutschland) inkubiert und im Folgenden zwischen 1 und 20 min unter Verwendung eines KODAK BIO MAX MR Films (Sigma) exponiert wurden. Anhand des im Gel mitgelaufenen Markers konnte das Molekulargewicht der Banden bestimmt werden, ausserdem liess er eine Abschätzung der Transfer-Effizienz zu.

#### **2.7 Immunzytochemie**

In 6-Well Platten in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Well ausgesäte Zellen wurden nach ca. 2 Tagen bei einer 60 – 70%igen Konfluenz nach kurzem Waschen mit 1 x PBS-Puffer über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Die Immunzytochemie wurde unter Zuhilfenahme des „Vectastain Elite ABC Kits“ (Vector Laboratories, Burlingame, USA) durchgeführt. Dabei wurden die getrockneten Objektträger zuerst für 45 min bei 40 °C hitzefixiert, um dann mit HNSM (Horse normal serum mix, Vectastain), einem Serum zum Blocken von unspezifischen Membran-Bindungsstellen, für 45 min vorinkubiert zu werden. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit dem bereits oben

erwähnten NIS-spezifischen monoklonalen Maus-Antikörper (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. J.C. Morris) für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert (Ak-Verdünnung 1 : 3000 und 1 : 6000). Nach 3maligem Waschen mit 1 x PBS erfolgte eine 1stündige Inkubation mit dem zweiten Antikörper, ein gegen den ersten Antikörper gerichtetes Biotin-gekoppeltes Antimaus-Immunglobulin (Vectastain). Darauf folgte nach Wiederholung der PBS-Waschschrifte die Komplexbildung des 2. Antikörpers mit einem bereits präformierten Avidin/biotinylierten-Peroxidase-Komplex (DAB-Reagenz, Vectastain) für 30 min.

Die anschliessende 5minütige Färbung mit Diaminobenzidine (DAB-Reagenz, Vectastain) resultierte in einem blau-schwarzen Präzipitat, welches einen Indikator für die NIS-spezifische Immunoreaktivität darstellte. Danach wurden die Zellen noch für weitere 5 min mit Malachitgrün (Sigma) gegengefärbt und mit Glycergel (DAKO) fixiert.

Nach dem gleichen Prinzip wurden Kontroll-Färbungen durchgeführt, die statt mit den jeweiligen Antikörpern mit reinem 1 x PBS-Puffer inkubiert wurden, um unspezifische Bindungen der Antikörper auszuschliessen.

## **2.8 Clonogenic Assay**

### **2.8.1 Durchführung**

Mit dem NIS-Expressionsvektor bzw. dem Kontrollvektor stabil transfizierte Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen in einer Dichte von 3 Millionen Zellen /Flasche ausgesät. Nach Erreichen einer Konfluenz von 60-70 % wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und im Anschluss für 7 h mit 0,8 mCi Na<sup>131</sup>I (Amersham) (in HBSS-Inkubationspuffer, der mit 10 µM NaI und 10 mM HEPES supplementiert und auf einem pH von 7,3 eingestellt worden war), im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation mit <sup>131</sup>I wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit 0,05%igem Trypsin-ETDA abtrypsinert und in einer Zelldichte von 500 - 10.000 Zellen/Well (je sechs Wells pro Konzentration) in 12-Well Platten in regulärem Wachstumsmedium ausgesät.

Parallelexperimente wurden für jede Zelllinie im HBSS-Inkubationspuffer ohne den Zusatz von radioaktivem Iod zur Kontrolle durchgeführt.

## **2.8.2 Färbung und Auswertung**

Nachdem sich nach ca. 1-2 Wochen Zellkolonien gebildet hatten, wurden die Zellen mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und mit 500 µl 100%igem Methanol/Well (Sigma) für 10 min im Kühlschrank fixiert. Danach folgte die 5minütige Färbung mit 1%igem Kristallviolett (Sigma) und die Auszählung der Zellkolonien unter dem Mikroskop. Dabei wurden nur Kolonien ausgezählt, die aus ca. 50 Zellen oder mehr bestanden. Die für jede Zellreihe separat bestimmte Überlebensrate entsprach dem Prozentsatz an Zellkolonien nach  $^{131}\text{I}$ -Behandlung verglichen mit denen nach Inkubation mit HBSS-Inkubationspuffer.

## **2.9 Statistik**

Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mit kommerzieller Software (Excel). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung der dreifachen Ausführung dargestellt. Die Fehlerbalken in den Tabellen geben die Standardabweichung an. Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des t-Tests berechnet.

## **2.10 Verwendete Geräte**

Wasserbäder :	GFL (Labor)
Schüttler :	Köttermann (Zellkultur) IKA Vibrax VXR basic (Western) Edmund Kühler Laborgerätebau (Iod-Uptake) Edmund Kühler (Mini- und Maxipräp)
Mischer :	IKA
Vortexer :	Scientific Industries
Pipetten :	Eppendorf
Pipetus :	Hirschmann
Heizblock :	Eppendorf Thermomixer 5463

Zentrifugen :	5415 Eppendorf (Minipräp) S 60 Ultrazentrifuge Beckmann (Membranpräp) Hettich (Zellkultur) RC5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Kendro (Maxipräp) Universal 30 RF Hettich (Maxipräp) Hettich Roto Silenta (Organifizierung) Biofuge pico, Heraeus (Northern Blot) BioRad Power Pac 3000 als Stromquelle
Gelelektrophoresekammer :	Biofuge pico, Heraeus (Northern Blot) BioRad Power Pac 3000 als Stromquelle Invitrogen XCell Sure Lock (Western Blot) Bio-Rad Wide Mini-Sub Cell GT (Agarosegel)
Waagen :	Sartorius
PCR-System :	GeneAmp, Perkin Elmer
Mikrowelle :	Siemens
Kühlschränke :	Liebherr
$\gamma$ - Counter :	Berthold
Drucker :	Epson ( $\gamma$ -Counter) HP Laserjet 2200dn (Computer)
Computer :	Fujitsu Computers Siemens
Brutschrank :	Hera cell 240, Heraeus (Zellkultur) Heraeus ( <sup>131</sup> I) Heraeus ( <sup>125</sup> I) Gallenkamp (Bakterien)
Hitzefixierkammer :	GFL
Geigerzähler :	Berthold
UV-Kamera :	2UV Transilluminator (UVP)
Stickstofftank :	Messer Griessheim
pH-Elektrode :	Hanna Instruments
Spektralphotometer :	Vitrospec plus, CKB Biochrom
UV-Stratalinker :	Stratagene
Mikroskop :	Olympus (Zellkultur)

## 2.11 Verwendete Materialien

5 x TBE-Puffer :	54 g Trispuffer (Roth, Karlsruhe) 27,5 g Borsäure (Merck) 20 ml 0.5 M ETDA (Gibco) auf einen Liter mit Millipore-Wasser auffüllen
Ampicillin-Agar :	1,5 g Select-Agar (Gibco BRL) 200 ml steriles LB Medium (LB-Kapseln von Q-Biogene) 100 µg/ml Ampicillin (Sigma)
TCA/BSA-Lösung :	1 ml 30%iges TCA (Merck) 0,5 ml BSA in einer Lösung von 20 mg/ml (Sigma) auf 10 ml mit RNase freiem H <sub>2</sub> O auffüllen
DEPC-Wasser:	1 l Millipore zu 1 ml DEPC (Diethyl Pyrocarbonat, Sigma) geben, durch Schütteln gut mischen, 12 h bei RT inkubieren und im Anschluss autoklavieren
10 x MOPS :	41,9 g MOPS (Sigma) 6,8 g NaAc (Sigma) 10 ml 0,5 M EDTA (Gibco) mit DEPC auffüllen, auf pH 7 einstellen, steril filtrieren und im Kühlschrank dunkel lagern
Agarosegel für Northern Blot :	1,5 g Agarose (Gibco BRL) 108 ml DEPC 15 ml 10 x MOPS

	27 ml Formaldehyd (Sigma) 3 µl Ethidiumbromid (Merck)
20 x SSC :	350,6 g 3 M NaCl (Merck) 176,4 g 0,3 M Natriumcitrat (Sigma) auf 2 l mit H <sub>2</sub> O auffüllen, pH 7 einstellen und bei RT lagern
2 x SSC/0,05 % SDS :	50 ml 20 x SSC 1,25 ml 20 % SDS (Sigma) auf 500 ml mit Millipore auffüllen
0,1 x SSC/0,1 % SDS :	2,5 ml 20 x SSC 2,5 ml 20 % SDS 495 ml Millipore
Puffer A (Membranpräparation) :	42,8 g 250 mM Saccharose (Merck) 1,1915 g 10 mM HEPES, auf pH 7,5 einstellen 0,186 g 1 mM EDTA (Gibco) pro 100 ml 2 Complete Tabletten (10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin, 1mM PMSF, Roche) auf 500 ml mit Millipore auffüllen
Puffer B (Membranpräparation) :	8,56 g 250 mM Saccharose 0,2383 g 10 mM HEPES 0,0953 g 1 mM MgCl (Merck) auf 100 ml mit Millipore auffüllen
MOPS SDS Running Puffer :	40 ml 20 x Running Buffer (NuPage MOPS SDS Running Buffer, Invitrogen) 760 ml destilliertes Wasser

Transfer Puffer :	20 ml 20 x Transfer Buffer (NuPage Transfer Buffer, Invitrogen), 380 ml destilliertes Wasser
TBST :	10 ml 1 M Tris pH 7,4 4 g NaCl 500 µl Tween-20 (Merck) auf 500 ml mit destilliertem Wasser auffüllen
5 %-Milch-TBST :	1 g Milchpulver (Bio-Rad) 20 ml TBST
HSNM (horse normal serum mix) :	10 ml PBS, 3 Tropfen HNS (Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA)
ABC-Reagenz :	5 ml PBS 2 Tropfen Lösung A (Vectastain Kit) 2 Tropfen Lösung B (Vectastain Kit)
DAB-Reagenz :	5 ml destilliertes Wasser 2 Tropfen Stocklösung pH 7,5 (Vectastain Kit) 4 Tropfen DAB (Vectastain Kit) 2 Tropfen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Vectastain Kit) 2 Tropfen Nickelsol (Vectastain Kit)
Reaktionsgefässe :	Eppendorf, Hamburg BD Falcon, Frankreich
Propylene-Röhrchen :	BD Falcon
γ-Counter Röhrchen :	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen :	Costar, Corning, USA (für Pipetus) Sarstedt Eppendorf
x-Well Platten :	BD Falcon
Petrischalen :	BD Falcon
Zellkulturflaschen :	BD Falcon

Küvetten : Sarstedt  
Ultrazentrifugen-Röhrchen : Beckmann, Palo Alto, USA  
Glasgefäße, z.B. Erlmeier : Schott Duran, Deutschland

## 3 ERGEBNISSE

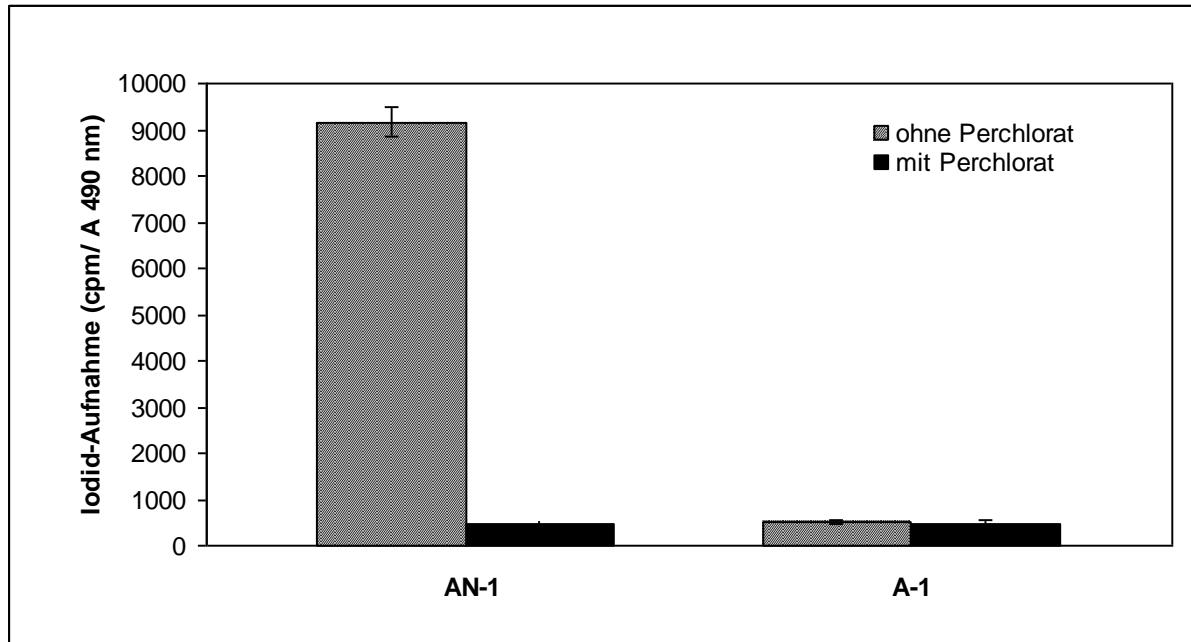
### 3.1 Selektion der erfolgreich mit NIS transfizierten Zellen durch Messung der Iod-Akkumulation

Humane full-length NIS-cDNA wurde in den pGL3-Vektor ligiert, aus dem zuvor das 1700 Basenpaare messende Luciferase-Fragment ausgeschnitten worden war (NIS-pGL3). Ein 997 Basenpaare messendes ACTH-Rezeptor Promoter-Fragment wurde dann in NIS-pGL3 ligiert und der resultierende Expressionsvektor (ACTHR/NIS-pGL3) durch Sequenzierung überprüft. Ein zusätzlicher Expressionsvektor enthielt lediglich den 997-bp-ACTH-Rezeptor Promoter ohne NIS-cDNA (ACTHR-pGL3). Die murine Nebennierenrindenkarzinom-Zelllinie Y-1 wurde in den folgenden Transfektionsversuchen eingesetzt. Als Kontroll-Tumorzelllinien ohne ACTH-Expression dienten die Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 und die humane medulläre Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie TT. Zunächst wurden oben genannte Zelllinien mit ACTHR/NIS-pGL3 bzw. dem Kontrollvektor mittels LipofectAMINE und SuperFECT unter serumfreien Bedingungen transient transfiziert. Nach der Transfektion wurden die Zellen 24 h bzw. 48 h lang inkubiert und die funktionelle NIS-Expression mittels Iod-Uptake Assay nach der Methode von Weiss *et al.* bestimmt.

