

**Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der
Universität München**

Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Der Einfluss von Natrium-Selenit auf die Apoptose in isolierten humanen
Schilddrüsenfollikeln**

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

vorgelegt von

Petra Lehmann

aus
München

2004

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Roland Gärtner

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. B. Fichtl
Prof. Dr. med. H.P. Schwarz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. med. h. c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 04.11.2004

Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. Roland Gärtner für die Bereitstellung des Themas, die gründliche und ausführliche Betreuung während des experimentellen Teils, sowie für die vielen konstruktiven Gespräche und geistigen Anregungen mit denen er mir bei der Ausarbeitung zur Seite stand.

Ebenso danke ich Herrn Bjarne Krebs für die verschiedenen hilfreichen Beiträge und vor allem für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Herrn Prof. Dr. med. Zimmermann und dem OP-Team der Maria-Theresia-Klinik danke ich für die zuverlässige Bereitstellung der Gewebeproben.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Petra Rank für die kompetente Einführung in die Tücken der Laborarbeit, die harmonische Zusammenarbeit in guten und in schlechten Zeiten, sowie für ihre Geduld und Ausdauer, die sie Follikeln und Doktorandin gegenüber bewies.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits als Poster vorgestellt:

85th Meeting of the Endocrine Society, Philadelphia, 2003

Selenium supplementation inhibits apoptosis in human thyroid follicles in vitro induced by iodide, EGF, TGF- β and H₂O₂.

R. Gärtner, P. Lehmann, P. Rank, M. Angstwurm

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Spurenelement Selen	1
1.1.1. Allgemeine Informationen	1
1.1.2. Verstoffwechslung und molekularer Wirkmechanismus	2
1.1.3. Bedeutung für den Organismus	3
1.2. Die Bedeutung von Selen für die Funktion der Schilddrüse	6
1.2.1. Aufrechterhaltung des Redoxpotenzials in Thyreocyten	6
1.2.2. Folgen eines Selenmangels für die Schilddrüse	7
1.2.3. Beeinflussung des Hormonmetabolismus durch die Dejodinasen	8
1.3. Apoptose	9
1.3.1. Definition, Unterscheidung zur Nekrose und Ablauf	9
1.3.2. Apoptose in physiologischen und pathologischen Prozessen	9
1.3.3. Mechanismus und Auslöser	10
1.4. Apoptose in der Schilddrüse	12
1.4.1. Induktion und Ablauf	12
1.4.2. Zusammenhang mit Erkrankungen der Schilddrüse	14
1.5. Zielsetzung der Arbeit	16
2. MATERIALIEN UND METHODEN	17
2.1. Materialien	17
2.1.1. Geräte	17
2.1.2. Arbeitsmaterial	18
2.1.3. Substanzen	19
2.2. Medien und Pufferlösungen	20
2.2.1. Zellkultur	20
2.2.2. Präparationsmedium	20
2.2.3. Pufferlösungen	21
2.3. Allgemeine Arbeitsbedingungen	21

2.4. Methoden	22
2.4.1. Versuchsaufbau	22
2.4.2. Materialgewinnung	22
2.4.3. Präparation des Gewebes	23
2.4.4. Zellkultursystem	24
2.4.5. Induktion der Apoptose	26
2.4.6. Apoptosebestimmung mit Gel-Elektrophorese	26
2.4.7. Apoptosebestimmung mittels Nucleosomen-ELISA	30
2.4.8. Apoptosebestimmung mittels Mitochondrial Potential Assay	32
2.5. Statistische Auswertung	34
3. ERGEBNISSE	35
3.1. Apoptosenachweis mit Gel-Elektrophorese	35
3.2. Apoptosenachweis mit ELISA	35
3.3. Apoptosenachweis mit Mitochondrial Potential Assay	37
3.3.1. Einfluss von Kaliumjodid, TSH, TGF- β und H ₂ O ₂	37
3.3.2. Kontrollzellen	38
3.3.3. Der Einfluss von Selen auf die Apoptoserate	42
3.3.4. Der Einfluss von Methimazol auf die Apoptoserate nach Stimulation mit KJ 20 μ M und EGF 5 ng/ml	48
3.4. Messung der Schilddrüsenhormone aus dem Überstand	50
4. DISKUSSION	52
4.1. Diskussion der Methoden	52
4.1.1. Zellkultur	52
4.1.2. Nachweis der Apoptose	53
4.1.3. Fazit	58
4.2. Diskussion der Ergebnisse	59
4.2.1. Induktion der Apoptose	59
4.2.2. Inhibition der Hormonsynthese durch Methimazol	62
4.2.3. Die Auswirkungen von Selen auf die Apoptoserate	63
4.2.4. Proapoptotische Wirkung von Selen	65
4.2.5. Apoptoseinduktion über das Redoxpotenzial der Zelle	66
4.2.6. Schlussfolgerung	67
5. ZUSAMMENFASSUNG	69
6. LITERATURVERZEICHNIS	71

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:

ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FCS	fetal calf serum
GHL	Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Acetat
GPx	Glutathionperoxidase
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
KJ	Kaliumjodid
MMI	Methimazol
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamiddinucleotidphosphat
NaOH	Natronlauge
PBS	Phosphatpuffer
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SA-HRP	Streptavidin-horse radish peroxidase
SSC	Natriumcitratpuffer
TAE	Tris-, Essigsäure-, EDTA-Puffer
TGF-β	transforming growth factor-β
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor - α
TRx	Thioredoxinreduktase
TSH	thyreocystenstimulierendes Hormon

1. EINLEITUNG

Körperliche Gesundheit ist zu einem großen Teil abhängig von dem, was wir mit der Nahrung aufnehmen und unserem Organismus als Baustein zur Verfügung stellen. Wichtige Funktionen erfüllen Vitamine und Spurenelemente mit antioxidativer Wirkung. Vertreter dieser Gruppe sind unter anderem Vitamin C und E, β -Carotene, Phenole und Metalle wie Selen. Sie wirken als Co-Faktoren enzymatischer Reaktionen oder schützen durch Neutralisierung von freien Radikalen die DNA und das Redoxpotenzial von Zellen und Membranen. Mangel an diesen Substanzen führt, je nach Schweregrad und Kompensationsmöglichkeit, zu spezifischer Symptomatik und zeigte sich in epidemiologischen Studien als erhöhtes Risiko für maligne Tumore des Magen-Darm-Traktes, der Lunge, der Mamma und der Prostata. Selen nimmt eine Sonderstellung ein und hat, gemäß neuerer Erkenntnisse, neben seiner Funktion als Radikalfänger auch die Fähigkeiten, auf DNA-Reparatur und Apoptoseverhalten einzuwirken (Brash et Havre, 2002).

1.1. Das Spurenelement Selen

1.1.1. Allgemeine Informationen

Selen gilt heute als lebenswichtiger Bestandteil unserer Nahrung. Das Spurenelement wurde bereits 1817 von dem Chemiker Berzelius entdeckt. Über lange Zeit stand jedoch die Toxizität im Vordergrund. Seine Rehabilitation erfolgte erst 1957, als die essentielle Bedeutung für Säugetiere bewiesen werden konnte (Schwarz und Foltz, 1957). Forschungsarbeiten der letzten Jahre konnten eine antioxidative und tumorprotektive Wirkung zeigen und lassen auf prophylaktischen und therapeutischen Nutzen von Selen hoffen.

Selen wird über die Nahrung aufgenommen. Fleisch, Fisch und Getreideprodukte sind dabei die Hauptquellen (Rayman, 2000). Die empfohlene Tagesmenge definiert sich am Aktivitätsmaximum der plasmatischen Glutathionperoxidase. Laut der Deutschen Gesellschaft für Ernährung beträgt sie 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, der amerikanische RDI (recommended dietary intake) sieht

55 µg/d vor (Gaßmann et al., 2000). Der Plasmaspiegel sollte optimal bei 95 µg/l liegen (Thomson et al., 1993). Die durchschnittliche Aufnahme mit der Nahrung ist, da abhängig von der Anreicherung im Boden, starken regionalen Schwankungen unterworfen. Europäische Länder liegen meist weit unter dem empfohlenen Bereich - die täglich konsumierte Menge in Deutschland liegt bei 35 µg/d. Extrem selenarme Gegenden, in denen es ohne entsprechende Substitution zu gravierenden Mangelerscheinungen kommt, befinden sich in China und im Kongo bzw. ehemaligen Zaire (Rayman, 2000).

1.1.2. Verstoffwechslung und molekularer Wirkmechanismus

Selen kann in anorganischer Form als Selenit oder Selenat vorliegen. Biologisch wichtiger sind jedoch seine organischen Verbindungen Selenomethionin und vor allem Selenocystein, das als 21. Aminosäure mit eigener DNA-Codierung im Körper einen Bestandteil enzymaler Proteine darstellt (Forth et al., 1998).

Der Wirkmechanismus von Selen auf zellulärer Ebene erfolgt über die Bildung verschiedener Metabolite. Durch den Austausch von Schwefel in der Aminosäure Cystein gegen Selen entsteht das weitaus reaktionsfähigere Selenocystein (Thanbichler und Böck, 2001). Diese Verbindung befindet sich im katalytischen Zentrum verschiedener Enzyme zur Neutralisierung reaktiver Sauerstoffspezies oder Regeneration oxidierter Stoffwechselprodukte (Flohé, 1997). Nach Oxidation wird die Selengruppe unter Verbrauch von zwei Glutathionmolekülen (GSH) wieder reduziert. Dies geschieht über die Bildung eines Selenodisulfids mit einem Glutathion, R-SeOH wird zu R-Se-SG reduziert. Ein zweites GSH regeneriert den Selenrest unter GS-SG-Bildung. GSSG wird anschließend durch NADPH, ein Coenzym aus dem Pentosephosphatweg, wieder in zwei GSH-Moleküle überführt (Forth et al., 1998).

Der Einbau von Selenocystein in seine Zielstrukturen weist einige Besonderheiten gegenüber dem bekannten Mechanismus der Proteinbiosynthese auf. Cotranslational wird aktiviertes Selen (Monoselenphosphat) auf eine spezifische, mit Cystein beladene tRNA übertragen, deren Anticodon UGA eigentlich als Stopp-Codon fungiert. Der Elongationsfaktor (EFsec) und das Protein SBP2, das eine definierte Struktur außerhalb des Leserasters bindet, vermitteln daraufhin den Translationsprozess. Abhängig von der Selenverfügbarkeit kommt

es zum Einbau der Aminosäure oder zum Kettenabbruch. (Thanbichler und Böck, 2001; Tujebajeva et al., 2000)

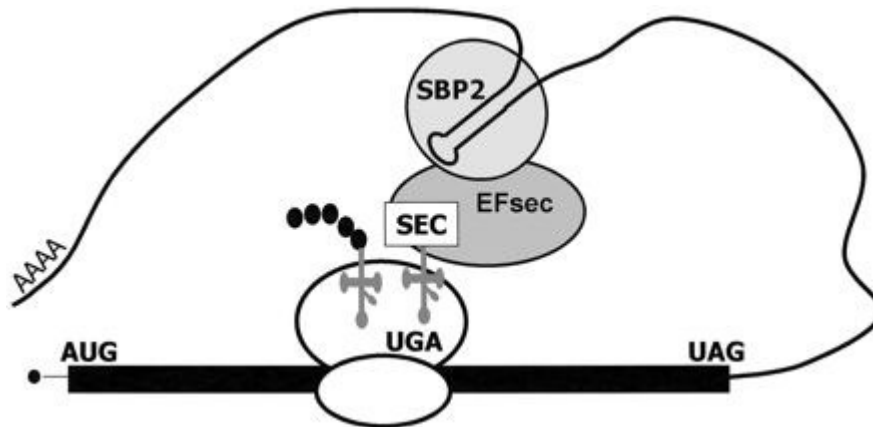


Abbildung 1. Cotranslationaler Einbau von Selenocystein während der Proteinbiosynthese.

1.1.3 Bedeutung für den Organismus

Selen entfaltet seine antioxidative Wirkung im katalytischen Zentrum der so genannten Selenoenzyme. Flohé et al. (1973) entdeckten es als Bestandteil der Glutathionperoxidase (GPx), ebenso stellten sich die Typ-I-Dejodinase (Behne et al., 1990; Arthur et al., 1990) und Thioredoxinreduktase (TRx) (Tamura und Stadtman, 1996) als selenocysteinhaltig heraus. Mittels elektrophoretischer Auftrennung von ^{75}Se -markierten Proteinen ließ sich die Anzahl der verschiedenen Selenoproteine im menschlichen Organismus auf 30-50 schätzen (Behne et al., 1989). Nur wenige davon sind bisher charakterisiert.

Die Glutathionperoxidase existiert in vier verschiedenen Isoformen (cytosolische-, plasmatische-, gastrointestinale- und Phospholipid-Hydroperoxid-GPx), die gewebespezifisch exprimiert werden. Durch die Detoxifikation reaktiver Sauerstoffradikale und Lipidperoxide schützt das Enzym Zellen und deren Membranen vor oxidativem Stress. Von Bedeutung ist die GPx auch für die Regeneration von NADPH über den Pentosephosphat. NADPH dient zum einen der Stabilisierung des Redoxpotentials in Erythrocyten und ist zum anderen in reduktive, metabolische Prozesse, wie die Prostaglandin- und Steroidsynthese (Köhrle et al., 2000) involviert.

Auch die Thioredoxinreduktase funktioniert über Aufrechterhaltung des Redox-Potenzials. Hierbei wirkt sie speziell im Zellkern zum Schutz der DNA. Weiterhin werden korrekte Proteinfaltung sowie Protein-/DNA-Interaktionen ermöglicht (Wu et al., 1996). Auch bei der Bindung von Transkriptionsfaktoren, wie NF κ B, oder Hormonen an die DNA spielt die TRx eine wichtige Rolle (Mitomo et al., 1994). Durch Expression in Monocyten und Makrophagen zur Verminderung von oxidativem Stress, während deren Aktivierung und Phagozytose, kommt dem Enzym eine entscheidende Bedeutung im Immunsystem zu (Ebert-Dümig et al., 1999).

Selenoprotein P scheint durch seine hohe Selenbindungsfähigkeit als Transportprotein zu agieren. Ferner wird eine extrazelluläre, antioxidative Wirkung, vor allem auf Endothelzellen vermutet. (Schütze et al., 1998)

Ein Ausfall dieser Funktionen führt zu spezifischen Krankheitsbildern. In Mangelgebieten von China wurde eine endemische Kardiomyopathie, die Keshan-Krankheit, diagnostiziert. Als Ursache wird ein normalerweise harmloses Cocksackie-Virus diskutiert, das unter Selenmangel zu einer pathogenen Variante mutiert (Ge et al., 1993; Beck et al., 1995). Ebenso wird Selenmangel dort für das Entstehen von Kashin-Beck, einer Osteoarthropathie, verantwortlich gemacht (Yang et al., 1993).

Es zeigte sich in Studien, dass eine Erhöhung der Selenaufnahme mit der Nahrung zur Optimierung verschiedener Systeme im Organismus führen kann. Das Immunsystem kann beispielsweise hiervon profitieren. Selen fördert die Proliferation von aktivierten T-Lymphocyten, natürlichen Killerzellen und deren Expression von Il-2 Rezeptoren (Kiremidjian et al., 1994). Der Selenbedarf scheint bei aktivierter Abwehr erhöht, da unter diesen Umständen in immunkompetenten Zellen eine vermehrte Expression der Selenophosphat synthetase gemessen werden kann (Giumaraes et al., 1996). Besondere Bedeutung kommt dem Spurenelement auch bei HIV-Infektion vor. Studien belegten einen parallel zur T4-Zell-Abnahme sinkenden Plasmaspiegel (Look et al., 1997). Darüber hinaus wirkt Selen, durch die redox-abhängige Verminderung intrazellulärer TNF- α - und NF κ B-Spiegel, in vitro antireplikativ auf das Virus (Hori et al., 1997).

Mehrere große epidemiologische Studien bewiesen eine inverse Korrelation zwischen Tumorsterblichkeit und durchschnittlicher Selenaufnahme, beziehungsweise der Höhe des Plasmaspiegels (Shamberger und Frost, 1969; Combs et al., 1998; Yu et al., 1997). In klinischen Untersuchungen an Mensch und Tier zeigte sich, dass die tumorpäventive Wirkung von Selen in zwei Phasen abläuft. Durch Beseitigung eines Defizits wird die Aktivität antioxidativer Enzyme gesteigert. Doch auch nach Selengaben, die höher sind als zu deren Sättigung nötig wäre, können Individuen noch davon profitieren. Es werden hierfür andere Mechanismen diskutiert, wie der hemmende Einfluss höherer Dosen auf Zellzyklus und Zellwachstum, sowie eine apoptosebegünstigende Wirkung (Ganther, 1999). Seo et al. (2002) entdeckten, dass Selenomethionin über ein reduziertes Substrat (Ref-1) zur Aktivierung von p53 führt, das in diesem Fall, nicht wie im Allgemeinen bekannt, Apoptose, sondern einen Reparaturmechanismus der DNA induziert (siehe Abbildung 2).

Weitere Vorteile einer ausreichenden Selensubstitution zeigten sich in der Intensivmedizin (Gärtner et al., 1997c; Wagner et al., 1994). Septische Patienten weisen bereits bei Aufnahme einen geringeren Plasmaselenspiegel und eine erniedrigte GPx-Aktivität auf. Selen-substitution wirkt sich positiv auf den Krankheitsverlauf und die Mortalität aus. Auch für die Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen (Kardinaal et al., 1997) und hinsichtlich des Auftretens von Depressionen (Hawkes et al., 1996) konnte in Studien bessere Ergebnisse durch Selen erzielt werden.

Ein Zuviel „des Guten“ allerdings führt zu Vergiftungserscheinungen. Einnahmen über 400 µg/d sind nicht empfohlen (Gaßman et al., 2000). In der Regel handelt es sich um chronische Vergiftungen, die durch eine übermäßige Zufuhr zustande kommen, doch auch eine Aufnahme über Haut und Lunge ist - je nach Selenverbindung - möglich. Es kann zu Veränderungen an Haaren und Nägeln sowie gastrointestinalen Störungen, Neuropathien und Reizbarkeit kommen. Topisch können Dermatitisen und Schleimhautreizungen entstehen (Forth et al., 1998).

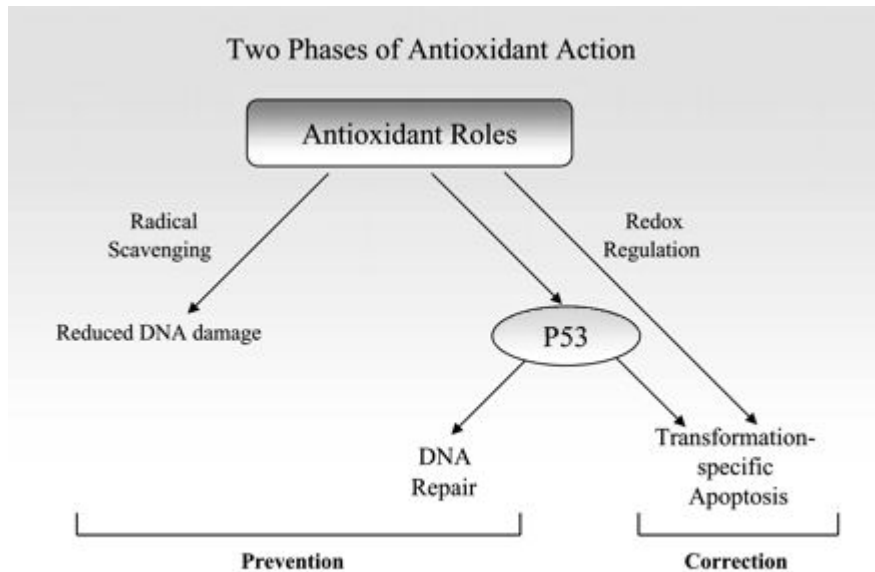


Abbildung 2. Der zweiphasige Wirkungsmechanismen von Selen bei der Tumorigenese. Darstellung seiner Funktion als Radikalfänger sowie seiner Fähigkeiten auf DNA-Reparatur und Apoptose Einfluss zu nehmen

1.2. Die Bedeutung von Selen für die Funktion der Schilddrüse

1.2.1. Aufrechterhaltung des Redoxpotenzials in Thyreocyten

Selen ist von fundamentaler Bedeutung für eine intakte Funktion der Thyreocyten. Im Schilddrüsengewebe findet sich die höchste organbezogene Selenkonzentration, die auch unter Mangelbedingungen lange Zeit aufrechterhalten wird (Köhrle, 1999).

Während der Hormonsynthese wird Jodid zum Einbau in Thyreoglobulin oxidiert. H_2O_2 dient hierbei als Elektronenempfänger. Zur Eliminierung überschüssiger, reaktiver Substanzen bedarf es eines potenten Systems an Radikalfängern. Es wird angenommen, dass diese Aufgabe vor allem der Glutathionperoxidase zukommt. Das Selenoenzym wird in seiner aktiven Form von Thyreocyten stark exprimiert und an der apikalen Membran, an der sich auch die Peroxidase befindet, sezerniert (Bermano et al., 1995; Howie et al., 1995).

1.2.2. Folgen eines Selenmangels für die Schilddrüse

Ein Ausfall der selenabhängigen Strukturen durch mangelnde Aufnahme mit der Nahrung führt zu Krankheiten und Störungen im Metabolismus der Schilddrüse. Ein endemisch im Kongo bzw. ehemaligen Zaire auftretendes Krankheitsbild ist der myxödematöse Kretinismus. Die Böden enthalten dort gebietsweise sehr wenig Selen, und auch die Jodversorgung ist unzureichend. Neben den üblichen Folgen eines angeborenen Jodmangels, wie mentale und körperliche Retardierung, kommt es zu einer persistierenden Unterfunktion der Schilddrüse (Goyens et al., 1987). Als Ursache hierfür wird die vermehrte Stimulation der Schilddrüse zum Zeitpunkt der Geburt diskutiert (Lemarchand-Béraud et al., 1972). Die daraus resultierende Steigerung der H_2O_2 -Produktion bei vermindertem antioxidativem Schutz führt zur Zellschädigung und zum fibrotischem Umbau der funktionalen Strukturen (Dumont et al., 1963).

Verschiedene Gewebeuntersuchungen hinsichtlich der Konzentration von Selen und Aktivität der Glutathionperoxidase in der Schilddrüse ergaben Anhaltspunkte für die Entstehung von malignen Erkrankungen unter Selenmangel. In Karzinomgewebe ließ sich ein durchschnittlich geringerer Gehalt an Selen und GPx nachweisen (Köhrle et al., 2000). Weiterhin belegte eine umfassende Studie in Norwegen, die Janus Case Control Study, einen Zusammenhang zwischen einem niedrigen Plasmaselengehalt und dem späteren Auftreten von malignen Schilddrüsenerkrankungen. (Glatré et al., 1989).

Auch die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse scheint durch einen Selenmangel begünstigt. Wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, übernimmt Selen eine wichtige Rolle im Immunsystem. Zudem hat Jod aufgrund der für seine Verstoffwechslung nötige Radikalproduktion eine starke proinflammatorische Wirkung auf selenarmes Schilddrüsengewebe (Contempré et al., 1991). Unzureichende Aufnahme von Selen kann somit das Entstehen von autoimmunen Entzündungsprozessen fördern. In zwei Studien wurde bereits gezeigt, dass durch Selensubstitution bei Patienten mit Hashimoto-Thyreoditis eine drastische Verminderung der Autoantikörper bewirkt werden kann (Duntas et al., 2003; Gärtner et al., 2002; Schmidt et al., 1998).

1.2.3. Beeinflussung des Hormonmetabolismus durch die Dejodinasen

Der Einfluss von Selen auf Schilddrüse und Hormonhaushalt ist nicht nur auf eine antioxidative Wirkung in Thyreocyten zurückzuführen, sondern spielt sich auch auf Ebene des gesamten Hormonmetabolismus ab. Aktivierung und Inaktivierung der Schilddrüsenhormone werden von mindestens drei verschiedenen Enzymen katalysiert, den Dejodinasen Typ I, II und III, die relativ unspezifisch das Jodmolekül in Position 5 des Phenol- oder Tyrosylrings abspalten. Alle drei Enzyme scheinen selenhaltig, wobei jedoch nur die Aktivität Typ I 5'-Dejodinase merklich von der Selenverfügbarkeit abhängig ist. Die Enzyme unterscheiden sich hinsichtlich ihrer organspezifischen Verteilung und der Substrataffinität zu T₄, T₃ und rT₃.

Die höchste Aktivität der Typ I 5'-Dejodinase lässt sich in Schilddrüse, Hypophyse, Nieren und Leber nachweisen, wo sie, hauptsächlich in letztgenanntem Organ, für die Bereitstellung von zirkulierendem T₃ verantwortlich ist. Die Typ II 5'-Dejodinase befindet sich vor allem in ZNS, Hypophyse und braunem Fettgewebe. Ihre Wirkung ist eher auf den lokalen T₃-Bedarf ausgerichtet. Typ III verhindert durch Inaktivierung von T₄ und T₃ deren Akkumulation im Gewebe. Bei Erwachsenen wird sie kaum in Leber, Nieren und Schilddrüse exprimiert. Die größte Bedeutung kommt der Typ III Dejodinase während der embryonalen Entwicklung zu (Köhrle, 1996). Die Konsequenz eines Selenmangels für die Expression der Dejodinasen und deren Auswirkungen auf den T₃/T₄-Metabolismus beim Menschen werden kontrovers diskutiert. Durch größeren experimentellen Spielraum in Tierversuchen konnte bewiesen werden, dass es unter Selenmangel zu einer hierarchischen Abnahme der Aktivität der Typ I 5'-Dejodinase kommt. Für Überleben und Fortpflanzung wichtige Organe wie ZNS, endokrine Drüsen, Ovarien und Testes, speichern vermehrt Selen und können so die Enzymproduktion länger aufrecht erhalten als Leber und Niere (Köhrle, 2000). Ebenso zeigte sich in verschiedenen Studien eine selenmangelbedingte Abnahme von T₃ zugunsten von T₄ (Yu et al., 2002). Vice versa konnte unter Selensubstitution eine Zunahmen von T₃ unter Rückgang von T₄ beobachtet werden (Jianhua et al., 2000).

1.3. Apoptose

1.3.1. Definition, Unterscheidung zur Nekrose und Ablauf

Zelluntergang kann entweder über den Weg der Nekrose oder über die geordneten Bahnen der Apoptose stattfinden. Nekrose beinhaltet Tod durch akute Schädigung in Verbindung mit Ödem, Membranlyse und Austritt der Zellorganellen. Dieser Prozess führt meist zu Entzündung und Funktionsausfall von Gewebe. Die Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, wurde erstmals 1972 von Kerr et al. beschrieben. Es handelt sich, im Gegensatz zur Nekrose, um einen aktiven, energieverbrauchenden Prozess, der immer in typischer Weise über die Ausprägung bestimmter Gene und Enzyme und das Auftreten charakteristischer morphologischer Veränderungen abläuft. Frühzeitig können Abnahme der Zellgröße, Membraneinziehungen und Chromatinkondensation beobachtet werden. Ebenso kommt es schon zu Beginn zur Störung der mitochondriellen Funktion mit Zusammenbruch des Potenzials, Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung und vermehrter Radikalproduktion (Kroemer et Reed, 2000). Die Plasmamembranintegrität bleibt relativ lange erhalten. Erst gegen Ende des Vorgangs verschmelzen Zellmembran und das endoplasmatische Retikulum. Die Zelle löst sich aus dem Gewebsverband und dissoziiert in mehrere kleine, membran-gebundene Teile, den sogenannten Apoptosekörperchen. Diese werden rasch von umliegenden Zellen oder Makrophagen absorbiert. Weiterhin charakteristisch für die Apoptose in ihrer physiologischen Form sind das punktuelle Auftreten und das Fehlen von entzündlichem Geschehen, bei vollem Funktionserhalt des betroffenen Gewebes (Webb et al., 1997).