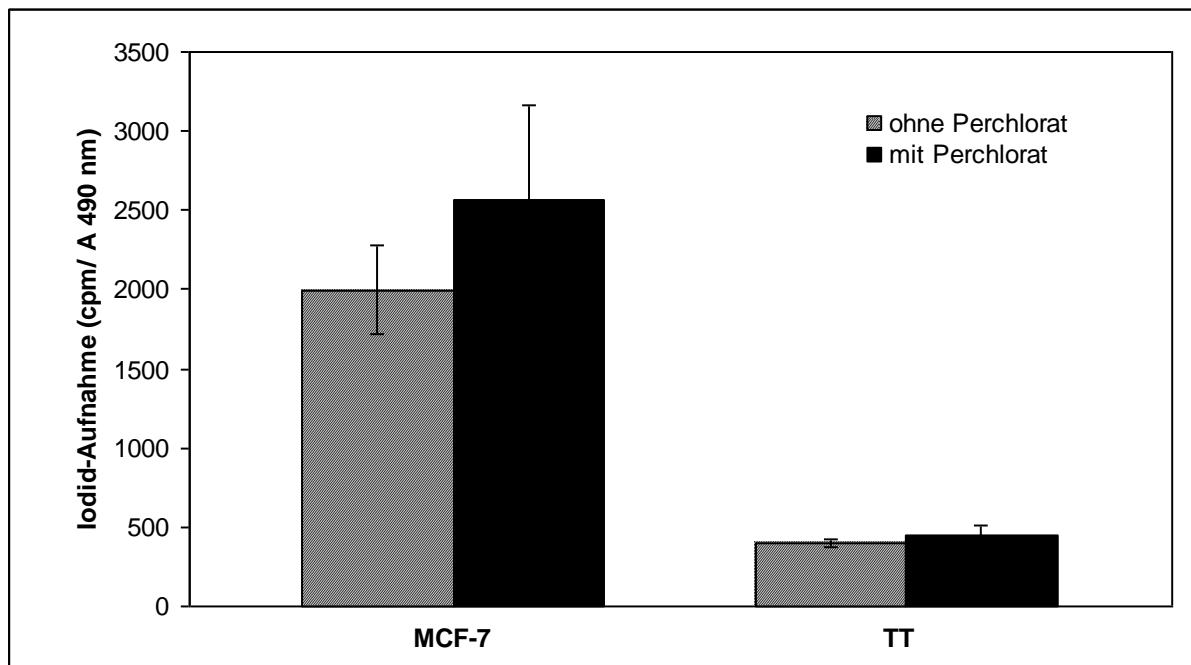
Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen wurden dann Y-1 Zellen mit ACTHR/NIS-pGL3 bzw. dem Kontrollvektor stabil transfiziert. Im Rahmen der stabilen Transfektion wurde eine Ko-Transfektion mit einem „Puromycin-Resistenz-Plasmid“ durchgeführt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. R. Vile, Mayo Clinic, Minnesota, USA), wodurch eine Puromycin-Resistenz der erfolgreich transfizierten Zellen induziert wurde.

Alle über die nächsten 1-5 Wochen im Puromycin-Selektivmedium wachsenden Zellklone wurden isoliert und mittels diagnostischem Iod-Uptake Assay auf ihre Iod-Aufnahmefähigkeit hin getestet. Die Fähigkeit zur Aufnahme von  $^{125}\text{I}$  korrelierte dabei mit der funktionellen, Membran-assoziierten NIS-Expression.

AN-1, die Zellreihe mit der höchsten Iod-Aufnahme, wurde für alle weiterführenden Experimente verwendet. Sie akkumulierte  $^{125}\text{I}$  Perchlorat-abhängig bis auf das 17,8-fache verglichen mit Zellen (A-1), die mit dem Kontrollvektor (ACTHR-pGL3) transfiziert worden waren, welche keine Perchlorat-abhängige Iod-Aufnahme zeigten (**siehe Abb. 5**).



**Abb. 5:** Iod-Akkumulation in stabil mit ACTHR/NIS-pGL3 (AN-1) oder dem Kontrollvektor ACTHR-pGL3 (A-1) transfizierten Y-1 Zellen. Die stabil transfizierte Zelllinie AN-1 konzentrierte  $^{125}\text{I}$  ca. 18fach (\*P < 0,0001) Perchlorat-abhängig gegenüber den mit dem Kontrollvektor transfizierten A-1 Zellen, die keine Iod-Aufnahme zeigten.



**Abb. 6:** In transient mit dem ACTHR/NIS-pGL3 Vektor transfizierten MCF-7- und TT-Zellen konnte keine Perchlorat-abhängige Iod-Aufnahme nachgewiesen werden.

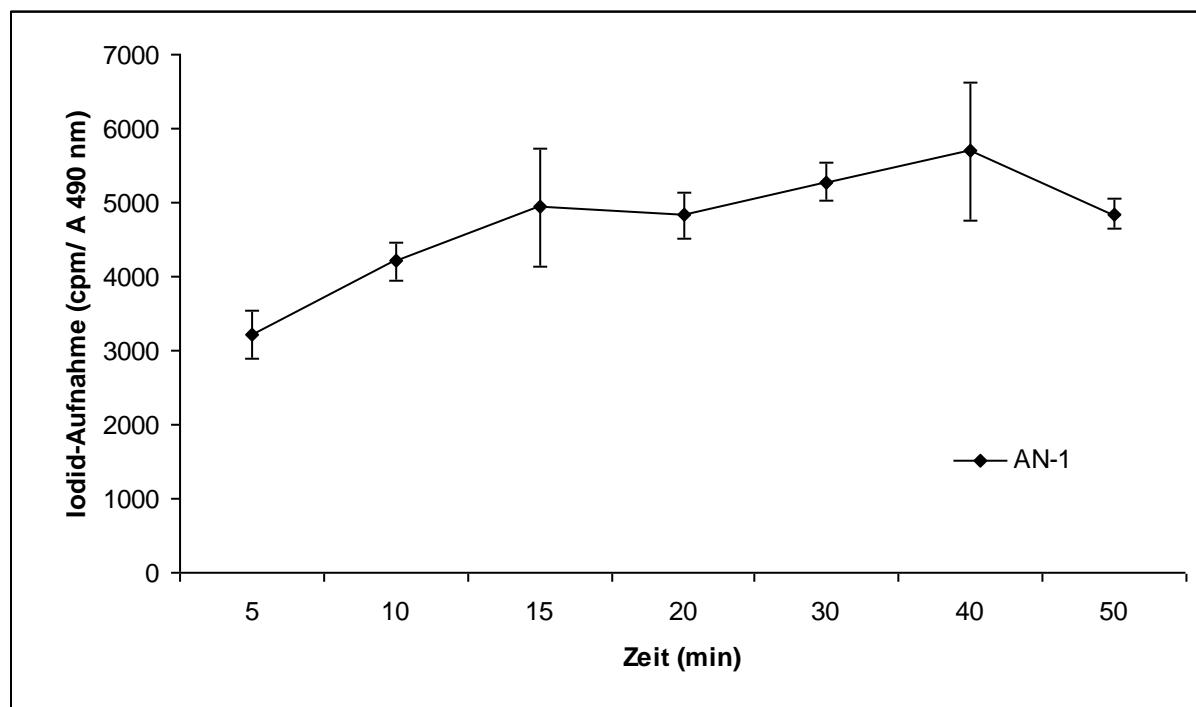
Die mit ACTHR/NIS-pGL3 transient transfizierten Kontroll-Zelllinien MCF-7 (Mammakarzinom) und TT (medulläres Schilddrüsenkarzinom) zeigten keine Perchloraat-abhängige Akkumulation von Iod, wodurch die Tumorspezifität der ACTH-Rezeptor Promoter-gesteuerten NIS-Transfektion bewiesen werden konnte (**siehe Abb. 6**).

### 3.2 Charakterisierung der NIS-induzierten Iod-Akkumulation durch

#### 3.2.1 Bestimmung der Zeitkinetik der Iod-Aufnahme

Um den Zeitpunkt der maximalen Iod-Akkumulation in den mit dem ACTHR/NIS-pGL3-Vektor stabil transfizierten AN-1 Zellen genau zu bestimmen, wurde eine Zeitkinetik ermittelt. Diese zeigte eine Absättigung der Iod-Akkumulation in den AN-1 Zellen nach 30 - 40 min Inkubationszeit (**siehe Abb. 7**). Die halbmaximale Iod-Akkumulation war bereits nach 5 min erreicht.

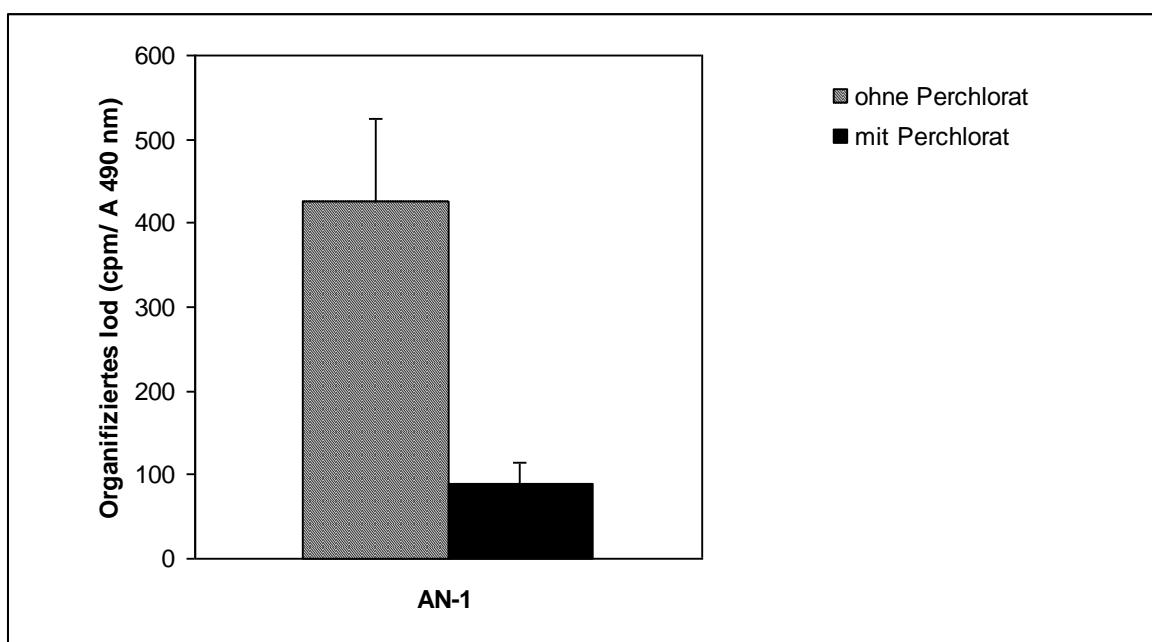
Somit wurden im Folgenden alle weiteren Experimente mit einer konstanten  $^{125}\text{I}$ -Inkubationszeit von 35 min durchgeführt.



**Abb. 7:** Zeitabhängige Iod-Akkumulation in stabil mit dem ACTHR/NIS-pGL3 Vektor transfizierten AN-1 Zellen. Halbmaximale Iod-Akkumulation nach ca. 5 min, maximale Iod-Akkumulation nach 30-40 min.

### 3.2.2 Bestimmung der Iod-Organifizierung

Um zu ermitteln, ob die mit ACTHR/NIS-pGL3 transfizierten Y-1 Zellen (AN-1) in der Lage sind, das von ihnen aufgenommene Iod zu organifizieren, d.h. das über NIS in den Zellen akkumulierte Iod an zelleigene Proteine zu binden und damit die Iod-Retentionszeit in den Zellen zu erhöhen, wurde die Iod-Organifizierung mit Hilfe der oben beschriebenen TCA (Trichloressigsäure)- Präzipitationsmethode untersucht. Dabei konnte im gewonnenen Zellpellet im  $\gamma$ -Counter eine Restaktivität von 430 cpm nachgewiesen werden, was auf eine Perchloraat-abhängige Iod-Organifizierung von ca. 7 % des gesamten akkumulierten Iods in den Zellen hinweist (**siehe Abb. 8**).

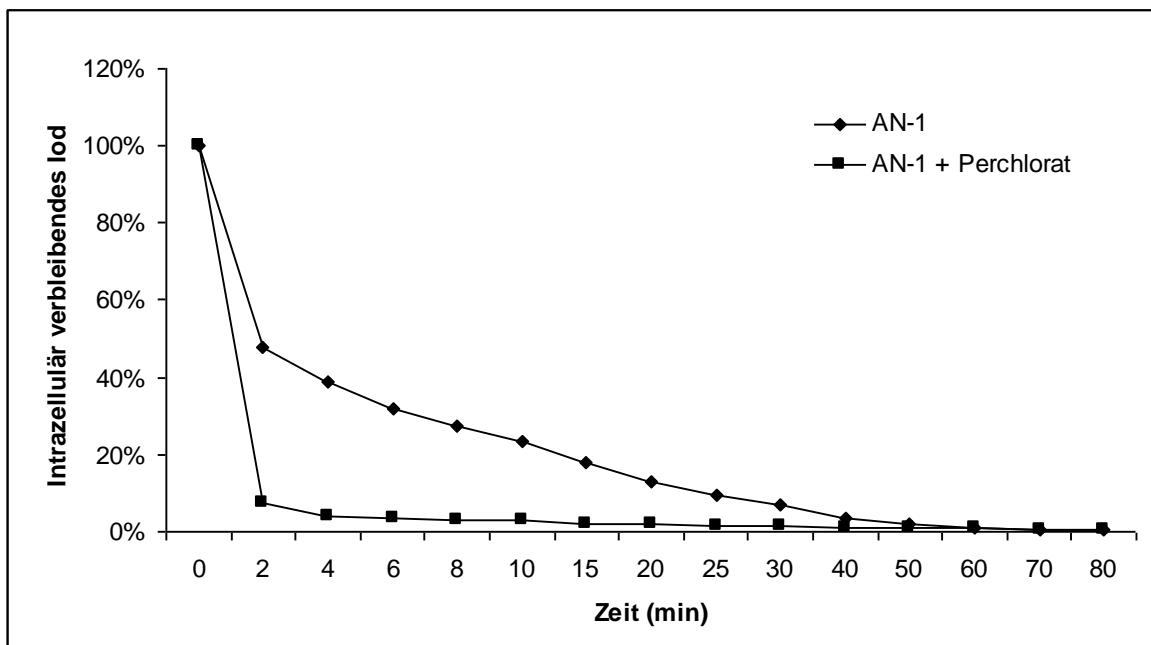


**Abb. 8: Iod-Organifizierung der stabil mit ACTHR/NIS-pGL3 transfizierten Y-1 Zellen (AN-1). Ca. 7 % des akkumulierten  $^{125}\text{I}$  wurden in AN-1 Zellen Perchloraat-abhängig organifiziert (\* $P < 0,01$ ).**

### 3.2.3 Bestimmung des Iod-Efflux

Während sich im *in vitro* Iod-Efflux Assay in den stabil mit dem ACTHR/NIS-pGL3 Vektor transfizierten AN-1 Zellen anfangs ein rascher Efflux von über 50 % des akkumulierten Iods innerhalb der ersten 2 min zeigte, waren nach 10 min noch ca. 25 % des Radionuklids in den Zellen verblieben und erst nach 40 min waren mehr als 90 % des ursprünglich

aufgenommenen Iods eliminiert (**siehe Abb. 9**). Dieser verzögerte Iod-Efflux ist möglicherweise Folge der partiellen Organifizierung des akkumulierten Iods (siehe 3.2.2). Im Gegensatz dazu zeigten mit Perchlorat geblockte AN-1 Zellen erwartungsgemäss keine Iod-Akkumulation.



**Abb. 9:** In stabil mit der NIS-cDNA transfizierten AN-1 Zellen verblieben nach 10 min noch ca. 25 % des ursprünglich akkumulierten Iods in den Zellen. Erst nach 40 min waren > 90 % des Iods aus den Zellen eliminiert.