1.3.2. Apoptose in physiologischen und pathologischen Prozessen

Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für viele physiologische Vorgänge im Körper. Sie steuert Homöostase und Involution der Gewebe (Kiess und Gallaher, 1998), gewährleistet das korrekte Funktionieren des Immunsystems durch Eliminierung autoaggressiver Lymphocyten (Ashkenazi et al., 1999) und spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung (Haanen and Vermees, 1996).

Eine Fehlsteuerung der Apoptose führt zu verschiedenen Krankheitsbildern. Man kann dabei zwischen einem „Mangel bzw. Überschuss“ an Apoptose unterscheiden. Eine zu geringe Apoptoserate wird für das Entstehen von Autoimmunerkrankungen, viralen Infektionen und Tumoren verantwortlich gemacht (Thompson, 1995). So führt ungenügende Apoptose in Immunzellen zum Überleben autoagressiver Lymphocyten. Herpes-, Pox- und Adenoviren können Apoptoseinduktion als Abwehrreaktion des Körpers durch Produktion inhibierender Substanzen verhindern und somit ihre Vermehrung garantieren (Young et al., 1997). Maligne entartete Zellen haben sich von der Abhängigkeit vieler Überlebensfaktoren und von restringierender Zellkommunikation befreit. Durch vermehrte Expression anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-2 oder Mutation wachstumsregulierender Gene, wie p53, scheinen sie eine gewisse Apoptoseresistenz zu erwerben. Dies zeigen auch Korrelationen von Prognose, Ansprechen auf Chemotherapie und Ausprägung dieser Veränderungen (Boise et al., 1993; McDonnell et al., 1992).

Fehlsteuerung im Sinne von gesteigerter Apoptose lässt sich unter anderem bei HIV-Infektion beobachten. CD4+-Zell-Abnahme durch das HI-Virus wird über eine gesteigerte apoptotische Neigung gesteuert. In Untersuchungen erwies sich ein Großteil der zugrundegehenden Lymphocyten als nicht infiziert (Famularo et al., 1997; Gougeon et al., 1998). Auch neurodegenerativen Erkrankungen, wie Parkinson, Alzheimer oder der amyotrophen Lateralsklerose, liegt ein gestörtes Apoptoseverhalten zugrunde (Waldmeier et al., 2003; Pompl et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass mangelnder antioxidativer Schutz oder erhöhte Radikalproduktion hierfür verantwortlich sein könnten (Floyd et al., 2002). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Zellen in der Grenzzone eines Infarktes durch Apoptose zugrunde gehen (Mani et al., 2003). Auch in vitro verringern antiapoptotisch wirkende Substanzen die Ausprägung einer ischämischen Zellschädigung (Feuerstein et al., 2000).

1.3.3. Mechanismus und Auslöser

Man unterscheidet zwischen extrinsischer und intrinsischer Auslösung des programmierten Zelltodes. Die extrinsische, also von außen provozierte Apoptose ist ein hochspezifischer Vorgang und geschieht durch Aktivierung bestimmter Membranrezeptoren. Als Mediatoren agieren Hormone wie Glukokortikoide, T3 und Progesteron, Wachstumsfaktoren wie TGF- β ,

EGF und IGF (Kiess et al., 1998), oder sogenannte „death-factors“ aus der Gruppe der Tumor-Nekrose Faktoren (Nagata, 1997).

Als intrinsische Apoptose-Trigger wirken zellschädigende Mechanismen. Zu nennen sind hier unter anderem oxidativer Stress, Hypoxie, Bestrahlung, Antimetabolite, toxische Substanzen, Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und auch der Entzug von Wachstumsfaktoren oder mangelnder Zell-Zell-Kontakt. Apoptose kann aber ebenfalls durch Viren und Aktivierung bestimmter Gene ausgelöst werden (Thompson, 1995).

Die verschiedenen Auslösemechanismen der Apoptose münden auf zellulärer Ebene letztendlich in eine gemeinsame Endstrecke - die Aktivierung der Caspasen. Die Caspasen sind eine Gruppe von Isoenzymen, die als inaktive Proenzyme bereits im Cytoplasma existieren und sowohl proteolytisch aktiviert werden, wie auch selbst proteolytisch wirken. Ihre Wirkung wird in Form einer Signalkaskade vermittelt. Am Anfang steht die Aktivierung einer Initiatorcaspase, die weitere, exekutiv wirkende Caspasen in ihre aktive Form überführen. Diese Caspasen wirken als Effektoren der Apoptose. Sie spalten lebenswichtige Proteine der Zelle, wie Signalstoffe, Rezeptoren, Cytoskelett und die DNA selbst (Webb et al., 1997).

Extrinsische Caspasen-Rekrutierung geschieht durch Ligandenbindung vermittelte Aktivierung eines Rezeptorkomplexes. Über ein Adaptermolekül wird Caspase-8 zur autoproteolytischen Spaltung angeregt. In manchen Zellen ist für die Amplifikation dieses Signals die mitochondrielle Cytochrom c-Freisetzung erforderlich (Denecker et al., 2001). Auch intrinsische Apoptoseinduktion scheint auf noch nicht geklärte Weise an Cytochrom c gekoppelt. Eine These postuliert, dass proapoptotische Substanzen der Bcl-2-Familie, wie Bax, Bak oder Bid, zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran führen und einen Ausstrom von Cytochrom c bewirken. Dieser Stoff wiederum bindet an Adaptermoleküle wie Apaf-1, das die autoproteolytische Fähigkeit der Initiatorcaspase-9 ermöglicht (Coultas und Strasser, 2000).

Die Mitochondrien nehmen eine zentrale Rolle im apoptotischen Geschehen ein. Über die Freisetzung caspasenaktivierender Substanzen wie Cytochrom c, durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der Energiebereitstellung durch ATP-Bildung sind sie empfindliche Regulatoren im Ablauf des Zelltodes. Ihre Verwicklung

in das Apoptosegeschehen vieler Erkrankungen konnte bereits nachgewiesen werden (Kroemer und Reed, 2000).

Verschiedene Faktoren sind an der Regulation der Apoptose beteiligt und können diesbezüglich fördernd oder protektiv wirken. Die durch alternatives Splicing entstehenden Genprodukte von CED-9 bilden die Bcl-2-Familie mit pro- und antiapoptotisch wirksamen Proteinen. Als zellschützend sind vor allem Bcl-2 und Bcl-xL zu nennen, die in der Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Sie können dort den Austritt von Cytochrom c und die Bildung von Superoxiden verhindern. Als apoptoseauslösend wurden bereits Bax, Bak und Bid erwähnt (Reed, 1997). Das p53-Gen wird nach DNA-Schädigung und Entzug von Wachstumsfaktoren vermehrt exprimiert und sein Produkt induziert Apoptose (Thompson, 1995). Mutationen in diesem Bereich sind in vielen Tumorzellen zu finden (Webb et al., 1997). Verschiedene andere, mit Zellproliferation assoziierte Gene, wirken ebenfalls apoptose-fördernd. Darunter zu nennen sind zum Beispiel c-myc, Rb-1, c-fos oder Proteinkinase C (Steller, 1995).

1.4. Apoptose in der Schilddrüse

1.4.1. Induktion und Ablauf

Auch in Thyreocyten wird Apoptose beobachtet. Die intrinsischen Auslöser unterscheiden sich hierbei nicht grundlegend von anderen Zellarten. Nach oxidativem Stress (Riou et al., 1998), dem Entzug von Wachstumsfaktoren wie TSH (Dremier et al., 1994) oder auch unter dem inhibierenden wirkenden TGF- β (Bechtner et al., 1999) konnte Zelluntergang durch Apoptose nachgewiesen werden. Spezifisch für die Schilddrüse ist die Apoptoseinduktion durch Jodid, dessen Verstoffwechslung in gesteigerter Form in vitro redoxabhängig (Vitale et al., 2000) zum Zelltod durch Apoptose oder, unter sehr hohen Dosen, durch Nekrose führt (Mutaku et al., 2002). In vivo ist Jodid über diesen Mechanismus an der Strumarückbildung beteiligt (Burikhanov und Matsuzaki, 2000).

Die apoptoseregulierenden Proteine der Bcl-2-Familie konnten auch in der Schilddrüse nachgewiesen werden. Es wird ihnen hier, wie in anderen Organen, Verantwortung für Zellüberleben und -sterben zugeschrieben (2000; Koga et al., 1999; Pilotti et al., 1994).

Im entzündlich und maligne veränderten Schilddrüsengewebe spielt der extrinsisch induzierte Weg über den Fas-Rezeptor die entscheidende Hauptrolle. Fas, auch also APO-1 oder CD-95 bezeichnet, gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren. Dies ist eine Gruppe von Transmembran-proteinen, deren cytosolischer Teil, die sogenannte Todesdomäne, zur Apoptoseinduktion befähigt ist (Nagata und Golstein, 1995). Fas-Aktivierung erfolgt durch Bindung seines Li-ganden, FasL. Auch FasL ist ein membranständiges Protein, das an den Rezeptor bindet und dessen Aktivierung durch Trimerisation bewirkt. Das aktivierte Fas führt über Rekrutierung des Adaptermoleküls FADD (Fas-associating-protein) zur Autolyse von Caspase-8 (Nagata, 1997).

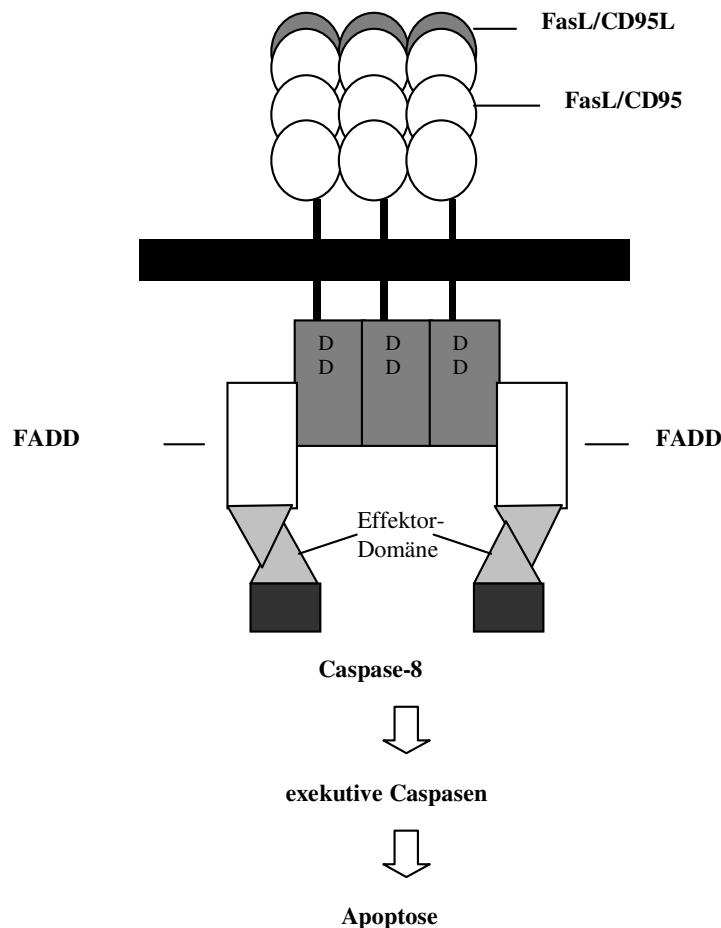


Abbildung 3. Apoptoseinduktion durch Bindung von FasL an den Fas-Rezeptor. Die Aktivierung der Todesdomäne (DD, death domain) führt zu Caspaseninitiation und letztlich zur Apoptose.

Der beschriebene Mechanismus ist von größter Bedeutung im immunregulatorischen Geschehen physiologischer und pathologischer Vorgänge. Fas wird vor allem von reifen Lymphocyten exprimiert und scheint dort für die Limitierung der Immunantwort durch Apoptose verantwortlich zu sein. Mäuse mit einer Mutation im Fas-Rezeptor entwickeln lymphoproliferative Erkrankungen und ein dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) ähnliches Krankheitsbild (Cohen und Eisenberg, 1991). Auf der anderen Seite können cytotoxische CD8+-Lymphocyten durch FasL-Expression auch Apoptose in Zellen induzieren, die Fas-Rezeptor positiv sind. Auf diese Weise werden infizierte oder entartete Zellen beseitigt (Nagata und Golstein, 1995). Normale Thyreocyten exprimieren den Fas-Rezeptor. In vitro gelang Apoptoseinduktion hierüber jedoch nur unter gleichzeitiger Hemmung der Proteinsynthese mit Cyclohexidin, was darauf hindeutet, dass dieser Mechanismus unter physiologischen Bedingungen inhibierender Regulation unterliegt (Arscott et al., 1997).

1.4.2. Zusammenhang mit Erkrankungen der Schilddrüse

Der Zellumsatz in der gesunden Schilddrüse ist relativ gering. Es wird angenommen, dass Thyreocyten sich im Lauf des Lebens nur 3-5 x teilen, die Homöostase wird durch Apoptose gewährleistet (Coclet et al., 1989). Eine vermehrte oder verminderte Apoptoserate ist mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Gesteigerter Zelltod wurde jodinduziert in der Strumainvolution beschrieben (Tamura et al., 1998) und auch in Patienten mit Hashimoto Thyreoiditis nachgewiesen (Kotani et al., 1995). Dysregulationen von dieser Art werden unter anderem für Entstehung von Autoimmunerkrankungen verantwortlich gemacht, da sie die antigenen Strukturen des Organs verändern (Salmaso et al, 2002). Vor allem hier ist der Fas-vermittelte Zelluntergang entscheidend. Das Schilddrüsengewebe weist massive lymphocytäre Infiltration auf, was zur Destruktion, fibrotischen Umwandlung und Unterfunktion führt. Die Immunzellen scheinen nicht direkt am Zelltod beteiligt, bewirken jedoch die Expression von FasL und damit eine apoptoseinduzierende Wirkung der Thyreocyten untereinander (Lumachi und Basso, 2002).