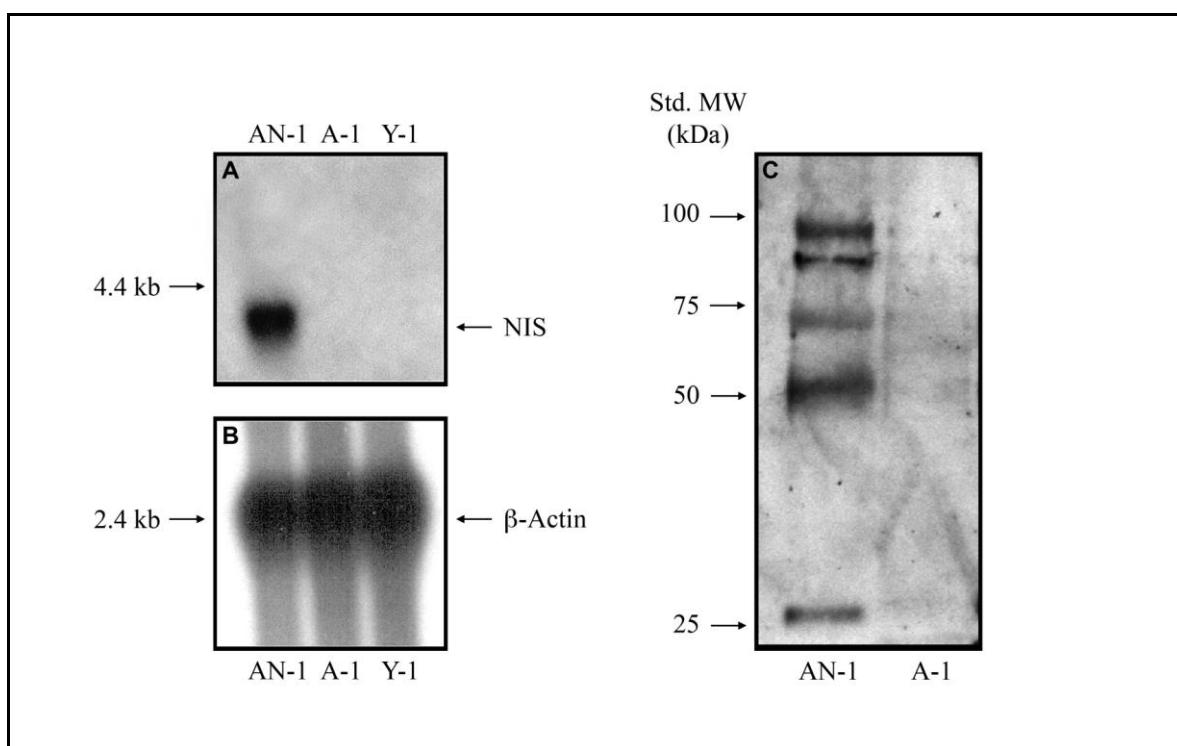
### 3.3 Bestätigung der NIS-Expression in Y-1 Zellen nach gewebespezifischem NIS-Gentransfer

#### 3.3.1 Nachweis von NIS-mRNA durch Northern-Blot Analyse

Zum Nachweis der NIS-mRNA in der stabil mit ACTHR/NIS-pGL3 transfizierten Zelllinie AN-1 wurde eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Hierfür wurde eine mit radioaktivem  $^{32}\text{P}$  gelabelte und für das humane NIS spezifische cDNA Sonde verwendet. In der AN-1 Zelllinie zeigte sich eine einzelne Bande von ungefähr 4 kb, wohingegen in der mit dem Kontrollvektor stabil transfizierten A-1 Zelllinie sowie in nicht-transfizierten Y-1 Zellen keine NIS-mRNA Expression nachzuweisen war (**siehe Abb. 10A**). Zur Kontrolle der RNA-Quantität und -Qualität erfolgte eine Re-Hybridisierung der Blots mit einer  $\beta$ -Actin-Sonde (**siehe Abb. 10B**).

### 3.3.2 Nachweis von NIS-Protein durch Western-Blot Analyse

Unter Verwendung eines monoklonalen, gegen humanes NIS-Protein gerichteten Antikörpers der Maus wurde in einem Western-Blot die NIS-Protein-Expression in stabil mit ACTHR/NIS-pGL3 transfizierten (AN-1) sowie mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen (A-1) untersucht. Dabei liess sich in den aus den A-1 Zellen isolierten Membranproteinen kein NIS-Protein nachweisen, während in AN-1 Zellen das NIS-Protein als Haupt-Bande von ca. 90-100 kDa sowie 3 kleineren Banden von ca. 70 kDa (NIS-Protein mit niedrigerem Glykosilierungsgrad), von ca. 50 kDa (deglykosiliertes NIS-Protein, vgl. Spitzweg *et al.*, 1999a) und ca. 30 kDa (Abbaufragmente des NIS-Proteins, vgl. Castro *et al.*, 1999a) nachgewiesen werden konnte (**siehe Abb. 10C**).



**Abb. 10:** Northern- und Western-Blot Analysen.

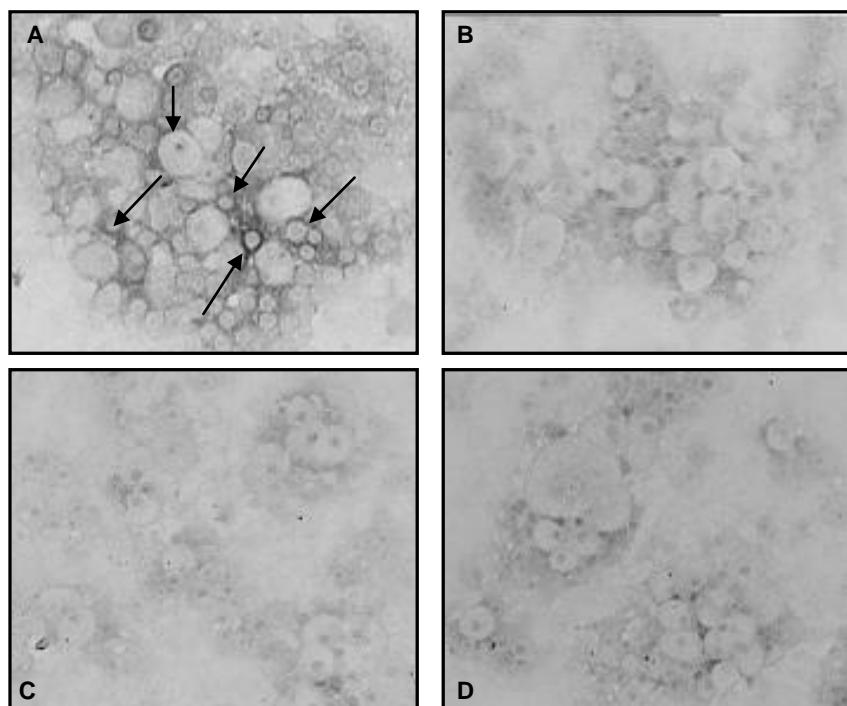
**A:** Nachweis der NIS-mRNA Expression in stabil mit dem ACTHR/NIS-pGL3 Vektor transfizierten AN-1 Zellen als NIS-spezifische Bande von 4 kb. In mit dem ACTHR-pGL3 Kontrollvektor transfizierten A-1 Zellen sowie nicht-transfizierten Y-1 Zellen konnte keine NIS-mRNA nachgewiesen werden.

**B:** Re-Hybridisierung der Blots mit einer β-Actin-Sonde.

**C:** Western-Blot Analyse. Nachweis von NIS-Protein in stabil mit dem ACTHR/NIS-pGL3 Vektor transfizierten AN-1 Zellen als Bande von 90-100 kDa, in der Kontrollzelllinie A-1 kein Nachweis einer NIS-spezifischen Bande.

### 3.3.3 Nachweis von Membran-assoziiertem NIS-Protein mittels Immunzytochemie

Die Immunfärbung der Zellen wurde unter Verwendung eines spezifischen, monoklonalen Antikörpers gegen das NIS-Protein ausgeführt. Hierbei zeigte sich in den stabil transfizierten AN-1 Zellen eine deutliche, vorzugsweise Membran-assoziierte, NIS-spezifische Immunreaktivität (siehe Abb. 11A). Im Gegensatz dazu war in den mit dem Kontrollvektor transfizierten A-1 Zellen keine NIS-spezifische Färbung nachweisbar (siehe Abb. 11B), wie auch in den Kontroll-Monolayern, die an Stelle der 1. und 2. Antikörper mit PBS-Puffer inkubiert worden waren (siehe Abb. 11C, D).

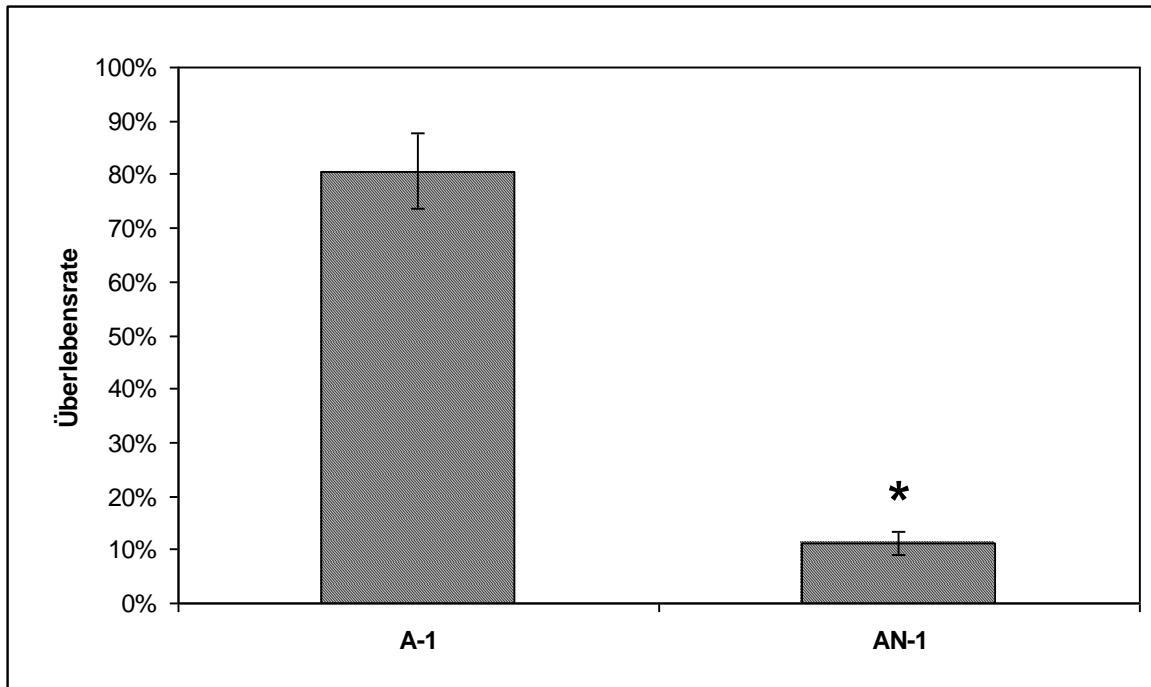


**Abb. 11: Immunzytochemie. Immunhistochemischer Nachweis von NIS-spezifischer Immunreaktivität in stabil mit NIS transfizierten AN-1 Zellen (A) im Gegensatz zu NIS-negativen Kontrollzellen (A-1) (B). Kontrollfärbungen ohne 1. bzw. 2. Antikörper (C,D).**

### 3.4 Nachweis der Zelltoxizität von $^{131}\text{I}$ im *in vitro*-Clonogenic Assay

Um den selektiv zytotoxischen Effekt des Radionuklids  $^{131}\text{I}$  in der stabil mit ACTHR/NIS-pGL3 transfizierten Zelllinie AN-1 und der Kontroll-transfizierten A-1 Zelllinie zu vergleichen, wurde ein *in vitro*-Clonogenic Assay durchgeführt. Während hierbei etwa 90 % der AN-1 Zellen durch die Behandlung mit  $^{131}\text{I}$  getötet wurden, starben von der A-1 Zelllinie

nur etwa 20 % der Zellen (**siehe Abb. 12**) ab, womit ein hochsignifikanter selektiv zytotoxischer Effekt in Y-1 Zellen, die stabil mit NIS unter Steuerung des ACTH-Rezeptor Promoters transfiziert worden waren, gezeigt werden konnte.



**Abb. 12:** Nachweis eines selektiv zytotoxischen Effektes von  $^{131}\text{I}$  in stabil mit NIS transfizierten AN-1 Zellen im Gegensatz zur Kontroll-Zelllinie A-1 (\* $P < 0,01$ ). Während nur etwa 20 % der A-1 durch  $^{131}\text{I}$ -Exposition getötet wurden, starben ca. 90 % der AN-1 Zellen.

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 NIS als neues diagnostisches und therapeutisches Gen zur Tumortherapie extrathyreoidaler Tumoren**

Die Grundlage für die Verwendung von NIS als neues therapeutisches Gen bildet dessen Klonierung und Charakterisierung vor 12 Jahren. Selektiver Gentransfer, beispielsweise unter der Steuerung eines gewebespezifischen Promoters, ermöglicht hierbei die gezielte Expression von funktionell aktivem NIS in entdifferenzierten thyreoidalen sowie extrathyreoidalen Tumoren, wodurch die Tumoren die Fähigkeit zur Iod-Akkumulation erwerben. Damit sind sie einer gezielten Radioiodtherapie, wie sie seit Jahrzehnten mit grossem Erfolg beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom durchgeführt wird, zugänglich. Dieser neue, zytoreduktive Gentherapieansatz eröffnet daher aussichtsreiche Perspektiven in der molekularen Onkologie.

Zusätzlich ist NIS im Gegensatz zu einer Vielzahl anderer potentieller therapeutischer Gene auch gleichzeitig als Reporter-Gen nutzbar und wird im Rahmen der Schilddrüsenszintigraphie sowie der Radioiod-Ganzkörperperszintigraphie in der Diagnostik und Nachsorge des Schilddrüsenkarzinoms bereits seit Jahrzehnten in dieser Funktion eingesetzt. Beim NIS handelt es sich um ein körpereigenes, nicht-immunogenes Protein, das eine klar definierte Biodistribution im Körper aufweist, den selektiven Transport leicht verfügbarer Radionuklide, wie  $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{188}\text{Re}$  oder  $^{211}\text{At}$  vermittelt, und dabei durch Akkumulation des Radionuklids eine Signal-Amplifikation erlaubt. Die Expression des NIS-Proteins im Anschluss an einen NIS-Gentransfer kann somit problemlos durch nicht-invasive bildgebende Verfahren (wie z.B.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - $^{123}\text{I}$ -Szintigraphie oder  $^{124}\text{I}$ -PET-CT) nachgewiesen werden, wodurch eine exakte Steuerung der Radioiodtherapie nach NIS-Gentherapie gewährleistet ist (Dingli *et al.*, 2003b; Spitzweg C, 2003a).

#### **4.1.1 Untersuchung des NIS-Gentransfers in verschiedenen Tumormodellen**

##### **4.1.1.1 Unselektiver NIS-Gentransfer**

In ersten Studien liess sich in einer maligne transformierten Ratten-Schilddrüsenzelllinie (FRTL-Tc) ohne Iod-Aufnahmefähigkeit nach Transfektion mit NIS-cDNA eine Akkumulation von  $^{125}\text{I}$  sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisen (Shimura *et al.*, 1997). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch in einer humanen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie erzielt, in welcher nach stabiler Transfektion mit dem NIS-Gen die verlorengegangene Fähigkeit des

Iodtransportes wiederhergestellt werden konnte (Smit *et al.*, 2000). In einer anschliessenden *in vivo* Untersuchung an dieser NIS-transfizierten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie führten Schilddrüsenablation und iodarme Diät zu einer Verlängerung der biologischen Halbwertszeit des akkumulierten Iods, was nach Applikation von 2 mCi (74 MBq)  $^{131}\text{I}$  in einem verzögerten Xenotransplantat-Tumorwachstum in Nacktmäusen resultierte (Smit *et al.*, 2002).

1999 konnten Mandell *et al.* nach retroviraler Transfektion von Melanomzellen sowie Karzinomzellen des Ovars, des Kolons und der Leber mit Ratten-NIS-cDNA (rNIS) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Iod-Akkumulation nachweisen. Zusätzlich liess sich *in vitro* ein selektiver zytotoxischer Effekt von  $^{131}\text{I}$  in diesen Zelllinien beobachten (Mandell *et al.*, 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden nach adenoviralem rNIS-Gentransfer auch in Karzinomzellen der Zervix, der Mamma, der Lunge, des Kolons sowie der Prostata *in vitro* erzielt und konnten *in vivo* nach intratumoraler Injektion des viralen Vektors in Zervix- und Mammakarzinom-Xenotransplantattumore bestätigt werden (Boland *et al.*, 2000). Darüberhinaus gelang es Petrich *et al.* (2003), in einer Reihe von Tumorzelllinien (Schilddrüsenkarzinom-, Kolonkarzinom-, Leberkarzinom-, Prostatakarzinom-, Nierenkarzinom-, Melanom-, Glioblastom- und Astrozytomzellen) durch Transfektion mit dem NIS-Gen eine funktionelle NIS-Expression zu induzieren.

Funktionell aktiver NIS wurde ausserdem *in vitro* und *in vivo* im Anschluss an retro- oder adenoviralen NIS-Gentransfer in Gliomzellen exprimiert, was im Rattenmodell nach Applikation einer therapeutischen Aktivität von insgesamt 12 mCi (444 MBq)  $^{131}\text{I}$  eine Verlängerung der Überlebenszeit bewirkte (Cho *et al.*, 2000 & 2002).

Carlin *et al.* (2000) gelang es, in humanen Gliomzellen durch Transfektion mit der NIS-cDNA eine Iod-Aufnahmefähigkeit und einen selektiven zytotoxischen Effekt von  $^{131}\text{I}$  zu induzieren. Interessanterweise kam es dabei in 3-dimensionalen Sphäroidkulturen zu einem Absterben von über 97 % der Zellen, wohingegen im zweidimensionalen Modell lediglich 79 % der Gliomzellen durch  $^{131}\text{I}$  zugrunde gingen. Diese Beobachtung wird auf den im 3-dimensionalen Modell ausgeprägteren „Bystander-Effekt“ zurückgeführt. Hiermit wird die Assoziation des NIS-Gentransfers mit dem „Crossfire-Effekt“ des  $\beta$ -Strahlers  $^{131}\text{I}$  mit einer therapeutischen Reichweite von bis zu 2,5 mm bezeichnet, d.h. nicht nur NIS-exprimierende Zellen, sondern auch NIS-negative benachbarte Zellen werden durch die Reichweite der  $\beta$ -Strahlen zerstört.

Die Transfektion einer humanen Mammakarzinom-Zelllinie mit der rNIS-cDNA resultierte in einer um das 40fache gesteigerten Iod-Aufnahme gegenüber nicht-transfizierten Zellen im *in vitro*-Experiment. Diese Beobachtung liess sich im Anschluss auch im Tiermodell bestätigen,

wo es in den etablierten Mammakarzinom-Xenotransplantaten zu einer Akkumulation von ca. 16,7 % der applizierten Iod-Gesamtaktivität kam (Nakamoto *et al.*, 2000).

Desweiteren konnten Haberkorn und Kollegen in Ratten-Hepatomzellen im Anschluss an einen retroviralen NIS-Gentransfer eine Akkumulation von  $^{125}\text{I}$  *in vitro* und *in vivo* beobachten (Haberkorn *et al.*, 2001). Auch in Prostataadenokarzinomzellen von Ratten wurde im Anschluss an die retrovirale Transfektion mit NIS-cDNA die Fähigkeit zur Iod-Aufnahme *in vitro* und *in vivo* induziert (Haberkorn *et al.*, 2003). Beiden Studien gemeinsam war allerdings ein rascher Efflux von  $^{125}\text{I}$  aus den transfizierten Zellen.

In den Arbeitsgruppen von J.C. Morris und S.J. Russell wurde ein NIS-kodierendes onkolytisches Masernvirus entwickelt, wodurch nach Gabe von  $^{131}\text{I}$  das onkolytische Potential des Virus in Myelomzell-Xenotransplantat-Tumoren im Mausmodell gesteigert und nach Applikation einer therapeutischen Aktivität von 1 mCi (37 MBq)  $^{131}\text{I}$  eine komplette Tumorregression erreicht werden konnte (Dingli *et al.*, 2003c).

Faivre und Kollegen (2004) wiesen in Leberkarzinomzell-Xenotransplantaten nach Injektion eines NIS-kodierenden Adenovirus unter Steuerung des CMV-Promoters (intratumoral oder über die Pfortader) eine beeindruckende Hemmung des Tumorwachstums bis hin zur kompletten Regression kleinerer Tumorknoten nach Applikation einer therapeutischen Dosis von  $^{131}\text{I}$  nach.

Weiterhin gelang es Mitrofanova *et al.* (2005), durch Behandlung mit 3 mCi  $^{131}\text{I}$  einen Wachstumsstop in Kolonkarzinom-Xenotransplantaten in Nacktmäusen zu induzieren, welche zuvor per replikations-defizientem Adenovirus *in vivo* mit rNIS-cDNA transduziert worden waren. Allerdings kam es im Anschluss an die Inhibition des Wachstums zu einem überschiessenden Rebound-Effekt, der am wahrscheinlichsten durch die überlebenden Tumorzellen verursacht wurde.

Diese Ergebnisse demonstrieren insgesamt eindrücklich das Potential der NIS-Gentherapie als innovative und potentiell kurative Möglichkeit für die Behandlung von entdifferenzierten thyreoidalen sowie extrathyreoidalen Tumoren.

#### 4.1.1.2 Tumorselektiver NIS-Gentransfer

Um eine selektive Expression des NIS-Gens im Zielgewebe zu erreichen, die Toxizität von  $^{131}\text{I}$  auf andere Organe so gering wie möglich zu halten und letztlich auch eine systemische Vektorapplikation zur Therapie metastasierender Tumoren zu ermöglichen, hat sich auch im Kontext der NIS-Gentherapie über die letzten Jahre die Methode des transkriptionellen

Targetings unter Verwendung gewebespezifischer bzw. tumorspezifischer Promotoren etabliert.

Spitzweg *et al.* gelang es erstmalig in der humanen Prostataadenokarzinom-Zelllinie LNCaP unter Steuerung des PSA-Promoters eine gewebespezifische NIS-Expression mit daraus resultierender Iod-Akkumulation zu induzieren, welche nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* einen therapeutischen Effekt von  $^{131}\text{I}$  erlaubte. Der PSA-Promoter ist in der Prostata für die gewebespezifische, androgenabhängige Expression von PSA (Prostata-spezifischem Antigen) verantwortlich. Dabei kam es in Nacktmäusen nach intraperitonealer Injektion von 111 MBq  $^{131}\text{I}$  zu einer Volumenreduktion von > 90 % in den stabil mit NIS-cDNA transfizierten LNCaP-Zell-Xenotransplantaten (Spitzweg *et al.*, 1999a & 2000). In der daran anschliessenden Studie konnte auch durch *in vivo*-NIS-Gentransfer unter Verwendung eines replikations-defizienten Adenovirus eine Iod-Akkumulation in Prostatakarzinom-Xenotransplantaten erreicht werden, die nach Applikation einer Aktivität von 111 MBq  $^{131}\text{I}$  zu einer durchschnittlichen Tumorreduktion von über 80 % führte (Spitzweg *et al.*, 2001b).

Um zur Minimierung der extratumoralen Zytotoxizität auch *in vivo* Prostata-spezifischen NIS-Gentransfer durchführen zu können und damit letztlich die systemische Adenovirus-Applikation zur Therapie des metastasierenden Prostatakarzinoms zu ermöglichen, wurde im weiteren Verlauf ein Prostata-spezifischer Adenovirusvektor unter Verwendung eines Prostata-spezifischen Probasin-Promoter-Fragmentes entwickelt (Ad5-PB-NIS) und charakterisiert (Kakinuma *et al.*, 2003).

Ein gewebespezifischer therapeutischer Effekt von  $^{131}\text{I}$  *in vitro* konnte in derselben Arbeitsgruppe darüberhinaus beim Kolon-Karzinom nach NIS-Gentransfer unter Steuerung des CEA-Promoters, wie auch beim medullären Schilddrüsenkarzinom unter Verwendung des Calcitonin-Promoters nachgewiesen werden (Cengic *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2005).

Erst kürzlich gelang es Spitzweg *et al.* nun, in medullären Schilddrüsenkarzinom-Xenotransplantaten durch *in vivo* NIS-Gentransfer unter Verwendung eines tumorspezifischen Adenovirus nach Applikation einer Aktivität von 111 MBq (3 mCi)  $^{131}\text{I}$  eine signifikante Reduktion des Tumorvolumens zu induzieren (Spitzweg *et al.*, 2007b).

In einer 2003 veröffentlichten Arbeit ist es Schipper *et al.* gelungen, in neuroendokrinen Tumorzellen des Pankreas unter Steuerung des Chromogranin A-Promoters eine tumorspezifische NIS-Expression zu induzieren, die *in vitro* einen therapeutischen Effekt von  $^{131}\text{I}$  erlaubte (Schipper *et al.*, 2003). Weiterhin konnte von Dingli und Kollegen in Myelomzellen durch einen lentiviralen NIS-Gentransfer unter Steuerung von Immunglobulin-

Promoter und –Enhancer Elementen eine gewebespezifische Iod-Akkumulation induziert werden, die *in vivo* nach Applikation von 37 MBq  $^{131}\text{I}$  zur kompletten Eradikation von Xenotransplantat-Tumoren führte (Dingli *et al.*, 2003a).

Unter Verwendung des Promoters für MUC1, ein Glykoprotein, das in einer Reihe von Tumoren wie Mamma-, Pankreas-, Prostata- und Ovarialkarzinomen überexprimiert wird, ist es Dwyer und Kollegen mittels adenoviralem *in vivo*-Gentransfer gelungen, NIS gezielt in Mammakarzinom-, Ovarialkarzinom-, sowie Pankreaskarzinom-Xenotransplantat-Tumoren im Nacktmausmodell zu exprimieren, wodurch eine Tumorvolumenreduktion von bis zu 83 % nach Applikation von 3 mCi (111 MBq)  $^{131}\text{I}$  erreicht werden konnte (Dwyer *et al.*, 2005a & 2006a,b).

Erst kürzlich konnte in der eigenen Arbeitsgruppe unter Steuerung des tumorspezifischen  $\alpha$ -Fetoprotein (AFP)-Promoters in humanen und murinen Leberkarzinomzellen eine NIS-Expression induziert werden, wodurch eine tumorspezifische Iod-Akkumulation *in vitro* erreicht werden konnte, die für einen zytotoxischen Effekt von  $^{131}\text{I}$  von bis zu 93 % in einem *in vitro*-Clonogenic Assay ausreichte. *In vivo* konnte im Xenotransplantat-Mausmodell nach Applikation von 55,5 MBq  $^{131}\text{I}$  eine signifikante Wachstumsinhibititon der Leberkarzinom-Xenotransplantate beobachtet werden (Willhauck *et al.*, 2008a). Durch die Kombination des transkriptionellen Targetings und der regionalen Applikationsmöglichkeit viraler Vektoren über die Leberarterie bestehen im Leberkarzinommodell optimale Bedingungen für die Induktion einer tumorselektiven NIS-vermittelten Radioiod-Akkumulation. Chen und Kollegen verfolgten in diesem Zusammenhang einen Leber-, aber nicht tumor-spezifischen NIS-Gentherapieansatz unter Verwendung des Albumin-Promoters und erreichten damit einen Wachstumsstillstand von Leberkarzinom-Xenotransplantat-Tumoren in der Ratte nach Applikation von 4 mCi (148 MBq)  $^{131}\text{I}$  (Chen *et al.*, 2006). Allerdings ist bei diesem Ansatz unter Verwendung des Albumin-Promoters eine Beeinträchtigung des Therapieeffektes durch eine beträchtliche Toxizität auch im normalen Lebergewebe zu befürchten.

#### **4.1.2 NIS-Gentransfer beim NNR-Karzinom**

Angesichts seiner infausten Prognose und der begrenzten Behandlungsmöglichkeiten diente in der vorliegenden Arbeit das NNR-Karzinom als weiteres interessantes Tumormodell zur Entwicklung eines gewebespezifischen NIS-Gentherapieansatzes.

Bei dem in der vorliegenden Studie verwendeten gewebespezifischen Promoter handelt es sich um den Promoter für das ACTH-Rezeptor-Gen, der 1996/97 von Naville *et al.*

charakterisiert wurde. Der ACTH-Rezeptor ist hochspezifisch für die Nebennierenrinde, wenngleich eine ACTH-R-Expression auf niedrigem Niveau auch in einer Subpopulation von Lymphozyten, im Fettgewebe und in der Haut nachgewiesen werden konnte (Boston & Cone, 1996; Clarke & Bost, 1989; Slominski *et al.*, 1996). Durch die Bindung des Hormons ACTH (Adrenocorticotropin) an seinen Rezeptor wird in der Nebennierenrinde die Produktion der lebensnotwendigen Mineralo- und Glukokortikoide induziert (Saez *et al.*, 1981).

In der vorliegenden Arbeit konnte in der murinen NNR-Karzinom-Zelllinie Y-1 unter Steuerung des ACTH-Rezeptor Promoters eine tumor-spezifische, NIS-vermittelte Akkumulation von  $^{125}\text{I}$  induziert werden. Zu diesem Zweck wurde ein Expressionsplasmid entwickelt, in dem die NIS-cDNA an das 997-bp-ACTH-Rezeptor Promoter-Fragment gekoppelt worden war (ACTHR/NIS-pGL3). Im Anschluss daran wurde die Y-1 Zelllinie mit ACTHR/NIS-pGL3 stabil transfiziert, woraufhin eine um das 18fache gesteigerte, tumor-spezifische Akkumulation von  $^{125}\text{I}$  mittels Iod-Uptake Assay nachzuweisen war. Die Tumorspezifität der ACTHR-Promoter-vermittelten NIS-Expression in Y-1 Zellen wurde durch Transfektion von Kontroll-Zelllinien (Mamma- und medulläre Schilddrüsenkarzinomzellen) bestätigt, welche keine Iod-Aufnahmefähigkeit zeigten.