Ein vermindertes Apoptosegeschehen zeigte sich im M. Basedow. Als Gründe hierfür werden Abnahme der Fas-Rezeptoren (Kawakami et al., 1999) sowie eine Inhibition der Fas-Rezeptor-vermittelten Apoptose durch eine lösliche Form des Rezeptors diskutiert. Von den

Thyreocyten produziert und in die Umgebung sezerniert, kann er den Fas-Liganden cytotoxischer Zellen binden (Cheng et al., 1994). Dieser konnte ebenso bei SLE-Patienten nachgewiesen werden (Andrikoula et al., 2001). Auch Schilddrüsenkarzinomzellen können diesen Weg inhibieren, schon auf Rezeptorebene durch Mutation und Minderexpression oder, auf zellulärer Ebene, durch Blockade des Apoptoseablaufs. Außerdem entgehen sie ihrer Zerstörung durch Gegenangriff, indem sie selbst den Fas-Liganden exprimieren und Apoptose in Immunzellen induzieren. In Übereinstimmung mit dieser Tatsache ist die Expression von FasL in Schilddrüsenkarzinomen vom ungünstigeren, papillären Typ besonders ausgeprägt (Vlaeminck-Guillem et al., 2001).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Zur Durchführung der Arbeit war zunächst die Etablierung einer Methode notwendig, die eine quantitative Bestimmung der Apoptoserate an intakten, humanen Schilddrüsenfollikeln mit erhaltener Zellpolarität erlaubte. Das Nachweisverfahren musste sensibel genug sein, um die erfahrungsgemäß geringe Anzahl apoptotischer Thyreocyten zu erfassen. Zudem sollte eine schonende Behandlung der Follikel gewährleistet werden, um ein falsch-hohe Apoptoserate zu verhindern.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Selen auf das Apoptoseverhalten von Schilddrüsenzellen zu untersuchen. Der Versuchsteil gliederte sich in folgende Schritte:

- Ermittlung der basalen Apoptoserate in Thyreocyten (Wachstum ohne Selen und keine Zugabe von apoptoseinduzierenden Substanzen)
- Untersuchen des Einflusses von Selen auf die basale Apoptoserate
- Vergleich der Apoptoseraten nach Inkubation der Thyreocyten mit verschiedenen apoptoseinduzierenden Substanzen
- Untersuchung des Einflusses von Selen auf die mit den verschiedenen Substanzen erzielte Apoptoserate
- Vergleich der Auswirkung niedriger und hoher Selenkonzentrationen (10 nM und 100 nM)
- Untersuchung der Abhängigkeit einer protektiven Wirkung von Selen vom zellulären Redoxpotenzials durch Inkubation mit Wasserstoffperoxid
- Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Hormonproduktion und Apoptoseverhalten der Thyreocyten durch Inhibierung der Jodorganifizierung mit Methimazol vor der Stimulation mit Kaliumjodid

Als externe Kontrolle der Versuche wurde Apoptose in HL-60-, U 937- und THP-1-Zellen induziert und diese dem jeweiligen Verfahren unterzogen.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Geräte

Coulter Electronics Ltd., Dunstable, Bedfordshire, England

Coulter Multisizer, Modell Sampling Stand II

Gibco BRL, Gaithersburgh, MD, USA

Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus

Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

Mikro 24-28

Universal 30 RF

Napco, Portland, Oregon, USA

CO₂-Inkubator

Nikon, Tokio

inverses Fluoreszenzmikroskop Diaphot TMD

Lichtmikroskop TMS

Pharmacia

LKB Makrovue

Uniequip, München

Lamina Air Flow

Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting

Rocky 3D (Taumler)

Wägetechnik GmbH, Freising

Kern 440, Kern 770

2.1.2. Arbeitsmaterial

Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA

6-Well-Platten

Stabpipetten

Costar, Corning, NY, USA

24-Well-Platten

Eppendorf, Hamburg

Concentrator 3301 (Vakuumzentrifuge)

Pipetten

Pipettenspitzen Biopur (DNase-frei)

Produkte für die Medizin AG, Köln

Skalpelle

Heraeus, Hanau

hydrophobe Petri-Perm-Schalen

Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, England

Chemiluminescence film ECL

SLT, Crailsheim

Photometer

2.1.3. Substanzen

Biosyn, Fellbach, Deutschland

Natriumselenit

Calbiochem, La Yolla, USA

Trypsininhibitor aus Sojabohnen

Coulter Electronics Ltd., Krefeld

Coulter Clenz, Reinigungslösung

Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz

TRIS

Gibco BRL/ invitrogen, Karlsruhe

PBS-Puffer, Trypsin-EDTA, fetales Kälberserum (FCS), L-Glutamin, Amphotericin B

J.T. Baker, Deventer, Holland

isotoner Zählpuffer

Merck, Darmstadt

Wasserstoffperoxid, Kaliumjodid, NaCl, tri-Natriumcitratdihydrat

Novo Nordisk, Mainz

Insulin Novo Actrapid

Oncogene Research Products, Boston, USA

nucleosome ELISA

Polyscience, Warrington, USA

Glutaraldehyd (70%)

R&D Systems, Minneapolis, USA

TACS DNS laddering kit, DePsipher (kit for detection of mitochondrial membrane potential)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

Penicillin, Streptomycin

Serva, Heidelberg

Acridinorange, Ethidiumbromid

Sigma, Taufkirchen

Medium 199, Hepes-Medium, BSA (98%), bovines TSH, TGF- β , Methamizol, EGF, Phenylmethylsulfonylflourid (PMSF)

Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA

Kollagenase

2.2. Medien und Pufferlösungen

2.2.1. Zellkultur

Bikarbonatgepuffertes Medium 199 wurde mit Glucose (1 g/l), Glutamin (0,68 μ M), Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 μ g/ml) und Amphotericin B (0,5 μ g/ml) versehen. Diese Lösung diente zum Waschen der Zellen beim Split und als Grundlage für das Wachstumsmedium. Hierfür wurden noch Insulin (40 IE/ml), Transferrin (5 μ g/ml), Somatostatin (10ng/ml), Hydrocortison (10nM), GHF (10ng/ml), fetales Kälberserum (FCS, 2%) und Gentamycin (50 μ g/ml) hinzugefügt.

2.2.2. Präparationsmedium

Für alle Behandlungsschritte vor Aussaat der Zellen wurde hepes-gepuffertes Medium 199 verwendet. Der pH wurde auf 7,6 eingestellt und außerdem Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 μ g/ml), Amphotericin B (0,5 μ g/ml) und Trypsin-Inhibitor (100 μ g/ml)

zugegeben. Für die Aufschließung der Zellen wurde das Medium mit Kollagenase (2 mg/ml) und BSA (20 mg/ml) angereichert.

2.2.3. Pufferlösungen

50 x TAE-Puffer:

242 g TRIS, 57,1 ml Eisessig (Essigsäure 90 %), 100 ml 0,5 M EDTA (pH 0,8), auffüllen auf 1 l H₂O

20 x SSC:

175,32 g NaCl, 88,23 g Natriumcitrat, auffüllen auf 1 l H₂O

2.3. Allgemeine Arbeitsbedingung

Der Umgang mit Gewebe und Zellen erfolgte unter semi-sterilen Bedingungen. Die verschiedenen Arbeitsschritte wurden unter einem Lamina Airflow durchgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden sterilisiert, die Gefäße mit Puffern und Lösungen nur unter dem Lamina Airflow geöffnet und nach Gebrauch abgeflammt.

Die Arbeitsfläche wurde täglich mit Alkohol abgewischt. Auch der Brutschrank wurde monatlich mit Alkohol und antimykotischen Mitteln gereinigt. Dabei wurde ebenso das gebrauchte Wasser ersetzt und sterilisierte Platten eingesetzt.

Um eine schonende Behandlung der Zellen zu gewährleisten und den Kontakt mit Tensiden und Chemikalien zu vermeiden, wurden alle Oberflächen, mit denen sie in Berührung kamen, nur in 98%-igem Alkohol gereinigt. Zur Vermeidung mechanischer Schädigung wurden zellhaltige Lösungen nur mit 1000 µl-Spitzen pipettiert. Gegen Anhaften der Zellen wurden die Spitzen vorher silikonisiert.

2.4. Methoden

2.4.1. Versuchsaufbau

Nach der Präparation von humanem Schilddrüsengewebe wurden die daraus gewonnenen Follikel unterschiedlicher Drüsen zunächst getrennt kultiviert. Nach Vereinigung der Zellen verschiedener Drüsen und Selenzugabe wuchsen sie für 48 h als Einzelzellen und bildeten Monolayer. Für weitere 18 h wurden die Zellen zur Follikelrekonstruktion in hydrophobe Schalen gegeben. Im Anschluss an diese Phase wurde mit der jeweiligen Substanz Apoptose induziert und die Zellen entsprechend dem Nachweisverfahren zur Quantifizierung der Apoptose weiterbehandelt.

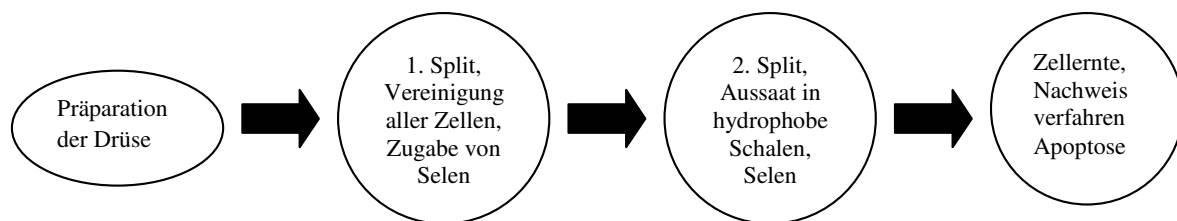


Abbildung 4. Versuchsaufbau

2.4.2. Materialgewinnung

Humanes Schilddrüsengewebe wurde aus Operationspräparaten gewonnen. Es handelte sich stets um gutartig verändertes Gewebe aus Resektionen bei M. Basedow oder multinodulärer Struma.

Die Gewebestücke wogen 1 - 5 g. Sie wurden noch im OP in ein steriles Gefäß gegeben und bis zur Abholung gekühlt. Der Transport ins Labor erfolgte auf Eis. Sofort im Anschluss wurde mit der Präparation begonnen.

Das Gewebe entstammte Frauen und Männern jeden Alters. Die Qualität variierte, stand jedoch in keinem erkennbaren Zusammenhang mit den Daten der Spender. Schlechte Güte des Materials führte zum Ausschluss der jeweiligen Drüse. Kriterien hierfür waren das Überwiegen von inside-out Follikeln, schlechtes Wachstum oder Verunreinigungen.

2.4.3. Präparation des Gewebes

Errick et al. (1986) beschrieben eine wirkungsvolle Methode, mit der sich auch aus kleinen Mengen humanen Schilddrüsengewebes ein Kultursystem aufbauen ließ. Die Präparation der Drüsen wurde unter einem Lamina Airflow auf sterilem Untergrund und mit sterilem Werkzeug vorgenommen. Das Gewebe wurde erst von groben Faserzügen und Knoten befreit und anschließend mit Schere und Skalpell gründlich zerkleinert. Diese Masse wurde 16-18 h im kollagenase- und BSA-haltigen Verdaumedium bei 32 °C langsam auf einem Dreher bewegt.

Die durch die Kollagenase ausgelösten Follikel und Einzelzellen ließen sich durch mehrere Wasch- und Sedimentationsschritte von unverdauten Bindegewebsresten trennen:

Während 10-minütigem Absetzen, sammelten sich die schwereren Fasern am Boden. Der die Follikel enthaltende Überstand wurde bei 1300 U, 20°C, 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet in das hepesgepufferte Präparationsmedium aufgenommen und zweimal darin gewaschen, ebenfalls bei 1300 U, 20°C, 5 min. Nach erneuter Resuspension erfolgte eine zweite Absetzphase zur Trennung von Follikeln und Einzelzellen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und die lose Ansammlung von Follikeln in das Standardkulturmedium aufgenommen. Die Follikel-Suspension wurde zu je 3 ml auf ein oder mehrere Wells einer 6-Well-Platte verteilt.

2.4.4. Zellkultursystem

Die Zellkultur erfolgte bei 37 °C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre und 5% CO₂-Gehalt. Als Nährlösung für die Zellen wurde immer das beschriebene Standardkulturmedium verwendet.

Das Kultursystem gliederte sich in drei Phasen:

I) Wachstum

An die Präparation schloss sich eine 3-4 tägige Wachstumsphase an. Die Zellen verschiedener Drüsen wurden getrennt aufbereitet und in separate Wells gegeben. Die noch bestehenden Follikel und Einzellzellen breiteten sich über das gesamte Well aus.

II) Vereinigung und Neuaussaat aller Zellen, Zugabe von Selen

Um eine Homogenität der Proben zu gewährleisten, wurden die Zellen der verschiedenen Gewebe vereinigt. Im Falle von schlechtem Wachstum oder der Bildung von inside-out-Follikeln wurden die Zellen nicht weiterverarbeitet.

Das Kulturmedium wurde abgesaugt und der Monolayer einmal mit warmen PBS gewaschen. Anschließend wurden mit 2500 µl PBS und 500 µl Trypsin-EDTA (10x) bei 37 °C die Follikelverbände entzweit und der Zellteppich vom Boden gelöst. Die nun vorliegende Einzelzellsuspension wurde durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1000 µl Pipette vermischt und in bikarbonatgepuffertem Medium 199 mit 10% FCS gewaschen (Zentrifugation bei 1900 U, 20°C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Standardkulturmedium resuspendiert und eine Zellzählung sowie eine Lebendfärbung durchgeführt. Die Einzelzellen wurden so verteilt, dass sich 2-3 Millionen lebende Zellen in einem Well befanden. Ein Teil wurde für 48 h mit Natriumselenit 10 nM oder 100 nM präinkubiert, der andere Teil wurde für Basalwerte unter Standardbedingungen kultiviert.

Zellzählung:

Der Coulter Counter funktioniert über eine mit Kapillaröffnung versehene Glaselektrode und einer ihr anliegenden Metallelektrode. Beide Elektroden tauchen in die Probenlösung. Aus der Probenlösung werden 500 µl angesaugt. Die darin befindlichen Zellen führen zu Potenzienschwankungen zwischen den beiden Elektroden (Shapiro, 1994). Es wurde festgelegt, dass nur Zellen zwischen 7,5 µm und 20 µm als Thyreocyten betrachtet werden.

Lebendfärbung:

Ethidiumbromid (20 mg/ 100ml) und Acridinorange (1mg/ 100ml) wurden in PBS gelöst, 1:10 mit Standardkulturmedium verdünnt und 1:1 mit der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben. Unter Fluoreszenzlicht (745 nm) stellten sich lebende Zellen grün und tote Zellen rot dar.

III) Follikelbildung in hydrophober Schale

Im Anschluss an die zweite Phase wurden die Zellen, wie bereits beschrieben, ein weiteres Mal trypsiniert, gewaschen und gezählt. Hierbei wurde jeder Ansatz getrennt zentrifugiert, um die Vermischung von basal und mit Selen kultivierten Zellen zu vermeiden. Zur Aggregat- und Follikelbildung wurden die Einzellzellen mit je 3 ml Zellkultur-Medium in hydrophob beschichtete Petri-Perm Kulturschalen gegeben. Es wurde erneut Selen in der entsprechenden Konzentration hinzugefügt. Um ein Anwachsen der mikroskopisch gut sichtbaren Zellverbände zu verhindern, wurde spätestens nach 18 h das weitere Vorgehen eingeleitet.

2.4.5. Induktion der Apoptose

Inkubation mit Kaliumjodid, TSH, TGF- β und H₂O₂

Um Apoptose zu induzieren, wurden die Follikel mit verschiedenen Substanzen behandelt. Kaliumjodid (KJ) wurde zusammen mit EGF (5 ng/ml) in den Konzentrationen 10 μ M oder 20 μ M eingesetzt. In Kombination mit TSH wurde KJ in folgende Konzentrationen zugegeben: KJ 5 μ M und TSH 1 mU/ml, bzw. KJ 10 μ M und TSH 10 mU/ml. TGF- β wurde in einer Verdünnung von 5 ng/ml und ebenfalls immer mit EGF (5 ng/ml) verwendet. Die Inkubationszeit für diese Reagenzien betrug 50 min. Für H₂O₂ war eine Einwirkzeit von 3 h vorgesehen. Es wurde in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt.

Inhibition der Hormonsynthese mit Methimazol

Durch Hemmung der Jodorganifizierung wurde der Effekt von Jodid auf die Apoptoserate untersucht. Hierzu wurden Proben 30 min vor Zugabe von KJ 20 μ M und EGF (5 ng/ml) mit Methimazol 1 μ M behandelt.

2.4.6. Apoptosebestimmung mit Gel-Elektrophorese

Prinzip der Methode

Während des Zelluntergangs durch Apoptose wird die DNA durch spezifische Endonukleasen in Fragmente charakteristischer Länge von 180-200 bp zerlegt. Aus apoptotischen Zellen extrahierte und gereinigte DNA lässt sich durch Anlage eines elektrischen Feldes mittels Gelelektrophorese auftrennen und als sogenannte DNA-Leiter darstellen. (Wyllie, 1980). Eine Möglichkeit, die Bruchstücke sichtbar zu machen, ist ISNT (in-situ nick-translation): An das '3-OH-Ende eines DNA-Stranges wird mit dem Klenow-Fragment der E.coli-Polymerase ein markiertes Nukleotid geheftet (Willingham, 1999). Nach diesem Prinzip handelte auch der von uns verwendete DNA LADDERING KIT (R&D Systems). Das Nukleotid wurde in diesem Fall mit Biotin versehen. Die aufgetrennte DNA wurde mittels southern blot vom Gel

auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Bei diesem Verfahren wird die Eigenschaft der DNA genutzt, an diesem Material zu haften. Durch ein Gewicht wird Flüssigkeit zusammen mit der DNA in die Membran gepresst (Löffler/ Petrides, 1997). Streptavidin-horse-radish-peroxidase (SA-HRP) bindet an die biotinylierten Nukleotide, wird durch einen Chemolumineszenz-Farbstoff gefärbt und anschließend damit ein Röntgenfilm belichtet.

DNA-Isolation

Nach Apoptoseinduktion wurden die Zellen mit Hilfe eines Schabers und durch gründliches Spülen mit einer silikonisierten Pipettenspitze von der hydrophoben Membran gelöst. Das Medium wurde bei 20 °C, 1200 U, 5 min abzentrifugiert, das Pellet daraufhin in PBS bei gleichbleibender Zentrifugationsstufe gewaschen und nochmals in frischem PBS resuspendiert. Um die DNA-Ausbeute zu erhöhen, wurden die Zellen kurz mit Ultraschall behandelt. An diesem Punkt begannen wir mit dem zum Kit gehörenden Protokoll zur DNA-Extraktion.

Die Suspension wurde bei 4°C, 3500 U, 5 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100 µl Lysis Buffer aufgenommen und für 5 min inkubiert. Anschließend erfolgte mit 100 µl Lysis Solution die Zelllyse. Zu dieser Lösung wurden 700 µl Extraction Solution und 400 µl Extraction Buffer gegeben und alles in einer Mikrozentrifuge bei 14000 U, 10 min geschleudert. Hierbei wurde das Zelllysats in eine organische Phase mit Zellorganell- und Membranresten sowie eine wässrige, die DNA enthaltende Phase getrennt. Da beide Phasen durch eine Zwischenschicht geteilt waren, ließ sich der wässrige Bestandteil leicht abheben und in ein 2 ml-Eppendorfröhrchen überführen. Die DNA-Lösung wurde in Natriumacetat aufgenommen, mit der gleichen Menge 2-Propanol vermischt und nochmals bei 14000 U, 5 min zentrifugiert. Der Überstand über dem DNA-Pellet wurde abgehoben, die DNA in Ethanol (70 %) resuspendiert, nochmals zentrifugiert, der Überstand wieder verworfen und das Pellet in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Als letztes wurde die so gereinigte DNA in DNase freies Wasser aufgenommen und bis zur Messung bei -20 °C eingefroren.

Gelelektrophorese

Alle Substanzen wurden mit DNase-freien Spitzen pipettiert. Es wurde darauf geachtet, Gel und Membran nicht mit fremder DNA zu verunreinigen. Der Umgang damit erfolgte deshalb ausschließlich mit Handschuhen.

Aus den zu dem KIT gehörenden Substanzen wurde zuerst ein 1,5%-iges Gel bereitet: 0,75 g Trevi-Gel wurde mit 1 ml TAE-Puffer und 50 ml Aqua dest. in einer Mikrowelle erhitzt bis die Flüssigkeit klar schien. Nach kurzem Abkühlen wurde ein ca. 0,5 cm dickes Gel gegossen. Die Kammer wurde mit 200 ml TAE-Puffer (1%) geflutet.

Zur Markierung der Proben- und der im KIT enthaltenen Kontroll-DNA wurden 1 μ l DNA, 1 μ l 10 x Klenow Buffer, 5 μ l Klenow Water, 2 μ l dNTP und 1 μ l Klenow Enzym gemischt. Nach 10 min Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μ l Loading Buffer gestoppt. Die Proben wurde nun in die Taschen des Gels pipettiert.

Bei einer Spannung von 67-75 V dauerte die Trennung der DNA 1 h 50 min. Die Elektrophorese wurde beendet, kurz bevor der dunkel gefärbte Loading Buffer das Gelende erreicht hatte.

Transfer der DNA auf Nitrocellulose mittels Southern Blot

Das Gel wurde durch Schwenken in verschiedenen Lösungen auf den Transfer vorbereitet. Zuerst wurde die DNA in 0,25 M HCl 15 min denaturiert. Nach zweimaligem Spülen mit Aqua dest. wurde das Gel zum Neutralisieren für 30 min in 0,4 M NaOH und 0,8 N NaCl gelegt und abschließend für ebenfalls 30 min in 0,5 M TRIS und 1,5 M NaCl (pH 7,5).

Der southern blot Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte über Nacht (16 h) auf einem mit 10 x SSC getränkten blotting pad. Um die Effektivität des Blots zu kontrollieren, wurde das Gel mit Ethdiumbromid (2,5 µl in 50 ml PBS) gefärbt und unter UV-Licht betrachtet.

Chemolumineszenzfärbung und Entwicklung

Auch für folgende Schritte wurde die Membran zur Inkubation gleichmäßig auf einem Taumler geschwenkt. Um unspezifische Bindungen zu blocken, ließen wir zuerst eine 3 %-ige BSA-Lösung (Grundlage PBS) 30 min auf die Membran einwirken. Dann wurde 20 min mit SA-HRP (10 µl in 20 ml PBS) inkubiert und darauffolgend nicht gebundene DNA und SA-HRP dreimal je 5 min in 1 x PBS ausgewaschen. Im Anschluss an die Färbung mit Peroxyglow A und B (3 min) wurde die Membran in eine dünne Plastikfolie eingehüllt, ein Röntgenfilm belichtet und sofort entwickelt. Belichtung und Entwicklung wurden in einer Dunkelkammer vorgenommen.

2.4.7. Apoptosebestimmung mittels Nucleosomen-ELISA

Prinzip der Methode

Grundlage eines enzyme-linked-immunosorbent assays (ELISA) ist die Immobilisierung eines Antigens auf einer Kunststoffoberfläche und dessen anschließende direkte oder indirekte Markierung mit Antikörpern. Dieses Verfahren hat eine hohe Sensitivität – sie liegt im Nanogramm-bereich – und wird vor allem für immunologische Messungen verwendet (Kayser, 1998).

In dem verwendeten KIT war der Boden der Mikrotiterplatten mit einem DNA-bindenden Protein beschichtet. Gebunden wird die nukleosomale DNA, die nach ihrer Degradierung in apoptotischen Zellen zu finden ist. Die Nucleosomen werden darauffolgend mit biotinylierten Antikörpern markiert, und diese Antikörper werden wiederum mit SA-HRP bestückt. HRP katalysiert die Reaktion von farblosem zu blauem Tetramethylbenzidin. Durch eine Farbintensitätsmessung im Photometer lässt sich die Anzahl der Nucleosomen feststellen (Salgame et al., 1996).

Zellernte und Probengewinnung

Die Zellernte verlief gemäß dem bereits für die Elektrophorese bestehenden Protokoll. Eine Behandlung mit Ultraschall wurde jedoch nicht vorgenommen. Nach dem Waschen in PBS wurde der Überstand verworfen und die Zellen in Lysis Buffer und 0,2 M PMSF aufgenommen, in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und auf dem Vortex vermischt. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe bei 4°C, 3100 U, 10 min zentrifugiert, und der die an Nucleosomen gebundene DNA enthaltende Überstand vorsichtig abpipettiert. Vor weiterer Verarbeitung mussten die Proben mindestens 18 h bei – 20 °C eingefroren werden.

Messung im ELISA

Aus der Nukleosomenstandard-Lösung wurde zur Erstellung einer Eichkurve eine Verdünnungsreihe mit den Werten 12; 4; 1,3; 0,44; 0,15 U/ ml erstellt. Zur Adsorption wurden 100 µl Probe bzw. Standardlösung als Doppelwerte in die Wells der ELISA-Platte pipettiert und für 3 h inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer gespült. Im nächsten Schritt wurden die Nukleosomen mit 100 µl Detector Antibody (Inkubation 1 h) markiert und die Wells dann wieder dreimal gewaschen. Um die Peroxidase an den mit Biotin markierten Antikörper zu koppeln, musste 400 x SA-HRP Conjugate in Conjugate diluent 1: 400 verdünnt und gefiltert werden. Davon wurden je 100 µl für 30 min in ein Well gegeben. Die Platte wurde zweimal gewaschen und zweimal mit Aqua dest. gespült. Für die Farbreaktion wurde 30 min im Dunkeln inkubiert und die Reaktion dann mit 100 µl Stop Solution beendet. Die Absorption wurde unmittelbar im Anschluss bei 450/ 620 nm gemessen.

Modifikationen

Um die Signalintensität zu verbessern und Störfaktoren zu ermitteln, wurden verschiedene Modifikationen vorgenommen:

Zur Beseitigung eventueller Verunreinigungen in den Proben wurden sowohl zu den Proben als auch zum Standard PEG (12,5 g %, gelöst in Aqua dest.) gegeben, die Lösung zentrifugiert und der Überstand abgehoben. Andere Proben wurden mit PMSF, einem Proteaseinhibitor, behandelt.

Da vermutet wurde, dass die Proben mit der Beschichtung der ELISA-Platte interagieren und diese teilweise ablösen, wurde versucht, die DNA-bindenden Proteine mit 0,5 % Glutaraldehyd zu fixieren. Wir ließen die Substanz 30, 60 und 75 min einwirken. Anschließend wurden die Wells dreimal mit dem vorgesehenen Waschpuffer gespült.

Aus demselben Grund wurden einige Wells mit Proben gespült, die in einer vorhergehenden Messung kein Signal gegeben hatten. Anschließend wurde nach dem üblichen Protokoll verfahren und die Wells mit Standard inkubiert. Andere Proben wurden mit 10-fach verdünntem Standard gemischt und als „Wiederfindung“ eingesetzt.

Kontrollen

Als positive Kontrolle wurde Apoptose in HL-60-Zellen induziert. Hierfür wurden sie mit 68 μM Etoposide (VP-16) inkubiert, und die Nukleosomen nach dem üblichen Protokoll gewonnen.

2.4.8. Apoptosebestimmung mittels Mitochondrial Potential Assay

Prinzip der Methode

Einige Nachweisverfahren machen sich eine mangelnde Intaktheit der Zell- oder Zellorganellmembranen zunutze (Willingham, 1999). Im intakten Mitochondrium wird zur ATP-Synthese ein negatives Membranpotenzial von -180 bis -200 mV gegenüber dem Cytoplasma aufrechterhalten. Lipophile Kationen diffundieren entlang dieses Gradienten ins Mitochondrium und können durch Sichtbarmachung zur Beurteilung der mitochondriellen Funktion herangezogen werden (Bernardi et al., 1999). Wir verwendeten DePsipher, einen Mitochondrial Potential Assay der Firma R&D Systems. Dieser KIT beinhaltet den Farbstoff 5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-Carbozyaniniodid (JC-1), ein Zyaninderivat, das in hydrophiler Umgebung Aggregate bildet und unter hydrophoben Bedingungen als Monomer vorliegt. Bei intaktem Membranpotenzial akkumuliert es selektiv in der Mitochondrienmembran als rot-fluoreszierendes Aggregat. Bei Zusammenbruch des mitochondriellen Membranpotenzials verbleibt der Farbstoff als grün-fluoreszierendes Monomer im Cytoplasma.