Die NIS-Expression wurde auf RNA-Ebene mittels Northern-Blot Analyse sowie auf Proteinebene mittels Western-Blot Analyse bestätigt. Darüberhinaus konnte immunzytologisch eine signifikante, vorzugsweise Membran-assoziierte, NIS-spezifische Immunreaktion nachgewiesen werden.

Die tumorspezifische, ACTH-Rezeptor Promoter-vermittelte NIS-Expression in NNR-Karzinomzellen erlaubte schliesslich einen signifikanten therapeutischen Effekt von  $^{131}\text{I}$  *in vitro* mit einer selektiven Absterberate von 90 % der NIS-exprimierenden Tumorzellen.

## **4.2 Optimierung der therapeutischen Effizienz der NIS-Gentherapie**

### **4.2.1 Iod-Organifizierung und -Efflux: ihr potentieller Einfluss auf den Therapieerfolg**

Die durch das Enzym Thyreoperoxidase (TPO) katalysierte Iod-Organifizierung ermöglicht - durch Bindung des in den Zellen akkumulierten Iods an zelleigene Proteine - im Rahmen der Radioiodtherapie bei benignen und malignen Erkrankungen der Schilddrüse eine Verlängerung der Radioiod-Verweildauer und damit eine Erhöhung der Bestrahlungsdosis.

Kritiker des NIS-Gentherapie-Ansatzes in extrathyreoidalen Tumoren wenden ein, dass mit der fehlenden Möglichkeit zur Iod-Organifizierung in NIS-transfizierten Tumoren aufgrund

des raschen Iod-Effluxes und der dadurch verminderten Retentionszeit eine Grundvoraussetzung für den Therapieerfolg von  $^{131}\text{I}$  fehle.

Allerdings konnte bereits vor Jahrzehnten auch in Schilddrüsenkarzinomen ein Verlust der Fähigkeit zur Organifizierung nachgewiesen werden (Lemarchand-Beraud *et al.*, 1969; Valenta L, 1966). Dies wird zum einen auf den Verlust der Follikelstruktur im Tumorgewebe, zum anderen auch auf eine verminderte Expression von Thyreoglobulin zurückgeführt (Tazebay *et al.*, 2000).

Die Befürchtung, dass aufgrund einer fehlenden Iod-Organifizierung kein ausreichender therapeutischer Effekt von  $^{131}\text{I}$  erwartet werden kann, konnte durch die bereits erwähnten Ergebnisse von Spitzweg *et al.* an nicht-organifizierenden Prostatakarzinomzellen entkräftet werden, in welchen sich trotz fehlender Organifizierung ein signifikanter therapeutischer Effekt von  $^{131}\text{I}$  *in vitro* und *in vivo* nachweisen liess (Spitzweg *et al.*, 1999a & 2000). Auch wenn durch die Organifizierung des aufgenommenen Iods die therapeutische Effizienz einer Radioiodtherapie zweifelsohne gesteigert werden kann, scheint eine fehlende Iod-Organifizierung bei ausreichend hoher Radioiod-Aufnahmekapazität für einen therapeutischen Effekt nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

Die in einem Tumor nach NIS-Transduktion zu erzielende absorbierte Bestrahlungsdosis hängt von einer Reihe von Faktoren ab, insbesondere der Iod-Aufnahmekapazität, der Iod-Effluxrate, der Möglichkeit der Iod-Organifizierung, der Rate des radioaktiven Zerfalls sowie der Möglichkeit der Radioiod-Rezirkulation. Im Gegensatz zur *in vitro*-Situation wird die Radioiod-Verweildauer *in vivo* im dreidimensionalen Tumor bestimmt durch ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Iod-Aufnahme, Iod-Efflux und Iod-Rezirkulation zwischen Blutbahn und Tumor sowie zwischen den Tumorzellen, die gleichzeitig Iod abgeben und wiederaufnehmen können. Dies erklärt die im Vergleich zu *in vitro* deutlich verlängerte Radioiod-Verweildauer *in vivo* in verschiedenen Tumormodellen und den dadurch erzielten therapeutischen Effekt von  $^{131}\text{I}$ , der in einigen der oben aufgeführten Untersuchungen eindrucksvoll auch ohne Iod-Organifizierung gezeigt werden konnte (Spitzweg C, 2007a).

Um dennoch auch in extrathyreoidalen Tumoren eine Organifizierung zu induzieren, transduzierten Boland und Kollegen humane Zervixkarzinomzellen mittels Adenoviren zeitgleich sowohl mit dem TPO- als auch mit dem NIS-Gen. Trotz Nachweis von funktionell aktiver TPO-Expression und Iod-Organifizierung gelang es in der Studie aber nicht, die Verweildauer von  $^{131}\text{I}$  in den Zellen signifikant zu erhöhen (Boland *et al.*, 2002).

In einer Lungenkarzinom-Zelllinie konnte hingegen nach Ko-Transduktion mit den Genen für NIS und TPO ein deutlich verminderter Efflux des Radioiods aus den Zellen nachgewiesen werden (Huang *et al.*, 2001), was *in vivo* nach Applikation von kaltem Kaliumiodid durch Apoptose-Induktion zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums im Xenotransplantat-Modell führte (Zhang *et al.*, 2003).

In einer 2005 veröffentlichten Arbeit konnte erstmalig in einer mit dem NIS-Gen stabil transfizierten medullären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie eine Organifizierung von bis zu 4 % des applizierten  $^{125}\text{I}$  nachgewiesen werden, welche in den Zellen zu einem verzögerten Efflux des Radioiodids führte (Cengic *et al.*, 2005).

Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen einer Reihe weiterer Studien, die zeigten, dass nicht nur die Schilddrüse, sondern auch eine Vielzahl anderer Gewebe in der Lage sind Iod zu organifizieren (Eskin BA, 1970; Evans *et al.*, 1966; Turk *et al.*, 1983). Vor allem in der laktierenden Mamma konnte in diesem Zusammenhang eine Peroxidase-katalysierte Organifizierung von bis zu 20 % des aufgenommenen Iods nachgewiesen werden (Shah *et al.*, 1986; Strum *et al.*, 1978).

Auch in der vorliegenden Studie konnte eine Iod-Organifizierung von ca. 7 % in der stabil mit NIS transfizierten Zelllinie Y-1 gezeigt werden, welche zu einem deutlich verlangsamen Efflux von  $^{125}\text{I}$  führte.

Eine andere Möglichkeit, die Effizienz der NIS-Gentherapie in nicht-organifizierenden Tumorzellen zu erhöhen, wäre die Hemmung des Iod-Effluxes. Kürzlich wurde in einer anaplastischen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie beobachtet, dass die Behandlung mit Substanzen wie 17-AAG (17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin) und DIDS (4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic-acid) den Iod-Efflux signifikant hemmen und daher möglicherweise den Therapieeffekt nach NIS-Gentransfer optimieren kann (Elisei *et al.*, 2006).

#### **4.2.2 Stimulation des Iod-Uptakes**

Eine weitere Option zur Steigerung der Iod-Akkumulation im Anschluss an einen erfolgreichen, tumorspezifischen NIS-Gentransfer stellt die Stimulation der Promoter-gesteuerten NIS-Expression dar.

Spitzweg *et al.* (2003b) konnten in diesem Zusammenhang in einer Prostatakarzinom-Zelllinie nach PSA-Promoter-gesteuertem NIS-Gentransfer zeigen, dass eine Behandlung mit *all-trans* Retinsäure (atRA) die NIS-Expression und zytotoxische Wirkung von  $^{131}\text{I}$  signifikant erhöht. Hierbei zeigte sich nach Stimulation mit atRA ein 2-3facher Anstieg der NIS-mRNA- und -Protein-Expression, was zu einer 1,45fach erhöhten Iod-Akkumulation führte. Im Clonogenic Assay konnte dadurch die selektiv zytotoxische Wirkung von  $^{131}\text{I}$  von 50 % auf 90 % gesteigert werden. Ein ähnlicher Effekt wurde für das synthetische Glukokortikoid Dexamethason (Dex) nachgewiesen, das zusätzlich einen eigenen antiproliferativen Effekt in Prostatakarzinomzellen aufwies (Scholz *et al.*, 2004).

In Anlehnung an diese Ergebnisse ergeben sich auch im Rahmen des ACTH-Rezeptor Promoter-gesteuerten NIS-Gentransfers beim Nebennierenrindenkarzinom interessante Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen zur Verbesserung der Iod-Aufnahmefähigkeit.

Eine vielversprechende Substanz könnte in diesen Zusammenhang das Hormon Corticotropin (ACTH) darstellen, welches physiologischerweise die Produktion der Mineralo- und Glukokortikoide in der NNR induziert (Naville *et al.*, 1996). So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass ACTH in NNR-Zellen die Expression seines eigenen Rezeptors erhöht (Lebrethon *et al.*, 1995; Penhoat *et al.*, 1989 & 1995; Picard-Hagen *et al.*, 1997). Beispielsweise konnten Mountjoy *et al.* (1994) in diesem Zusammenhang in der hier verwendeten NNR-Karzinom-Zelllinie Y-1 eine 6fache Steigerung der ACTH-Rezeptor mRNA-Expression nach Stimulation mit ACTH nachweisen. Da in unserer Studie NIS unter Steuerung des ACTH-Rezeptor Promoters exprimiert wird, könnte daher durch ACTH über eine Stimulation der Promoteraktivität eine gesteigerte Transkription von NIS erreicht werden, was in weiteren Studien untersucht werden soll.

#### **4.2.3 Verwendung alternativer Radionuklide**

Einen weiteren vielversprechenden Ansatz zur Steigerung der therapeutischen Effizienz nach NIS-Gentransfer stellt die Verwendung alternativer Radionuklide, wie  $^{188}\text{Re}$  oder  $^{211}\text{At}$  an Stelle des  $^{131}\text{I}$  dar, da auch diese aktiv über NIS in die Zellen transportiert werden (Carlin *et al.*, 2002; Chung JK, 2002; Dadachova & Carrasco 2004).

Bei  $^{188}\text{Re}$  handelt es sich – wie auch bei  $^{131}\text{I}$  – um einen  $\beta$ -Strahler. Allerdings besitzt  $^{188}\text{Re}$  im Vergleich zu  $^{131}\text{I}$  (Halbwertszeit 8 d, E = 0,134 MeV, therapeutische Reichweite etwa 2,6-5

mm) eine kürzere Halbwertszeit (16,7 h) und deutlich höhere Energie ( $E = 0,764$  MeV), wodurch eine entsprechend grössere maximale therapeutische Reichweite von 23-32 mm erreicht werden kann. Die hieraus resultierende höhere Dosis und der höhere Crossfire-Effekt von  $^{188}\text{Re}$  lassen eine Steigerung der therapeutischen Effizienz nach *in vivo* NIS-Gentransfer erwarten, womit sich das Radionuklid besonders zur Therapie grösserer solider Tumoren eignen würde. So liess sich bereits in Mammakarzinom-Xenotransplantaten mit endogener, funktionell aktiver NIS-Expression *in vivo* nach Applikation von  $^{188}\text{Re}$  eine im Vergleich zu  $^{131}\text{I}$  um das 4,5fache erhöhte absorbierte Dosis nachweisen (Dadachova *et al.*, 2002). Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte außerdem eine signifikante Aufnahme von  $^{188}\text{Re}$  und  $^{131}\text{I}$  in Mammakarzinom-Tumoren in einem transgenen Mausmodell mit endogener NIS-Expression, wobei eine Verlangsamung des Tumorwachstums nach Applikation einer therapeutischen Aktivität beider Radionuklide erzielt werden konnte mit einem signifikant höheren therapeutischen Effekt in den mit  $^{188}\text{Re}$  behandelten Tumoren (Dadachova *et al.*, 2005). Willhauck und Kollegen in der eigenen Arbeitsgruppe konnten in einer erst kürzlich veröffentlichten Arbeit in gewebespezifisch mit NIS transfizierten Prostatakarzinom-Xenotransplantaten *in vivo* eine im direkten Vergleich zu  $^{131}\text{I}$  um das 4,7fache erhöhte absorbierte Dosis von  $^{188}\text{Re}$  nachweisen. Weiterhin zeigte sich im Mausmodell nach Applikation von 55,5 MBq  $^{188}\text{Re}$  in grösseren Tumoren eine signifikant erhöhte Volumenreduktion der Tumoren von 85 % im Gegensatz zu 73 % nach Applikation derselben Aktivität von  $^{131}\text{I}$ . Kleinere Xenotransplantat-Tumoren zeigten hingegen sowohl nach Applikation von  $^{131}\text{I}$  als auch  $^{188}\text{Re}$  eine durchschnittliche Volumenreduktion von 86 %. Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine verbesserte therapeutische Effizienz von  $^{188}\text{Re}$  aufgrund seines erhöhten Crossfire-Effekts bei der Behandlung grösserer solider Tumoren ableiten (Willhauck *et al.*, 2007b).

$^{211}\text{At}$  – ein  $\alpha$ -Strahler mit einem hohen linearen Energietransfer ( $E = 97$  keV/ $\mu\text{m}$ ) und einer Halbwertszeit von nur 7,2 h – wird ebenfalls über NIS in die Zelle transportiert und dort akkumuliert (Carlin *et al.*, 2002; Petrich *et al.*, 2002). In Gliomzellen wurde nach NIS-Transduktion *in vitro* ein im Vergleich zu  $^{131}\text{I}$  gesteigerter zytotoxischer Effekt nach Applikation von  $^{211}\text{At}$  nachgewiesen (Carlin *et al.*, 2003). Petrich und Kollegen zeigten in einer NIS-transfizierten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie eine um das etwa 14fach gesteigerte Tumor-absorbierte Dosis nach Applikation von  $^{211}\text{At}$  im Vergleich zu  $^{131}\text{I}$ , was im Xenotransplantat-Modell der Nacktmaus nach repetitiver Applikation von  $^{211}\text{At}$  (applizierte

Gesamtaktivität 2,5 MBq) eine komplette Eradikation aller Tumoren mit einer signifikanten Verlängerung der Überlebenszeit bewirkte (Petrich *et al.*, 2002 & 2006).

Auch in Prostatakarzinomzell-Xenotransplantaten zeigte sich im Anschluss an einen gewebespezifischen NIS-Gentransfer *in vivo* nach intraperitonealer Applikation von 1 MBq <sup>211</sup>At eine signifikante Reduktion des Tumorvolumens um bis zu 82 %, in einem Drittel der kleineren Tumoren trat sogar eine komplette Tumorregression auf. Zuvor hatte bereits *in vitro* ein therapeutischer Effekt mit einem Absterben von 99 % der NIS-transfizierten LNCaP-Zellen nach Inkubation mit 0,1 MBq <sup>211</sup>At beobachtet werden können (Willhauck *et al.*, 2008b). Aus diesen Ergebnissen lässt sich ein eindrucksvolles Potential von <sup>211</sup>At als Alternative zu <sup>131</sup>I insbesondere bei der Behandlung kleinerer Tumoren oder Mikrometastasen mit verkürzter Retentionszeit der Radionuklide ableiten (Dingli *et al.*, 2003b; Willhauck *et al.*, 2008b).