Vorbereitung der Zellen

Die Schilddrüsenfollikel wurden, wie bereits beschrieben, mit Pipette und Zellschaber geerntet und in ein Nunc-Röhrchen überführt. Wir ließen das Gefäß für 1 min ruhig stehen, damit größere Partikel zu Boden sinken konnten. Der Überstand wurde in ein frisches Gefäß überführt, einmal mit PBS gewaschen und wieder in Standardkulturmedium aufgenommen. Zur Apoptoseinduktion und Zählung wurden die Follikel in einer 24-Well-Platte zu ca. 90 000 Zellen je Vertiefung neu ausgesät. Ausgangswert war das Ergebnis der letzten Zellzählung. Zusätzlich wurde durch Ernte, Zentrifugation und Sedimentation von einem Verlust von einem Drittel aller Zellen ausgegangen. Es wurden jeweils 2 Wells, also Doppelwerte, für die verschiedenen Substanzen zur Apoptoseeinleitung angelegt.

Färbung und Zellzählung

Gemäß der Anleitung wurde eine Färbelösung aus mit Aqua dest. verdünntem Puffer, Stabilizer und Farbe zubereitet. Nach Apoptoseinduktion mit Jodid, TGF- β oder H_2O_2 wurde das Medium abgehoben und die Zellen mit je 500 μ l Färbelösung 20 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung mit Puffer vertauscht. Zur Zählung wurden die Follikel in der Kulturschale belassen. Es wurde ein Fluoreszenzfilter von 495 nm verwendet.

Die Auswertung wurde von zwei unabhängigen Untersuchern vorgenommen, die nach festgelegten Kriterien vorgingen: Grüne Zellen galten als apoptotisch, rote als lebend. Zellen, die ihre Mitochondrien bereits großteils verloren hatten, wurden als beginnende Apoptosen gezählt. Es wurden nur Zellen bewertet, die in direktem Kontakt waren und aus intakten Follikeln stammten. Die Gesichtsfelder wurden zufällig eingestellt und aus möglichst verschiedenen Bereichen des Wells gewählt. In jedem Well wurden insgesamt 500 Zellen gezählt, je Probe also mindestens 1000.

Kontrollen

In HL-60-, U 937- und THP-1-Zellen wurde mit Etoposide (VP-16) in einer Konzentration von 34 μM , 68 μM und 136 μM Apoptose induziert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, in Färbelösung resuspendiert und für 20 min inkubiert. Die Färbelösung wurde anschließend abzentrifugiert, die Zellen in Puffer aufgenommen und auf einem Objektträger mikroskopiert.

Aktivitätsmessung

Schilddrüsenzellen, die als Monolayer wachsen, verlieren ihre spezifischen Funktionen. Nur Zellen in intakten Follikelverbänden behalten ihren Jodmetabolismus bei (Toda et al., 1995). Durch Messung von freiem T3 und freiem T4 aus dem Überstand der Zellkultur konnte die Aktivität der Follikel bewiesen werden.

2.5. Statistische Auswertung

Die Auswertung einer Probe erfolgte durch Auszählen von mindestens 1000 Zellen. Die als Doppelwerte vorliegenden Zählergebnisse beider Untersucher wurden zusammengefasst. Die Anzahl der Apoptosen wurde durch die Gesamtzahl aller gezählten Zellen aus der entsprechenden Probe geteilt und als Prozentwert angegeben. Jede Auswertung wurde als getrenntes Ereignis betrachtet und nur gemeinsam erfasste Ergebnisse wurden zueinander in Relation gesetzt. Jeder Versuch wurde mindestens viermal durchgeführt.

Die Daten wurden einem Normalitätstest unterzogen und statistische Unterschiede mit einem T-Test für paarige Stichproben berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte auf SigmaStat, die graphische Darstellung in MS Excel.

3. ERGEBNISSE

3.1. Apoptosenachweis mit Gel-Elektrophorese

Es war nicht möglich, die für die Apoptose charakteristischen DNA-Bruchstücke darzustellen. Die Kontroll-DNA formte stets die typische „DNA-Leiter“. Bei den zu messenden Proben zeigte sich lediglich ein schwacher Schatten. Das Signal ließ sich weder durch die Verwendung von mehr Probenlösung, noch durch die Verarbeitung einer größeren Anzahl von Zellen intensivieren.

3.2. Apoptosenachweis mit ELISA

Nach den Angaben des Herstellers liegt die untere Nachweisgrenze des Nukleosomen-ELISAs bei 0,15 U/ml. Erst Messwerte, die dieses Limit überschreiten, unterscheiden sich signifikant vom Leerwert. 1 U ist definiert als die Anzahl von Nukleosomen aus 444 Daudi-Zellen. Die gemäß Anleitung gewonnenen Proben aus Thyreocyten erreichten diesen Wert nicht, unabhängig von der eingesetzten Zellzahl und der Stimulation. Die Ergebnisse schwankten zwischen 0 U und 0,09 U. Die aus der zum Assay gehörigen Nukleosomen-Standardlösung erstellte Eichkurve war immer zufrieden stellend mit nur gering von einander abweichenden Doppelwerten.

Mehrmals wurden Proben, als so genannte Wiederfindung, mit 1,2 U/ml Standardlösung versehen. Der höchste hierdurch erreichte Messwert betrug 0,27 U. Auch eine 3-stündige Vorinkubation der Wells mit Probenlösung verringerte den Wert der Standardlösung von 1,2 U auf 0,32 U.

Modifikationen

Um eine Verbesserung der Ergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene Modifikationen des Protokolls veranlasst. Eine Behandlung der ELISA-Platten mit Glutaraldehyd (0,5%) führte zu einer deutlichen Signalintensivierung. Die besten Ergebnisse zeigten sich nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten. Proben, die vorher keinen messbaren Wert ergeben hatten, stiegen auf 0,6 – 0,15 U, die anderen Werte auf bis zu 0,3 U. Glutaraldehyd selbst beeinflusste die Messwerte nicht, als Leerwert gemessen ergaben sich 0 U. Als problematisch stellten sich die großen Schwankungen der Doppelwerte dar. Es ergaben sich Abweichungen der Werte voneinander bis zu 50 %. Dies führte zu einer erheblichen Verzerrung der Eichkurve. Ebenso waren die Ergebnisse, aufgrund der Inkonsistenz der Messwerte einer Probe in verschiedenen ELISA-Durchgängen, nicht verwertbar. Mit PEG (12,5%) und PMSF behandelte Proben lieferten kein Ergebnis im messbaren Bereich.

Kontrollzellen

HL-60-Zellen wurden mit Etoposide (68 μM) 4 h inkubiert, und Proben mit $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml angefertigt. Gemäß früheren Erfahrungen war durch diese Behandlung eine Apoptoserate von 60 % – 80 % zu erwarten. Die hierdurch erlangten Werte lagen stets weit im messbaren Bereich und waren rekonstruierbar. Wiederholt ergab sich für eine 1:5-Verdünnung ein Messwert von rund 11 U, für eine 1:10-Verdünnung ein Messwert von 5,8 U. Durch Hochrechnung ergibt sich daraus ein Wert von etwa 55 U. Da jeweils nur 100 μl Probe eingesetzt wurden, enthält 1 ml HL-60-Zellsuspension 550 U/ml. 1 U/ml entspricht, laut Angaben der Hersteller, der Anzahl von Nukleosomen aus 444 Zellen. Rechnerisch ergeben sich demnach $2,44 \times 10^5$ apoptotische Zellen/ml oder eine Apoptoserate von 16 %.

3.3. Apoptosenachweis mit Mitochondrial Potential Assay

3.3.1. Einfluss von Kaliumjodid, TSH, TGF- β und H₂O₂

Durch 50-minütige Inkubation mit Kaliumjodid, TSH oder TGF- β , oder dreistündiger Inkubation mit H₂O₂ konnten folgende Beobachtungen zur Apoptoserate gemacht werden:

Die Inkubation mit Kaliumjodid, sowohl in einer Konzentration von 10 μ M als auch von 20 μ M, unterstützt durch EGF (5 ng/ml), erhöhte die Apoptoserate signifikant. Inkubation mit KJ 10 μ M steigerte den apoptotischen Anteil von $2,73 \pm 0,40$ % auf $4,30 \pm 0,23$ % ($p = 0,004$), mit KJ 20 μ M von $3,38 \pm 1,71$ % auf $5,10 \pm 1,13$ % ($p = 0,001$). Auch der Einsatz von Kaliumjodid und TSH bewirkte eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate. Unter KJ 10 μ M und TSH 10 U/ml zeigte sich eine deutliche Steigerung von $2,76 \pm 0,60$ % auf $5,80 \pm 1,59$ % ($p = 0,007$), unter KJ 5 μ M und TSH 1 U/ml lediglich von $2,76 \pm 0,60$ % auf $4,30 \pm 1,50$ % ($p = 0,031$). Die zusätzliche Stimulierung mit TSH 10 U/ml zeigte sich hinsichtlich der Absolutwerte und der Differenzen zum unstimulierten Basalwert effektiver als der alleinige Einsatz von KJ 10 μ M (Differenz 1,5 %-Punkte) und KJ 20 μ M mit EGF 5 ng/ml (Differenz 0,7 %-Punkte). Eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen war ebenfalls unter TGF- β (5 ng/ml) und EGF (5 ng/ml) zu beobachten. Hier stieg der Index um 2,14 %-Punkte an (Ausgangswert 3,86 %, $p = 0,048$). Die Inkubation mit H₂O₂ hatte die deutlichsten Auswirkungen, die Apoptoserate wuchs von $2,58 \pm 0,48$ % auf $11,78 \pm 3,41$ % ($p = 0,001$). Die Wirkung von Jodid erwies sich als konzentrationsabhängig. Die Mittelwerte von gleichzeitig ausgewerteten Proben zeigten einen signifikanten Unterschied ($p = 0,044$), bei KJ 10 μ M lag der Durchschnitt bei 4,30 %, bei Einsatz von KJ 20 μ M bei 5,00 %. (s. Tabelle 6)

Bei den mit Natriumselenit kultivierten Proben war die apoptoseinduzierende Wirkung der meisten Substanzen schwächer ausgeprägt. Nur die Inkubation mit KJ 20 μ M und TGF- β 5 ng/ml, beide zusätzlich versehen mit EGF (5 ng/ml), sowie die Inkubation mit H₂O₂ (100 μ M) führten zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate.

Unter KJ (20 μM) war ein Zuwachs der apoptotischen Zellen von $2,18 \pm 0,80 \%$ auf $3,41 \pm 1,07 \%$ ($p < 0,001$) zu beobachten, unter TGF- β steigerte sich die Apoptoserate von $2,50 \pm 0,85 \%$ auf $3,73 \pm 1,35 \%$ ($p = 0,009$) und durch H_2O_2 erhöhte sich die Apoptoserate von $1,77 \pm 0,45 \%$ auf $5,83 \pm 2,21 \%$ ($p = 0,008$). Die Auswirkungen von KJ 10 μM mit EGF (5 ng/ml) und KJ mit TSH in beiden eingesetzten Konzentrationen konnten durch Natriumselenit 10 nM geblockt werden - es kam zu keiner signifikanten Änderung der Apoptoserate ($p > 0,050$).

Ebenso zeigte sich unter Natriumselenit 100 nM ein signifikanter Unterschied zum basalen Wert nur bei Inkubation mit H_2O_2 (100 μM). Hier war eine Erhöhung der Apoptoserate von $3,44 \pm 0,83 \%$ auf $6,36 \pm 1,89 \%$ ($p = 0,006$) zu verzeichnen. Sowohl unter KJ 20 μM als auch unter TGF- β (5 ng/ml) kam es zu einem Anstieg der apoptotischen Zellzahlen, unter erstgenanntem von $3,4 \pm 1,00 \%$ auf $5,20 \pm 1,74 \%$ ($p = 0,058$) und unter letzterem auf $4,70 \pm 2,03 \%$ ($p = 0,133$). Die Ergebnisse erwiesen sich trotzdem als nicht signifikant.

3.3.2. Kontrollzellen

In den zur Kontrolle verwendeten Zellen konnte Apoptose induziert und dies im Assay gezeigt werden. Zellen der Linie U 937 waren nach 4-stündiger Inkubation mit Etoposide 68 μM zu 77 % apoptotisch, bei Wiederholung unter gleichen Bedingungen zu 22%. HL-60 Zellen zeigten nach 2 h Etoposide 68 μM eine Apoptoserate von 20 %, nach 4 h von 38 %. THP-1 Zellen, die für 4 h mit Etoposide 136 μM inkubiert wurden, wiesen eine Apoptoserate von 80 % auf.