### 4.3 Ausblicke der NIS-Gentherapie

Nach dem „Proof of Principle“ der NIS-basierten Gentherapie an verschiedenen *in vivo*-Tumormodellen sind bis zur klinischen Anwendung, insbesondere bei metastasierten Tumoren, noch einige Hürden zu überwinden.

In diesem Zusammenhang liegt im Moment das besondere Augenmerk auf der Entwicklung sicherer Vektorsysteme für den systemischen *in vivo* NIS-Gentransfer. An den idealen Vektor werden eine Reihe von Ansprüchen gestellt: er sollte leicht und in grosser Menge herzustellen sein, nach Applikation keine Immunantwort hervorrufen, nicht toxisch sein und bei Einbau der Transfer-DNA ins Genom des Wirtes keine Mutationen (sog. insertionelle Mutagenese) verursachen (Verma & Weitzmann, 2005). Weiterhin wird eine hohe Transduktionseffizienz und gute Gewebepenetranz erwartet. Im Augenblick unterscheidet man bei den in Frage kommenden Vektorsystemen zwischen viralen und nicht-viralen Vektoren, wobei replikations-kompetente Adenoviren sowie polykationische Polyplexen vielversprechende Kandidaten darstellen.

Replikations-kompetente Adenoviren zeichnen sich aufgrund ihrer Doppelstrang-DNA durch eine hohe Transportkapazität an therapeutischem Material sowie eine relativ einfache Herstellung – auch in hohen Titern – aus. Des Weiteren können sie Zellen unabhängig vom Zellzyklus hocheffizient transduzieren. Eine tumor-selektive Replikation der Viren kann

durch die Koppelung tumor- oder gewebespezifischer Promotoren an die zur Replikation notwendigen Gene erreicht werden. Zusätzlich weisen replikations-kompetente Adenoviren aufgrund ihrer aktiven viralen Replikation einen eigenen onkolytischen Effekt auf, welcher zusätzlich zur Transduktion von NIS mit der Möglichkeit der therapeutischen Applikation von  $^{131}\text{I}$  einen zytotoxischen Effekt verursacht.

Zu den im Moment meistverwendeten nicht-viralen Vektorsystemen zählen die sogenannten polykationischen Polyplex. Ihre Vorteile bestehen in der einfachen Herstellung und einer niedrigen Immunogenität. Vielversprechende Ergebnisse konnten hiermit bereits in der Arbeitsgruppe von Ogris und Kollegen am Institut für Pharmakologie der LMU München erzielt werden: Es wurden Polyethylenimine (PEI) als polykationische DNA-Carrier entwickelt und charakterisiert, die *in vivo* nach systemischer Applikation eine signifikante Transgen-Expression (in diesem Falle von TNF $\alpha$ ) in subkutanen Neuroblastom- und Melanom-Xenotransplantattumoren erzielen und damit eine Wachstumshemmung der Tumoren bewirken konnten (Kursa *et al.*, 2003; Ogris *et al.*, 2003).

In Vorbereitung auf die weltweit erste klinische Studie am Menschen zur Radioiodtherapie beim Prostatakarzinom nach lokalem NIS-Gentransfer wurde in der Arbeitsgruppe von J.C. Morris an der Mayo Clinic neben ausführlichen Toxizitätsstudien an Ratten adenoviraler NIS-Gentransfer (Ad5-CMV-NIS) auch beim Hund untersucht. Dabei konnten die im Mausmodell erbrachten Ergebnisse bestätigt werden ohne Hinweise auf eine signifikante Toxizität außerhalb der Prostata nach Applikation einer Aktivität von 116 mCi (4292 MBq)/m $^2$   $^{131}\text{I}$ . Dosimetrische Berechnungen mittels SPECT/CT-Fusions-Imaging ergaben eine durchschnittliche absorbierte Dosis in der Prostata von etwa  $23 \pm 42$  cGy/mCi  $^{131}\text{I}$ , womit ein therapeutischer Effekt erwartet werden kann (Dwyer *et al.*, 2005b).

Auf dem Boden der vielversprechenden Vorarbeiten am Modell des Prostatakarzinoms in unserer Arbeitsgruppe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von J.C. Morris wurde nun an der Mayo Clinic die erste klinische Phase I-Studie zur Radioiodtherapie beim Prostatakarzinom nach lokalem NIS-Gentransfer genehmigt, und wird in Kürze mit der Rekrutierung der Patienten beginnen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Karzinom der Nebennierenrinde hat aufgrund seines schlechten Ansprechens auf konventionelle Chemo- oder Strahlentherapie eine infauste Prognose. Aus diesem Grund ist die Entwicklung neuer Behandlungsstrategien von entscheidender Bedeutung. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Studie die Möglichkeit einer Radioiodtherapie des Nebennierenrindenkarzinoms im Anschluss an einen gewebespezifischen Natrium/Iodid-Symporter-Gentransfer unter Steuerung des ACTH-Rezeptor Promoters untersucht.

Adrenokortikale Karzinomzellen (Y-1) wurden stabil mit einem Expressionsvektor transfiziert, in welchem die Natrium/Iodid-Symporter-cDNA an ein ACTH-Rezeptor Promoter-Fragment gekoppelt worden war. Dieser Promoter ist für die gewebespezifische Expression des ACTH-Rezeptors in der Nebenniere verantwortlich.

Stabil transfizierte Y-1 Zellen konzentrierten Iodid ca. 18fach *in vitro*, wobei ca. 7 % des akkumulierten Iods organisiert wurden, was zu einer Hemmung des Iod-Effluxes führte. Die Tumorspezifität wurde durch die Transfektion von Kontroll-Tumorzelllinien (Mammakarzinom- und medullären Schilddrüsenkarzinomzellen) bestätigt, welche keine Iod-Akkumulation zeigten. Die Natrium/Iodid-Symporter-Expression wurde auf RNA-Ebene mittels Northern-Blot Analyse sowie auf Proteinebene mittels Western-Blot Analyse bestätigt. Darüberhinaus konnte immunzytologisch eine signifikante, vorzugsweise Membran-assoziierte, Natrium/Iodid-Symporter-spezifische Immunreaktion nachgewiesen werden. Die tumorspezifische, ACTH-Rezeptor Promoter-vermittelte Natrium/Iodid-Symporter-Expression in NNR-Karzinomzellen erlaubte schliesslich einen signifikanten therapeutischen Effekt von  $^{131}\text{I}$  mit einer selektiven Absterberate von 90 % der Natrium/Iodid-Symporter-exprimierenden Tumorzellen.

Zusammenfassend konnte in Nebennierenrindenkarzinomzellen im Anschluss an einen gewebespezifischen Natrium/Iodid-Symporter-Gentransfer unter Steuerung des ACTH-Rezeptor Promoters ein therapeutischer Effekt von  $^{131}\text{I}$  *in vitro* nachgewiesen werden. Damit eröffnet diese Studie in Anlehnung an die seit über 60 Jahren mit grossem Erfolg eingesetzte Radioiodtherapie beim Schilddrüsenkarzinom vielversprechende Perspektiven hinsichtlich einer gezielten, Natrium/Iodid-Symporter-vermittelten Radionuklidtherapie beim Nebennierenrindenkarzinom.

## **6 LITERATURVERZEICHNIS**

Ajjan RA, Findlay C, Metcalfe RA, Watson PF, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP. The modulation of the human sodium iodide symporter activity by Graves' disease sera. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998a Apr; 83(4): 1217-21.

Ajjan RA, Watson PF, Findlay C, Metcalfe RA, Crisp M, Ludgate M, Weetman AP. The sodium iodide symporter gene and its regulation by cytokines found in autoimmunity. *J Endocrinol.* 1998b Sep; 158(3): 351-8.

Ajjan RA, Kemp EH, Waterman EA, Watson PF, Endo T, Onaya T, Weetman AP. Detection of binding and blocking autoantibodies to the human sodium-iodide symporter in patients with autoimmune thyroid disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 May; 85(5): 2020-7.

Allolio B, Fassnacht M, Arlt W. [Malignant tumors of the adrenal cortex]. *Internist (Berl).* 2002 Feb; 43(2): 186-95. Review.

Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M. Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Mar; 60(3): 273-87. Review.

Arturi F, Russo D, Schlumberger M, Villard JA, Caillou B, Vigneri P, Wicker R, Chieffari E, Suarez HG, Filetti S. Iodide symporter gene expression in human thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Jul; 83(7): 2493-6.

Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol.* 2001 Mar; 144(3): 199-206. Review.

Bidart JM, Lacroix L, Evain-Brion D, Caillou B, Lazar V, Frydman R, Bellet D, Filetti S, Schlumberger M. Expression of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter and Pendred syndrome genes in trophoblast cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Nov; 85(11): 4367-72.

Boland A, Ricard M, Opolon P, Bidart JM, Yeh P, Filetti S, Schlumberger M, Perricaudet M. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. *Cancer Res.* 2000 Jul 1; 60(13): 3484-92.

Boland A, Magnon C, Filetti S, Bidart JM, Schlumberger M, Yeh P, Perricaudet M. Transposition of the thyroid iodide uptake and organification system in nonthyroid tumor cells by adenoviral vector-mediated gene transfers. *Thyroid.* 2002 Jan; 12(1): 19-26.

Boston BA, Cone RD. Characterization of melanocortin receptor subtype expression in murine adipose tissues and in the 3T3-L1 cell line. *Endocrinology.* 1996 May; 137(5): 2043-50.

Braverman LE, Ingbar SH. Changes in thyreoidal function during adaption to large doses of iodide. *J Clin Invest.* 1963 Aug; 42: 1216-31.

Brown-Grant K. Extrathyreoidal iodide concentrating mechanisms. *Physiol Rev.* 1961; 41: 189-213.

Caillou B, Troalen F, Baudin E, Talbot M, Filetti S, Schlumberger M, Bidart JM. Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup>-symporter distribution in human thyroid tissues: an immunohistochemical study. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Nov; 83(11): 4102-6.

Carlin S, Cunningham SH, Boyd M, McClusky AG, Mairs RJ. Experimental targeted radioiodide therapy following transfection of the sodium iodide symporter gene: effect on clonogenicity in both two- and three-dimensional models. *Cancer Gene Ther.* 2000 Dec; 7(12): 1529-36.

Carlin S, Mairs RJ, Welsh P, Zalutsky MR. Sodium-iodide symporter (NIS)-mediated accumulation of (<sup>211</sup>At)-Astatide in NIS-transfected human cancer cells. *Nucl Med Biol.* 2002; 29: 729-739.

Carlin S, Akabani G, Zalutsky MR. In vitro cytotoxicity of <sup>211</sup>At-Astatide and <sup>131</sup>I-Iodide to glioma tumor cells expressing the sodium/iodide symporter. *J Nucl Med.* 2003; 44: 1827-1838.

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

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

Castro MR, Bergert ER, Beito TG, Roche PC, Ziesmer SC, Jhiang SM, Goellner JR, Morris JC. Monoclonal antibodies against the human sodium iodide symporter: utility for immunocytochemistry of thyroid cancer. *J Endocrinol*. 1999b Dec; 163(3): 495-504.

Caturegli P, Hejazi M, Suzuki K, Dohan O, Carrasco N, Kohn LD, Rose NR. Hypothyroidism in transgenic mice expressing IFN-gamma in the thyroid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 15; 97(4): 1719-24.

Cengic N, Baker CH, Schütz M, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. A novel therapeutic strategy for medullary thyroid cancer based on radioiodine therapy following tissue-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Aug; 90(8): 4457-64

Chen L, Altmann A, Mier W, Eskerski H, Leotta K, Guo L, Zhu R, Haberkorn U. Radioiodine therapy of hepatoma using targeted transfer of the human sodium/iodide symporter gene. *J Nucl Med*. 2006; 47: 854-862.

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

Cho JY, Shen DH, Yang W, Williams B, Buckwalter TL, La Perle KM, Hinkle G, Pozderac R, Kloos R, Nagaraja HN, Barth RF, Jhiang SM. In vivo imaging and radioiodine therapy following sodium iodide symporter gene transfer in animal model of intracerebral glioma. *Gene Ther*. 2002 Sep; 9(17): 1139-45.

Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. *J Nucl Med.* 2002; 43: 1188-1200.

Clarke BL, Bost KL. Differential expression of functional adrenocorticotropic hormone receptors by subpopulations of lymphocytes. *J Immunol.* 1989 Jul 15; 143(2): 464-9.

Courbon F, Zerdoud S, Bastie D, Archambaud F, Hoff M, Eche N, Berry I, Caron P. Defective efficacy of retinoic acid treatment in patients with metastatic thyroid carcinoma. *Thyroid.* 2006; 16: 1025-1031.

Dadachova E, Bouzahzah B, Zuckier LS, Pestell RG. Rhenium-188 as an alternative to iodine-131 for treatment of breast tumors expressing the sodium/iodide symporter (NIS). *Nucl Med Biol.* 2002; 29: 13-18.

Dadachova E, Carrasco N. The Na/I symporter (NIS): imaging and therapeutic applications. *Semin Nucl Med.* 2004 Jan; 34(1): 23-31.

Dadachova E, Nguyen A, Lin EY, Gnatovskiy L, Lu P, Pollard JW. Treatment with rhenium-188-perrhenate and iodine-131 of NIS-expressing mammary cancer in a mouse model remarkably inhibited tumor growth. *Nucl Med Biol.* 2005; 32: 695-700.

Dai G, Levy O, Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature.* 1996 Feb 1; 379(6564):458-60.

De la Vieja A, Ginter CS, Carrasco N. The Q267E mutation in the sodium/iodide symporter (NIS) causes congenital iodide transport defect (ITD) by decreasing the NIS turnover number. *J Cell Sci.* 2004 Feb 15; 117(Pt 5): 677-87.

Dingli D, Diaz RM, Bergert ER, O'Connor MK, Morris JC, Russell SJ. Genetically targeted radiotherapy for multiple myeloma. *Blood.* 2003a; 102: 489-496.

Dingli D, Russell SJ, Morris JC. In vivo imaging and tumor therapy with the sodium iodide symporter. *J Cell Biochem.* 2003b Dec 15; 90(6): 1079-86.

Dingli D, Peng K-W, Harvey ME, Greipp PR, O'Connor MK, Cattaneo R, Morris JC, Russell SJ. Image-guided radiotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyreoidal sodium iodide symporter. *Blood*. 2003c; 103: 1641-1646.

Dingli D, Bergert ER, Bajzer Z, O'Connor MK, Russell SJ, Morris JC. Dynamic iodide trapping by tumor cells expressing the thyreoidal sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 325: 157-166.

Dohan O, Baloch Z, Banrevi Z, Livolsi V, Carrasco N. Rapid communication: predominant intracellular overexpression of the Na(+)/I(-) symporter (NIS) in a large sampling of thyroid cancer cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jun; 86(6): 2697-700.

Dohan O, Gavrielides MV, Ginter C, Amzel LM, Carrasco N. Na(+)/I(-) symporter activity requires a small and uncharged amino acid residue at position 395. *Mol Endocrinol*. 2002 Aug; 16(8): 1893-902.

Dohan O, De la Vieja A, Paroder V, Riedel C, Artani M, Reed M, Ginter CS, Carrasco N. The sodium/iodide symporter (NIS): characterization, regulation, and medical significance. *Endocr Rev*. 2003a Feb; 24(1): 48-77. Review.

Dohan O, Carrasco N. Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. *Mol Cell Endocrinol*. 2003b Dec 31; 213(1): 59-70.

Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gandler SJ, Morris JC. In vivo radioiodide imaging and treatment of breast cancer xenografts after MUC1-driven expression of the sodium iodide transporter. *Clin Cancer Res*. 2005a Feb 15; 11(4): 1483-9.

Dwyer RM, Schatz SM, Bergert ER, Myers RM, Harvey ME, Classic KL, Blanco MC, Frisk CS, Marler RJ, Davis BJ, O'Connor MK, Russell SJ, Morris JC. A preclinical large animal model of adenovirus-mediated expression of the sodium-iodide symporter for radioiodide imaging and therapy of locally recurrent prostate cancer. *Mol Ther*. 2005b Nov; 12(5): 835-41.

Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide symporter permits in vivo radioiodide imaging and therapy of pancreatic tumors. *Hum Gene Ther.* 2006a; 17: 1-8.

Dwyer RM, Bergert ER, O'Connor MK, Gendler SJ, Morris JC. Sodium iodide symporter-mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice. *Gene Ther.* 2006b Jan; 13(1): 60-6.

Endo T, Kogai T, Nakazato M, Saito T, Kaneshige M, Onaya T. Autoantibody against Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996 Jul 5; 224(1): 92-5.

Eng PH, Cardona GR, Fang SL, Previti M, Alex S, Carrasco N, Chin WW, Braverman LE. Escape from the acute Wolff-Chaikoff effect is associated with a decrease in thyroid sodium/iodide symporter messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology.* 1999 Aug; 140(8): 3404-10.

Elisei R, Vivaldi A, Ciampi R, Faviana P, Basolo F, Santini F, Traino C, Pacini F, Pinchera A. Treatment with drugs able to reduce iodine efflux significantly increases the intracellular retention time in thyroid cancer cells stably transfected with sodium iodide symporter (NIS) cDNA. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91: 2389-2395.

Eskin BA. Iodine metabolism and breast cancer. *Trans NY Acad Sci.* 1970; 32: 911-947.

Evans ES, Schooley RA, Evans AB, Jenkins CA, Taurog A. Biological evidence for extrathyreoidal thyroxine formation. *Endocrinology.* 1966; 78: 983-1001.

Faivre J, Clerc J, Gerolami R, Herve J, Lonquet M, Liu B, Roux J, Moal F, Perricaudet M, Brechot C. Long-term radioiodine retention and regression of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats. *Cancer Res.* 2004 Nov 1; 64(21): 8045-51. Erratum in: *Cancer Res.* 2004 Dec 15; 64(24): 9230.

Furlanetto TW, Nguyen LQ, Jameson JL. Estradiol increases proliferation and down-regulates the sodium/iodide symporter gene in FRTL-5 cells. *Endocrinology* 1999; 140: 5705-5711.

Grüning T, Tiepolt C, Zöphel K, Bredow J, Kropp J, Franke W-G. Retinoic acid for redifferentiation of thyroid cancer - does it hold its promise. *Eur J Endocrinol*. 2003; 148: 395-402.

Haberkorn U, Henze M, Altmann A, Jiang S, Morr I, Mahmut M, Peschke P, Kubler W, Debus J, Eisenhut M. Transfer of the human NaI symporter gene enhances iodide uptake in hepatoma cells. *J Nucl Med*. 2001 Feb; 42(2): 317-25.

Haberkorn U, Kinscherf R, Kissel M, Kubler W, Mahmut M, Sieger S, Eisenhut M, Peschke P, Altmann A. Enhanced iodide transport after transfer of the human sodium iodide symporter gene is associated with lack of retention and low absorbed dose. *Gene Ther*. 2003 May; 10(9): 774-80.

Harii N, Endo T, Ohmori M, Onaya T. Extracellular adenosine increases Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene expression in rat thyroid FRTL-5 cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1999 Nov 25; 157(1-2): 31-9.

Harrington KJ, Bateman AR, Melcher AA, Ahmed A, Vile RG. Cancer gene therapy: Part 1. Vector development and regulation of gene expression. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2002 Feb; 14(1): 3-16.

Hsing AW, Man JM, Cho Chien HT, McLaughlin JK, Fraumeni JF jr. Risk factors for adrenal cancer: an exploratory study. *Int J Cancer*. 1996 Feb 8; 65(4): 432-6.

Huang M, Batra RK, Kogai T, Lin YQ, Hershman JM, Lichtenstein A, Sharma S, Zhu LX, Brent GA, Dubinett SM. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. *Cancer Gene Ther*. 2001 Aug; 8(8): 612-8.

Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry JF, Proye C. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg.* 2001 Jul; 25(7): 891-7.

Jhiang SM, Cho SY, Ryu KY, DeYoung BR, Smanik PA, McGaughy VR, Fischer AH, Mazzaferri EL. An immunohistochemical study of Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in human thyroid tissues and salivary gland tissues. *Endocrinology.* 1998 Oct; 139(10): 4416-9.

Jhiang SM. Regulation of iodide/sodium symporter. *Rev Endocr Metab Disord.* 2000; 1: 205-215.

Joba W, Spitzweg C, Schriever K, Heufelder AE. Analysis of human sodium/iodide symporter, thyroid transcription factor-1, and paired-box-protein-8 gene expression in benign thyroid diseases. *Thyroid.* 1999 May; 9(5): 455-66.

Kakinuma H, Bergert ER, Spitzweg C, Cheville JC, Lieber MM, Morris JC. Probasin promoter (ARR(2)PB)-driven, prostate-specific expression of the human sodium iodide symporter (h-NIS) for targeted radioiodine therapy of prostate cancer. *Cancer Res.* 2003 Nov 15; 63(22): 7840-4. Erratum in: *Cancer Res.* 2003 Dec 15; 63(24): 9057. *Cancer Res.* 2004 Feb 15; 64(4): 1559.

Kebebew E, Peng M, Reiff E, Treseler P, Woeber KA, Clark OH, Greenspan FS, Lindsay S, Duh QY, Morita E. A phase II trial of rosiglitazone in patients with thyroglobulin-positive and radioiodine-negative differentiated thyroid cancer. *Surgery.* 2006 Dec; 140(6): 960-6; discussion 966-7.

Kogai T, Endo T, Saito T, Miyazaki A, Kawaguchi A, Onaya T. Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells. *Endocrinology.* 1997 Jun; 138(6): 2227-32.

Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, Huang M, Brent GA. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000a Jul 18; 97(15): 8519-24.

Kogai T, Curcio F, Hyman S, Cornford EM, Brent GA, Hershman JM. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression. *J Endocrinol*. 2000b Oct; 167(1): 125-35.

Kogai T, Kanamoto Y, Che LH, Taki K, Moatamed F, Schultz JJ, Brent GA. Systemic retinoic acid treatment induces sodium/iodide symporter expression and radioiodide uptake in mouse breast cancer models. *Cancer Res*. 2004 Jan 1; 64(1): 415-22.

Kohn LD, Suzuki K, Nakazato M, Royaux I, Green ED. Effects of thyroglobulin and pendrin on iodide flux through the thyrocyte. *Trends Endocrinol Metab*. 2001 Jan-Feb; 12(1): 10-6. Review.

Kursa M, Walker GF, Roessler V, Ogris M, Roedl W, Kircheis R, Wagner E. Novel shielded transferrin-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes for systemic tumor-targeted gene transfer. *Bioconjug Chem*. 2003 Jan-Feb; 14(1): 222-31.

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

Lebrethon MC, Naville D, Begeot M, Saez JM. Regulation of ACTH receptor mRNA and binding sites by ACTH and angiotensin II in cultured human and bovine adrenal fasciculata cells. *Endocr Res*. 1995 Feb-May; 21(1-2): 157-68.

Lemarchand-Beraud T, Valenta L, Vanotti A. Biochemical differences between normal and cancerous thyroid tissue. C.E. Hedinger (ed.) Conference on Throid cancer. 1969; 205-216.

Levy O, Dai G, Riedel C, Ginter CS, Paul EM, Lebowitz AN, Carrasco N. Characterization of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter with an anti-COOH terminus antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 May 27; 94(11): 5568-73.

Levy O, Ginter CS, De la Vieja A, Levy D, Carrasco N. Identification of a structural requirement for thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) function from analysis of a mutation that causes human congenital hypothyroidism. *FEBS Lett.* 1998a Jun 5; 429(1): 36-40.

Levy O, De la Vieja A, Ginter CS, Riedel C, Dai G, Carrasco N. N-linked glycosylation of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS). Implications for its secondary structure model. *J Biol Chem.* 1998b Aug 28; 273(35): 22657-63.

Mandell RB, Mandell LZ, Link jr. CJ. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene. *Cancer Res.* 1999 Feb 1; 59(3): 661-8.

Mazzaferri EL, Jhiang SM. Long-term impact of initial surgical and medical therapy on papillary and follicular thyroid cancer. *Am J Med.* 1994 Nov; 97(5): 418-28. Erratum in: *Am J Med.* 1995 Feb; 98(2): 215.

Mazzaferri EL, Robyn J. Postsurgical management of differentiated thyroid carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 1996 Aug; 29(4): 637-62. Review.

Mazzaferri EL, Kloos RT. Clinical review 128: Current approaches to primary therapy for papillary and follicular thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 Apr; 86(4): 1447-63. Review.

McFarlane DA. Cancer of the adrenal cortex: the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl.* 1958; 23: 155.

Mitrofanova E, Unfer R, Vahanian N, Kane S, Carvour M, Link C. Effective growth arrest of human colon cancer in mice, using rat sodium iodide symporter and radioiodide therapy. *Hum Gene Ther.* 2005 Nov; 16(11): 1333-7.

Moon DH, Lee SJ, Park KY, Park KK, Ahn SH, Pai MS, Chang H, Lee HK, Ahn IM. Correlation between 99mTc-pertechnetate uptakes and expressions of human sodium iodide symporter gene in breast tumor tissues. *Nucl Med Biol.* 2001 Oct; 28(7): 829-34.

Morris JC, Bergert ER, Bryant WP. Binding of immunoglobulin G from patients with autoimmune thyroid disease to rat sodium-iodide symporter peptides: evidence for the iodide transporter as an autoantigen. *Thyroid*. 1997 Aug; 7(4): 527-34.

Mountjoy KG, Bird IM, Rainey WE, Cone RD. ACTH induces up-regulation of ACTH receptor mRNA in mouse and human adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 1994 Feb; 99(1): R17-20.

Nakamoto Y, Saga T, Misaki T, Kobayashi H, Sato N, Ishimori T, Kosugi S, Sakahara H, Konishi J. Establishment and characterization of a breast cancer cell line expressing Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporters for radioiodide concentrator gene therapy. *J Nucl Med*. 2000 Nov; 41(11): 1898-904.

Naville D, Penhoat A, Barjhoux L, Jaillard C, Fontanay S, Saez J, Durand P, Begeot M. Characterization of the human ACTH receptor gene and in vitro expression. *Endocr Res*. 1996 Nov; 22(4): 337-48.

Naville D, Jaillard C, Barjhoux L, Durand P, Begeot M. Genomic structure and promoter characterization of the human ACTH receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Jan 3; 230(1): 7-12.

Ogris M, Walker G, Blessing T, Kircheis R, Wolschek M, Wagner E. Tumor-targeted gene therapy: strategies for the preparation of ligand-polyethylene glycol-polyethylenimine/DNA complexes. *J Control Release*. 2003 Aug 28; 91(1-2): 173-81.

Park HJ, Kim JY, Park KY, Gong G, Hong SJ, Ahn IM. Expressions of human sodium iodide symporter mRNA in primary and metastatic papillary thyroid carcinomas. *Thyroid*. 2000 Mar; 10(3): 211-7.

Pekary AE, Levin SR, Johnson DG, Berg L, Hershman JM. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) inhibit the expression and activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>(+)</sup>-ATPase in FRTL-5 rat thyroid cells. *J Interferon Cytokine Res*. 1997 Apr; 17(4): 185-95.

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

Penhoat A, Jaillard C, Saez JM. Corticotropin positively regulates its own receptors and cAMP response in cultured bovine adrenal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Jul; 86(13): 4978-81.

Penhoat A, Lebrethon MC, Begeot M, Saez JM. Regulation of ACTH receptor mRNA and binding sites by ACTH and angiotensin II in cultured human and bovine adrenal fasciculata cells. *Endocr Res*. 1995 Feb-May; 21(1-2): 157-68.

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

Petrich T, Helmeke HJ, Meyer GJ, Knapp WH, Potter E. Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002 Jul; 29(7): 842-54.

Petrich T, Knapp WH, Pötter E. Functional activity of human sodium/ iodide symporter in tumor cell lines. *Nuklearmedizin*. 2003; 42: 15-18.

Petrich T, Quintanilla-Martinez L, Korkmaz Z, Samson E, Helmeke HJ, Meyer GJ, Knapp WH, Pötter E. Effective cancer therapy with the  $\alpha$ -particle emitter [211-At]astatine in a mouse model of genetically modified sodium/iodide symporter-expressing tumors. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 1342-1348.

Picard-Hagen N, Penhoat A, Hue D, Jaillard C, Durand P. Glucocorticoids enhance corticotropin receptor mRNA levels in ovine adrenocortical cells. *J Mol Endocrinol*. 1997 Aug; 19(1): 29-36.

Pinke LA, Dean DS, Bergert ER, Spitzweg C, Dutton CM, Morris JC. Cloning of the mouse sodium iodide symporter. *Thyroid* 2001; 11: 935-939.

Plummer HS. Results of administering iodine to patients having exophthalmic goiter. *JAMA*. 1923; 80: 1955.

Pohlenz J, Duprez L, Weiss RE, Vassart G, Refetoff S, Costagliola S. Failure of membrane targeting causes the functional defect of two mutant sodium iodide symporters. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Jul; 85(7): 2366-9.

Raben MS. The paradoxical effect of thiocyanate and of thyrotropin on the organic binding of iodine by the thyroid in the presence of large amounts of iodide. *Endocrinology*. 1949, 45: 296-304.

Riedel C, Levy O, Carrasco N. Post-transcriptional regulation of the sodium/iodide symporter by thyrotropin. *J Biol Chem*. 2001 Jun 15; 276(24): 21458-63.

Rodriguez A-M, Perron B, Lacroix L, Caillou B, Leblanc G, Schlumberger M, Bidart J-M, Pourcher T. Identification and characterization of a putative human iodide transporter located at the apical membrane of thyreocytes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jul; 87(7): 3500-3.

Rudnicka L, Sinczak A, Szybinski P, Huszno B, Stachura J. Expression of the Na(+)/I(-) symporter in invasive ductal breast cancer. *Folia Histochem Cytophys*. 2003; 41: 37-40.

Russo D, Bulotta S, Bruno R, Arturi F, Giannasio P, Derwahl M, Bidart J-M, Schlumberger M, Filetti S. Sodium/iodide symporter (NIS) and pendrin are expressed differently in hot and cold nodules of thyroid toxic multinodular goiter. *Eur J Endocrinol* 2001; 145: 591-597.