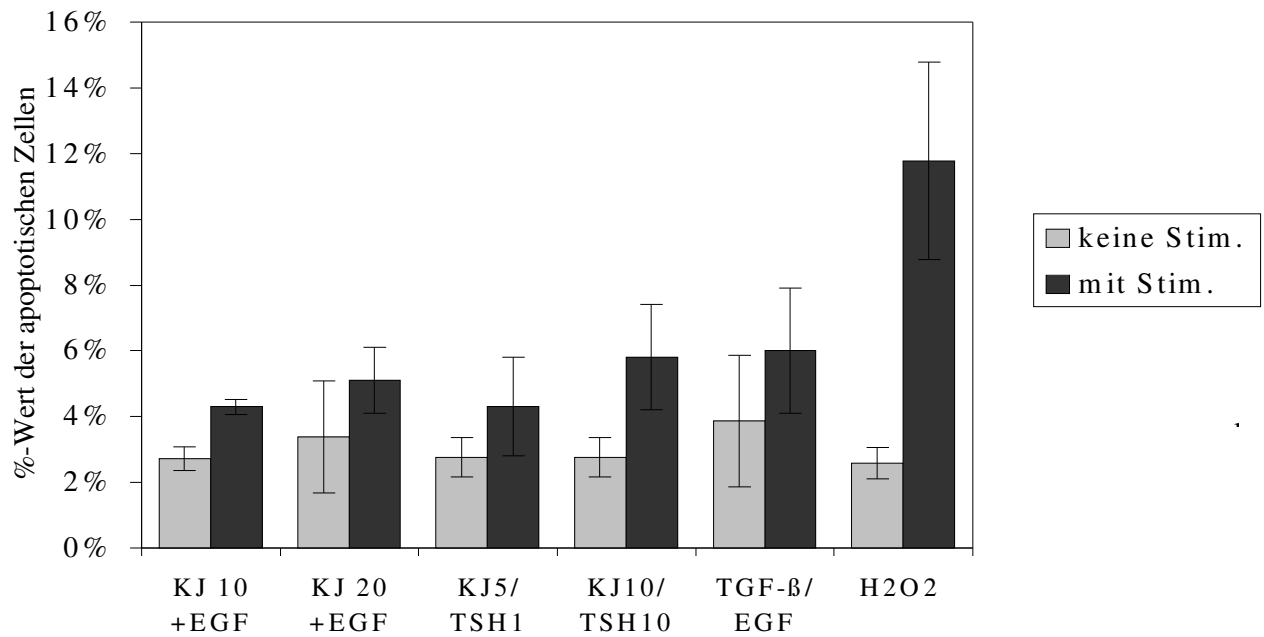


Abbildung 5. Steigerung der Apoptoserate in basalen Zellkulturen (=ohne Selenzugabe) durch Inkubation mit den angeführten Substanzen. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichung. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TSH in U/ml, TGF- β und EGF in ng/ml.

basal	ohne		mit		Signifikanz
KJ 10 + EGF 5	2,73 \pm 0,36	n= 4	4,30 \pm 0,23	n= 4	p = 0,004
KJ 20 + EGF 5	3,38 \pm 1,71	n=12	5,10 \pm 1,13	n=12	p < 0,001
KJ 5 + TSH 1	2,76 \pm 0,60	n= 5	4,30 \pm 1,50	n= 5	p = 0,031
KJ 10 + TSH 10	2,76 \pm 0,60	n= 5	5,80 \pm 1,59	n= 5	p = 0,007
TGF- β + EGF 5	3,86 \pm 2,04	n= 8	6,00 \pm 1,94	n= 8	p = 0,048
H ₂ O ₂ (100 μM)	2,58 \pm 0,48	n= 6	11,78 \pm 3,41	n= 6	p = 0,001

Tabelle 1. Steigerung der Apoptoserate in basalen Zellkulturen (=ohne Selenzugabe) durch Inkubation mit angeführten Substanzen. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TSH in U/ml, TGF- β und EGF in ng/ml.

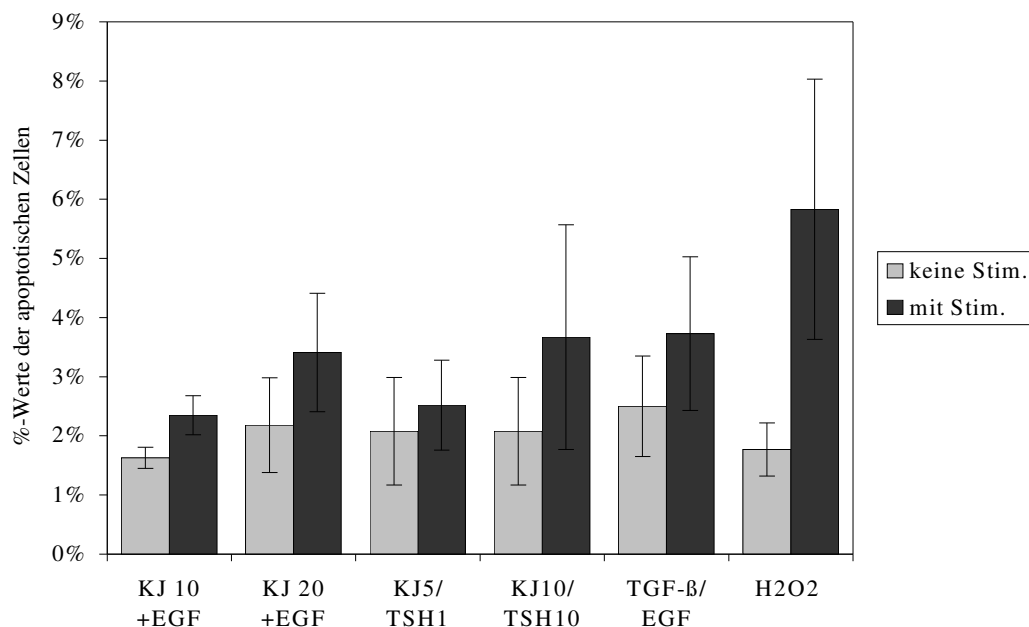


Abbildung 6. Steigerung der Apoptoserate in Zellkulturen mit Zugabe von Natriumselenit 10 nM durch Inkubation mit angeführten Substanzen. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichungen. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TSH in U/ml, TGF- β und EGF in ng/ml.

Selen 10 nM	ohne (MW \pm SEM)		mit (MW \pm SEM)		Signifikanz
	MW	n	MW	n	
KJ 10 + EGF 5	1,63 \pm 0,18	n= 4	2,35 \pm 0,33	n= 4	p = 0,056
KJ 20 + EGF 5	2,18 \pm 0,80	n=11	3,41 \pm 1,07	n=11	p < 0,001
KJ 5 + TSH 1	2,08 \pm 0,91	n= 5	2,52 \pm 0,76	n= 5	p = 0,282
KJ 10 + TSH 10	2,08 \pm 0,91	n= 5	3,67 \pm 1,94	n= 5	p = 0,105
TGF- β + EGF 5	2,50 \pm 0,85	n= 7	3,73 \pm 1,35	n= 7	p = 0,009
H ₂ O ₂ (100 μM)	1,77 \pm 0,45	n=6	5,83 \pm 2,21	n=6	p = 0,008

Tabelle 2. Steigerung der Apoptoserate in Zellkulturen mit Zugabe von Natriumselenit (10 nM) durch Inkubation mit angeführten Substanzen. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TSH in U/ml, TGF- β und EGF in ng/ml.

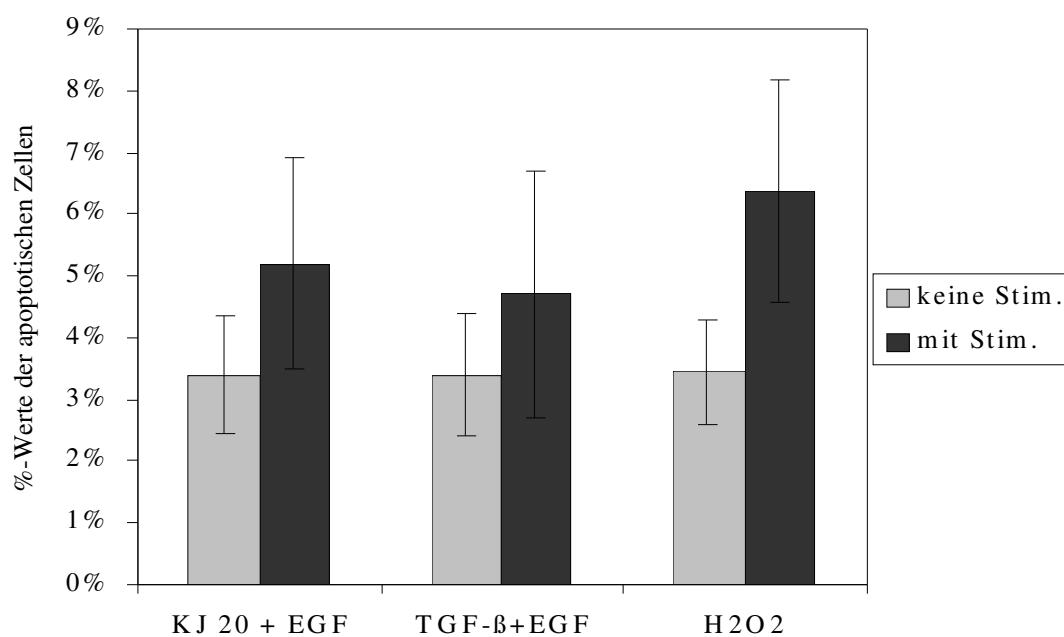


Abbildung 7. Steigerung der Apoptoserate in Zellkulturen mit Zugabe von Natriumselenit (100 nM) durch Inkubation mit angeführten Substanzen. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichungen. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TSH in U/ml, TGF- β und EGF in ng/ml.

Selen 100 nM	ohne (MW \pm SD)		mit (MW \pm SD)		Signifikanz
	MW	n	MW	n	
KJ 20 + EGF 5	3,40 \pm 0,96	n= 4	5,20 \pm 1,74	n= 4	p = 0,058
TGF- β + EGF 5	3,40 \pm 1,00	n= 4	4,70 \pm 2,03	n= 4	p = 0,133
H ₂ O ₂ (100 μM)	3,44 \pm 0,83	n= 5	6,36 \pm 1,89	n= 5	p = 0,006

Tabelle 3. Steigerung der Apoptoserate in Zellkulturen mit Zugabe von Natriumselenit (100 nM) durch Inkubation mit angeführten Substanzen. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TSH in U/ml, TGF- β und EGF in ng/ml.

3.3.3. Der Einfluss von Selen auf die Apoptoserate

Alle Follikel, die, wie beschrieben, mit Natriumselenit in einer Konzentration von 10 nM kultiviert wurden, zeigten unter Stimulation eine signifikant verminderte Apoptoserate: Nach Inkubation mit KJ 20 μ M und EGF (5 ng/ml) fiel die Anzahl der apoptotischen Zellen von $5,10 \pm 1,51$ % auf $3,54 \pm 1,34$ % ($p = p < 0,001$). Unter TGF- β (5 ng/ml) mit EGF (5 ng/ml) reduzierte sich die Rate um 37 % auf $3,73 \pm 1,35$ % ($p = 0,001$). Auch die Erhöhung der Apoptoserate durch Kaliumjodid und TSH war unter Selen 10 nM weniger ausgeprägt. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in den eingesetzten Konzentrationen, 1,78 % ($p = 0,004$) bei KJ 5 μ M mit TSH 1 U/ml und 2,12 % ($p = 0,004$) bei KJ 10 μ M mit TSH 10 U/ml. Eine deutliche Verminderung war nach dem Einsatz von H_2O_2 zu erkennen. Die Apoptoserate sank um mehr als die Hälfte, ausgehend von einem Basalwert von $11,78 \pm 3,41$ % auf $5,83 \pm 2,21$ % ($p = 0,001$) durch den Schutz von Selen in einer Konzentration von 10 nM.

Der Einfluss von Natriumselenit 10 nM auf die basale Apoptoserate ergab nach Inkubation der Zellen mit H_2O_2 und KJ 10 μ M + EGF 5 ng/ml eine signifikante Reduktion. In diesen Versuchsreihen sanken die Indices um 1,10 und 0,88 %-Punkte ($p = 0,003$ bzw. 0,021).

Natriumselenit in höheren Dosen (100 nM) brachte eine Verbesserung lediglich bei der Apoptoseinduktion mittels H_2O_2 (100 μ M). Der Anteil der apoptotischen Zellen sank von $12,88 \pm 3,45$ % auf $5,73 \pm 1,45$ % ($p = 0,015$). Unter KJ 20 μ M und TGF- β (5 ng/ml) wurde die Apoptoserate nicht beeinflusst. Der unstimulierte Wert kletterte von basal $2,82 \pm 0,30$ % auf $3,40 \pm 1,00$ % ($p = 0,212$). Auch die Gegenüberstellung der Kaliumjodid-Stimulationen ergaben eine Steigerung um 0,82 Prozentpunkte auf $5,20 \pm 1,74$ % ($p = 0,507$) unter Selen. Unter TGF- β (5 ng/ml) kam es zu keiner Veränderung, basal lag das Ergebnis bei $4,8 \pm 0,99$ % und unter Selen 100 nM bei $4,7 \pm 2,03$ % ($p = 0,949$).

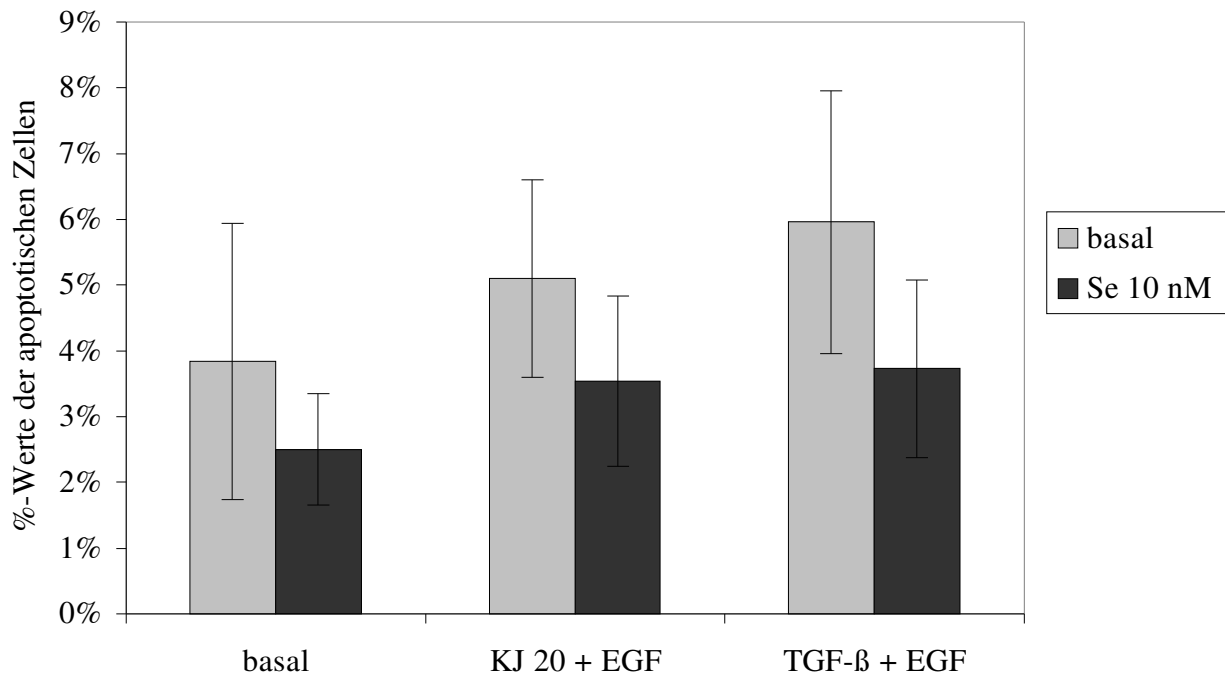


Abbildung 8. Der Einfluss von Natriumselenit 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben und Standardabweichung. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TGF- β und EGF in ng/ml.

	basal (MW \pm SD)		Selen 10 nM(MW \pm SD)		Signifikanz
keine Stim.	3,84 \pm 2,16	n= 7	2,50 \pm 0,85	n= 7	p = 0,081
KJ 20 μM + EGF	5,10 \pm 1,51	n= 7	3,54 \pm 1,34	n= 7	p < 0,001
TGF- β + EGF	5,96 \pm 2,09	n= 7	3,73 \pm 1,35	n= 7	p = 0,001

Tabelle 4. Der Einfluss von Natirumselenit 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. KJ in μM , TGF- β und EGF in ng/ml.