Saez JM, Morera AM, Dazord A. Mediators of the effects of ACTH on adrenal cells. *Adv Cyclic Nucleotide Res*. 1981; 14: 563-79.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Nakazato M, Kogai T, Onaya T. Increased expression of the Na+/I- symporter in cultured human thyroid cells exposed to thyrotropin and in Graves' thyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Oct; 82(10): 3331-6.

Saito T, Endo T, Kawaguchi A, Ikeda M, Katoh R, Kawaoi A, Muramatsu A, Onaya T. Increased expression of the sodium/iodide symporter in papillary thyroid carcinomas. *J Clin Invest.* 1998 Apr 1; 101(7): 1296-300.

Schipper ML, Weber A, Behe M, Göke R, Joba W, Schmidt H, Bert T, Simon B, Arnold R, Heufelder AE, Behr TM. Radioiodide treatment after sodium iodide symporter gene transfer is highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells. *Cancer Res.* 2003 Mar 15; 63(6): 1333-8.

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

Scholz IV, Cengic N, Goke B, Morris JC, Spitzweg C. Dexamethasone enhances the cytotoxic effect of radioiodine therapy in prostate cancer cells expressing the sodium iodide symporter. *J Clin Endocrinol Metabol.* 2004 Mar; 89(3): 1108-16.

Scholz IV, Cengic N, Baker CH, Harrington KJ, Maletz K, Bergert ER, Vile R, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. Radioiodine therapy of colon cancer following tissue-specific sodium iodide symporter gene transfer. *Gene Ther.* 2005 Feb; 12(3): 272-80.

Schroder-van der Elst JP, van der Heide D, Kastelijn J, Rousset B, Obregon MJ. The expression of the sodium/iodide symporter is up-regulated in the thyroid of fetuses of iodine-deficient rats. *Endocrinology.* 2001 Sep; 142(9): 3736-41.

Scott DA, Wang R, Kreman TM, Sheffield VC, Karniski LP. The Pendred syndrome gene encodes a chloride-iodide transport protein. *Nat Genet.* 1999 Apr; 21(4): 440-3.

Shah NM, Eskin BA, Krouse TB, Sparks CE. Iodoprotein formation by rat mammary glands during pregnancy and early postpartum period. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1986; 181: 443-449.

Shimura H, Haraguchi K, Miyazaki A, Endo T, Onaya T. Iodide uptake and experimental <sup>131</sup>I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene. *Endocrinology*. 1997 Oct; 138(10): 4493-6.

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

Slominski A, Ermak G, Mihm M. ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jul; 81(7): 2746-9.

Smanik PA, Liu Q, Furminger TL, Ryu K, Xing S, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Sep 13; 226(2): 339-45.

Smanik PA, Ryu KY, Theil KS, Mazzaferri EL, Jhiang SM. Expression, exon-intron organization, and chromosome mapping of the human sodium iodide symporter. *Endocrinology*. 1997 Aug; 138(8): 3555-8.

Smit JW, Schröder-van der Elst JP, Karperien M, Que I, van der Pluijm G, Goslings B, Romijn JA, van der Heide D. Reestablishment of *in vitro* and *in vivo* iodide uptake by transfection of the human sodium iodide symporter (hNIS) in a NIS defective human thyroid carcinoma cell line. *Thyroid*. 2000; 10: 939-943.

Smit JW, Schroder-van der Elst JP, Karperien M, Que I, Stokkel M, van der Heide D, Romijn JA. Iodide kinetics and experimental (<sup>131</sup>I) therapy in a xenotransplanted human sodium-iodide symporter-transfected human follicular thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Mar; 87(3): 1247-53.

Spitzweg C, Joba W, Eisenmenger W, Heufelder AE. Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyreoidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland and gastric mucosa. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 May; 83(5): 1746-51.

Spitzweg C, Zhang S, Bergert ER, Castro MR, McIver B, Heufelder AE, Tindall DJ, Young CYF, Morris JC. Prostate-specific antigen (PSA) Promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines. *Cancer Res.* 1999a May 1; 59(9): 2136-41.

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

Spitzweg C, O'Connor MK, Bergert ER, Tindall DJ, Young CYF, Morris JC. Treatment of prostate cancer by radioiodine therapy after tissue-specific expression of the sodium iodide symporter. *Cancer Res.* 2000 Nov 15; 60(22): 6526-30.

Spitzweg C, Harrington KJ, Pinke LA, Vile RG, Morris JC. Clinical review 132: The sodium iodide symporter and its potential role in cancer therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001a Jul; 86(7):3327-35.

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

Spitzweg C, Morris JC. Approaches to gene therapy with sodium/iodide symporter. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2001c;109(1): 56-9.

Spitzweg C, Dutton CM ; Castro MR, Bergert ER, Goellner JR, Heufelder AE, Morris JC. Expression of the sodium iodide symporter in human kidney. *Kidney Int.* 2001d Mar; 59(3):1013-23.

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

Spitzweg C. [The sodium-iodide symporter. Pathophysiologic, diagnostic and therapeutic significance] *Internist (Berl).* 2003a Apr; 44(4): 396-402, 404-8, 410-1.

Spitzweg C, Scholz IV, Bergert ER, Tindall DJ, Young CYF, Göke B, Morris JC. Retinoic acid-induced stimulation of sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of radioiodine in prostate cancer cells. *Endocrinology*. 2003b Aug; 144(8): 3423-32.

Spitzweg C. Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS): Bedeutung für die Bildgebung und therapeutische Optionen. The sodium iodide symporter: its implications for imaging and therapy. *Nuklearmediziner*. 2007a; 30: 19-30.

Spitzweg C, Baker CH, Bergert ER, O'Connor MK, Morris JC. Image-guided radioiodide therapy of medullary thyroid cancer after carcinoembryonic antigen promoter-targeted sodium iodide symporter gene expression. *Hum Gene Ther*. 2007b Oct; 18(10): 916-24.

Stanbury JB and Dumont JE. Familial goiter and related disorders. 1983; 231-169, McGraw-Hill, New York.

Strum JM. Site of iodination in rat mammary gland. *Anat Rec*. 1978; 192: 235-244.

Suzuki K, Mori A, Saito J, Moriyama E, Ullianich L, Kohn LD. Follicular thyroglobulin suppresses iodide uptake by suppressing expression of the sodium/iodide symporter gene. *Endocrinology*. 1999 Nov; 140(11): 5422-30.

Szinnai G, Kosugi S, Derrien C, Lucidarme N, David V, Czernichow P, Polak M. Extending the clinical heterogeneity of iodide transport defect (ITD): a novel mutation R124H of the sodium/iodide symporter gene and review of genotype-phenotype correlations in ITD. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Apr; 91(4): 1199-204.

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

Tonacchera M, Viacava P, Agretti P, de Marco G, Perri A, di Cosmo C, de Servi M, Miccoli P, Lippi F, Naccarato AG, Pinchera A, Chiovato L, Vitti P. Benign nonfunctioning thyroid adenomas are characterized by a defective targeting to cell membrane or a reduced expression of the sodium iodide symporter protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002 Jan; 87(1): 352-7.

Turk J, Henderson WR, Klebanoff SJ, Hubbard WC. Iodination of arachidonic acid mediated by eosinophil peroxidase, myeloperoxidase and lactoperoxidase. *Biochem Biophys Acta*. 1983; 751: 189-200.

Unterholzner S, Willhauck MJ, Cengic N, Schütz M, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. Dexamethasone stimulation of retinoic acid-induced sodium iodide symporter expression and cytotoxicity of  $^{131}\text{I}$  in breast cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Jan; 91(1): 69-78.

Urabe M, Hershman JM, Pang XP, Murakami S, Sugawara M. Effect of lithium on function and growth of thyroid cells in vitro. *Endocrinology*. 1991 Aug; 129(2): 807-14.

Uyttersprot N, Pelgrims N, Carrasco N, Gervy C, Maenhaut C, Dumont JE, Miot F. Moderate doses of iodide in vivo inhibit cell proliferation and the expression of thyroperoxidase and  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter mRNAs in dog thyroid. *Mol Cell Endocrinol*. 1997 Aug 8; 131(2): 195-203.

Valenta L. Metastatic thyroid carcinoma in man concentrating iodide without organification. *J Clin Endocrinol*. 1966; 26: 1317-1324.

Vassart G, Dumont JE. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev*. 1992 Aug; 13(3): 596-611. Review.

Verma IM, Weitzman MD. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74: 711-38.

Wapnir IL, van de Rijn M, Nowels K, Amenta PS, Walton K, Montgomery K, Greco RS, Dohan O, Carrasco N. Immunohistochemical profile of the sodium/iodide symporter in thyroid, breast, and other carcinomas using high density tissue microarrays and conventional sections. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 Apr; 88(4): 1880-8.

Wapnir IL, Goris M, Yudd A, Dohan O, Adelman D, Nowels K, Carrasco N. The  $\text{Na}^+/\text{I}^-$  symporter mediates iodide uptake in breast cancer metastases and can be selectively down-regulated in the thyroid. *Clin Cancer Res*. 2004 Jul 1; 10(13): 4294-302. Erratum in: *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 15; 10(22): 7787.

Weiss SJ, Philp NJ, Ambesi-Impiombato FS, Grollman EF. Thyrotropin-stimulated iodide transport mediated by adenosine 3',5'-monophosphate and dependent on protein synthesis. *Endocrinology*. 1984 Apr; 114(4): 1099-107.

Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Senekowitsch-Schmidtke R, Wunderlich N, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. Functional sodium iodide symporter expression in breast cancer xenografts *in vivo* after systemic treatment with retinoic acid and dexamethasone. *Breast Cancer Res Treat*. 2007a Jul 18.

Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Gildehaus FJ, Wolf I, Senekowitsch-Schmidtke R, Stark HJ, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. Application of <sup>188</sup>Rhenium as an alternative radionuclide for treatment of prostate cancer after tumor-specific sodium iodide symporter gene expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007b Nov; 92(11): 4451-8. Epub 2007 Aug 14.

Willhauck MJ, Sharif-Samani B, Cengic N, Mohr L, Geissler M, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. Alpha fetoprotein Promoter-targeted sodium iodide symporter gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Gene Ther*. 2008a Feb; 15(3): 214-23. Epub 2007 Nov 8.

Willhauck MJ, Sharif Samani BR, Wolf I, Senekowitsch-Schmidtke R, Stark HJ, Meyer GJ, Knapp W, Göke B, Morris JC, Spitzweg C. The potential of Astatine-211 for NIS-mediated radionuclide therapy in prostate cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2008b, Jul; 35(7): 1272-81. Epub 2008 Apr 11.

Wolf FJ. Transport of iodide and other anions in the thyroid gland. *Physiol Rev*. 1964; 44:45-90.

Wolff J, Chaikoff IL. Plasma inorganic iodide as a homeostatic regulator of thyroid function. *J Biol Chem*. 1048; 174: 555–564.

Zhang L, Sharma S, Zhu LX, Kogai T, Hershman JM, Brent GA, Dubinett SM, Huang M. Nonradioactive iodide effectively induces apoptosis in genetically modified lung cancer cells. *Cancer Res*. 2003; 63: 5065-5072.

## 7 ABKÜRZUNGEN

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
bp	Basenpaar(e)
Bq	Bequerel
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute
CT	Computertomographie
CTP	Cytidin-5`-Triphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
g	Beschleunigungskonstante
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
h	Stunde
IFN-γ	Interferon-gamma
IGF-II	Insulin-like growth factor II
IL	Interleukin
kb	Kilobase(n)
kg	Kilogramm
l	Liter
M	Mol/Liter
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N	molare Masse
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPECT	Single-Photonen-Emissions-Computertomographie
SSC	standard sodium citrate
TNF-α	Tumornekrosefaktor-Alpha
TGF-β	transforming growth factor-β
TPP	Thymidin-5`-Triphosphat
U	Umdrehung/Minute
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## **8 DANKSAGUNG**

Herrn **Prof. Dr. med. B. Göke** danke ich für die ausgezeichneten Arbeits- und Rahmenbedingungen während meiner Forschungsarbeiten im Labor von PD Dr. Spitzweg in der II. Medizinischen Klinik am Klinikum Großhadern.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Doktormutter **Frau Priv. Doz. Dr. med. Christine Spitzweg** für Ihre unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die kompetente Anleitung und die Überlassung dieses interessanten Forschungsthemas.

**Dr. med. Neziha Cengic** und **Stefanie Unterholzner** danke ich für ihre stetige Betreuung und Hilfsbereitschaft bei der Erstellung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt gilt mein Dank **Dr. med. M. Willhauck, B. Sharif-Samani, K. Klutz, N. Wunderlich und allen Laborkollegen/innen** in der Arbeitsgruppe um PD Dr. Spitzweg für ihre Unterstützung und die kollegiale Arbeitsatmosphäre.

## **9 LEBENSLAUF**

### **Angaben zur Person**

Name : Christiane Leistner  
Geburtstag : 30.12.1979  
Geburtsort : Salzburg/Österreich

### **Ausbildung**

09/1986 – 07/1990	Grundschule Laufen
09/1990 – 07/1999	Rottmayr-Gymnasium Laufen
WS 1999 – SS 2001	Vorklinisches Studium an der LMU München
WS 2001 – SS 2004	Klinisches Studium an der LMU München
10/2004	Beginn des Praktischen Jahres
10/2004-02/2005	1. Tertiair Chirurgie am Princess Alexandra Hospital in Brisbane/Australien und am Klinikum Großhadern in München
02/2005-05/2005	2. Tertiair Pädiatrie am Dr.-v.-Haunerschen Kinderspital in München
05/2005-09/2005	3. Tertiair Innere Medizin am KH Schwabing in München

### **Beruflicher Werdegang**

seit 01/2006 Assistenzärztin im Fach für Kinderheilkunde am Klinikum Coburg mit Facharztvertrag

### **Abschlüsse**

07/1999 Abitur mit der Abschlussnote 1,0  
08/2002 Abschluss des 1. Staatsexamens mit der Note 2,0  
09/2004 Abschluss des 2. Staatsexamens mit der Note 1,6

10/2005	Abschluss des 3. Staatsexamens mit der Note 1,0
10/2005	Abschluss des Klinischen Studiums an der LMU München mit der Note 1,49

### **Praktika**

02-03/2002	Chirurgie-Famulatur an der Salzachklinik Fridolfing
03-04/2003	Anästhesie-Famulatur am Gold Coast Hospital in Southport/Australien
09-10/2003	Radiologie-Famulatur am Klinikum Großhadern
02-03/2004	Praxisfamulatur in einer allgemeinärztlichen/ sportmedizinischen Praxis in Freising

### **Studien- bzw. berufsbegleitende Tätigkeiten**

10/2001 – 02/2004	Erfolgreiche Teilnahme an den vier Harvard Medical Alliance Kursen der LMU München (Kardiovaskulärer Kurs, Kursus Infektionskrankheiten und Immunologie, Kursus Erkrankungen und Verletzungen des Muskuloskelettalen Systems, Kursus Nervensystem und Verhalten)
SS 2002 – SS 2003	Teilnahme an den Vorlesungen der Tropenmedizin sowie am tropenmedizinischen Diagnostikkurs der LMU

### **Publikationen**

“ Radioiodine therapy of adrenocortical cancer following ACTH-receptor promoter-driven expression of the sodium iodide symporter “- *in Vorbereitung*