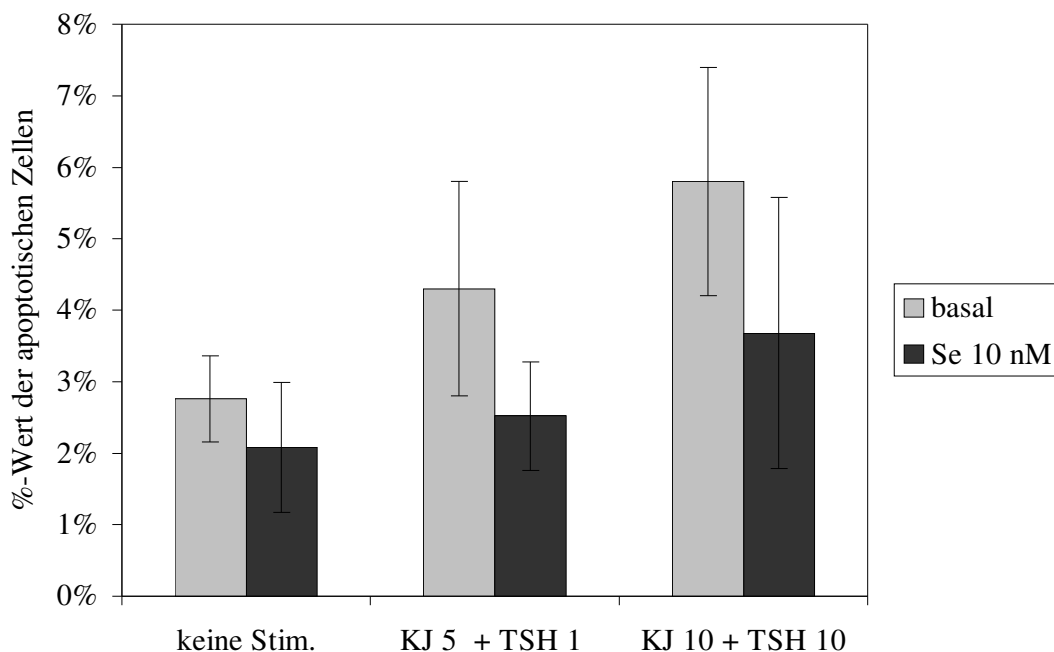


Abbildung 9. Der Einfluss von Selen 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichung. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. Angaben: KJ in μM , TSH in U/ml

	basal (MW \pm SD)		Selen 10 nM(MW \pm SD)		Signifikanz
		n=		n=	
keine Stim.	2,76 \pm 0,60	5	2,08 \pm 0,91	5	p = 0,065
KJ 5 + TSH 1	4,30 \pm 1,50	5	2,52 \pm 0,76	5	p = 0,009
KJ 10 + TSH 10	5,80 \pm 1,59	5	3,68 \pm 1,94	5	p = 0,040

Tabelle 5. Der Einfluss von Selen 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. Angaben: KJ in μM , TSH in U/ml

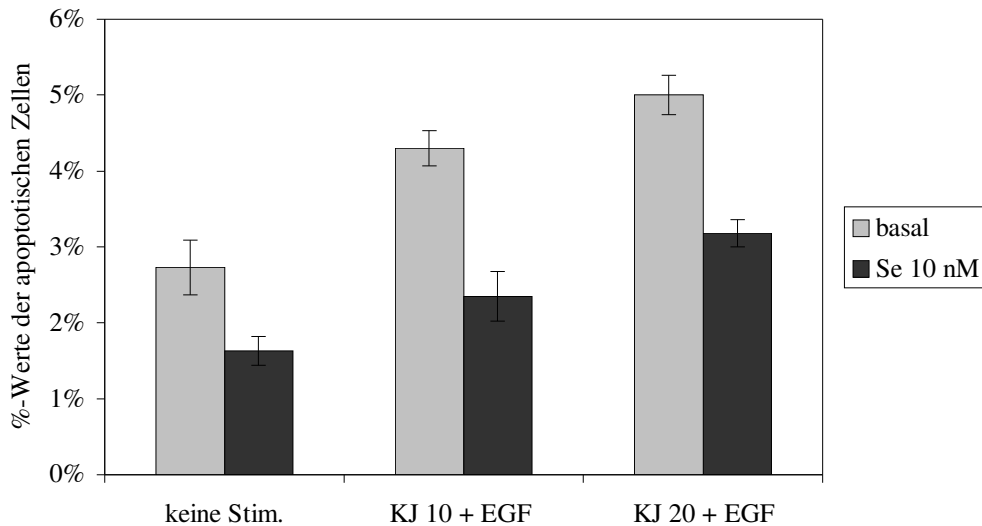


Abbildung 10. Der Einfluss von Selen 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Vergleich der Dosisabhängigkeit von Kaliumjodid. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichung. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. Angaben: KJ in μM , EGF in ng/ml

	basal (MW \pm SD)		Selen 10 nM(MW \pm SD)		Signifikanz
	MW \pm SD	n	MW \pm SD	n	
keine Stim.	2,73 \pm 0,36	n= 4	1,63 \pm 0,19	n= 4	p = 0,021
KJ 10 + EGF 5	4,3 \pm 0,23	n= 4	2,35 \pm 0,33	n= 4	p = 0,004
KJ 20 + EGF 5	5,0 \pm 0,26	n= 4	3,18 \pm 0,18	n= 4	p = 0,004

Tabelle 6. Der Einfluß von Selen 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichung (SD). Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. Angaben: KJ in μM , EGF in ng/ml

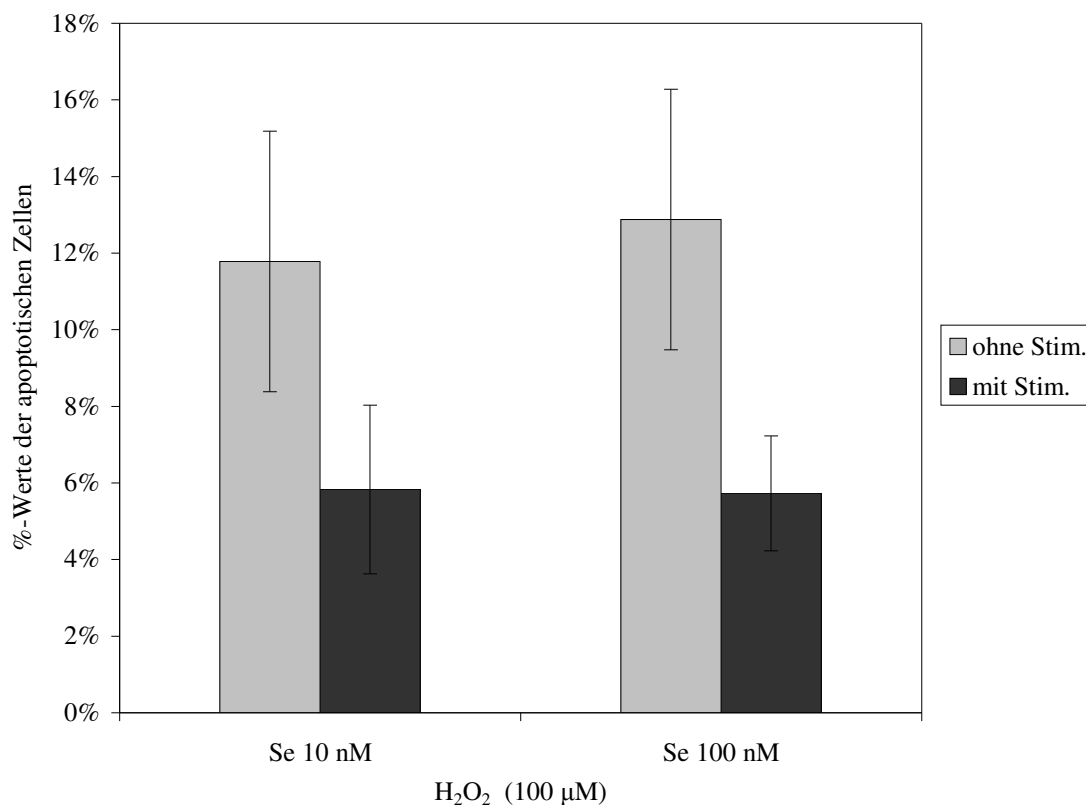


Abbildung 11. Der Einfluss von Natriumselenit 10 nM und 100 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichung. Es wurden jeweils 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet.

	basal (MW±SD)		Selen 10 nM(MW ± SD)		Signifikanz
keine Stim.	2,58 ± 0,48	n= 6	1,77± 0,45	n= 6	p = 0,003
H ₂ O ₂ (100 µM)	11,78 ± 3,41	n= 6	5,83 ± 2,21	n= 6	p = 0,001

Tabelle 7. Der Einfluss von Natriumselenit 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet.

	basal (MW±SD)		Selen 100 nM(MW ± SD)		Signifikanz
keine Stim.	2,73 ± 0,36	n= 4	1,63 ± 0,19	n= 4	p = 0,021
H ₂ O ₂ (100 µM)	12,88 ± 3,45	n= 4	5,73 ± 1,45	n= 4	p = 0,015

Tabelle 8. Der Einfluss von Natriumselenit 100 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen bewertet.

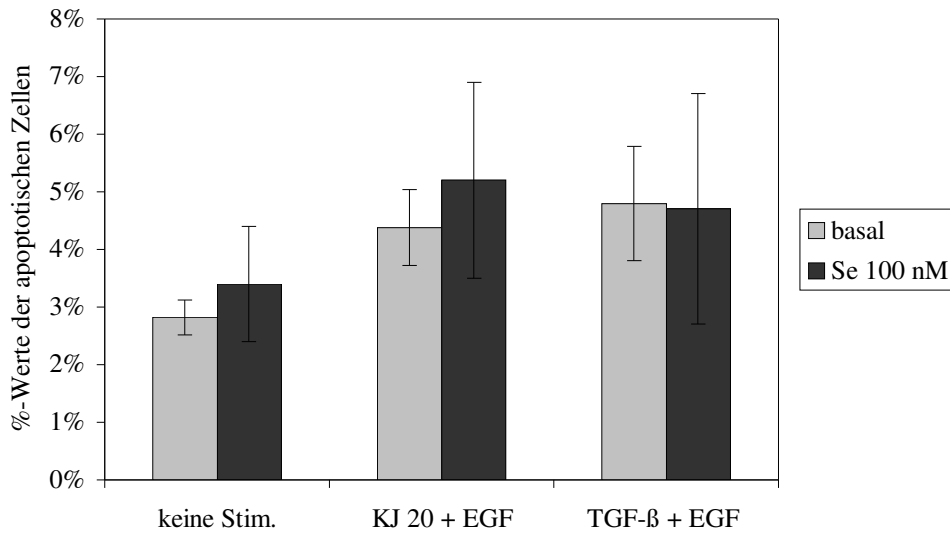


Abbildung 12. Der Einfluss von Natriumselenit 100 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen pro Zählung (n) bewertet. Angaben: KJ in μM , EGF und TGF- β in ng/ml

	basal (MW \pm SD)		Selen 100 nM(MW \pm SD)		Signifikanz
keine Stim.	2,82 \pm 0,30	n= 4	3,40 \pm 1,00	n= 4	p = 0,212
KJ 20 μM + EGF 5	4,38 \pm 0,66	n= 4	5,20 \pm 1,74	n= 4	p = 0,507
TGF- β + EGF 5	4,80 \pm 0,99	n= 4	4,70 \pm 2,03	n= 4	p = 0,949

Tabelle 9. Der Einfluss von Natriumselenit 10 nM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen bewertet. Angaben: KJ in μM , EGF und TGF- β in ng/ml

3.3.4. Der Einfluss von Methimazol auf die Apoptoserate nach Stimulation mit KJ 20 μM und EGF 5 ng/ml

Die Hemmung der Hormonsynthese mit Methimazol (MMI) verminderte die Apoptoserate signifikant: In der basalen Versuchsreihe stieg der Anteil apoptotischer Zellen unter Kaliumjodid 20 μM und EGF 5 ng/ml von $3,73 \pm 0,22 \%$ auf $6,05 \pm 0,75 \%$. Der Unterschied war signifikant ($p = 0,005$). 30-minütige Vorinkubation mit MMI (1 μM) führte dazu, dass die Apoptoserate trotz Stimulation auf dem Grundniveau verblieb. Nominal war dieser Wert ($4,10 \pm 0,51 \%$) geringfügig höher als der unstimulierte Wert, diese Differenz erwies sich jedoch als nicht signifikant ($p = 0,275$).

Unter Selen 10 nM war der Effekt ähnlich ausgeprägt. Die Apoptoserate war hier insgesamt niedriger und unterschied sich, außer unter MMI, signifikant von den Werten der basal kultivierten Zellen. Durch Stimulation erhöhte sich der Index um 1,5 %-Punkte von $2,75 \pm 0,27 \%$ auf $4,25 \pm 0,44 \%$ ($p = 0,005$). Wurden die Zellen zusätzlich zur Stimulation mit MMI (1 μM) versehen, stieg die Apoptoserate nur leicht an, von $2,75 \pm 0,27 \%$ auf $3,25 \pm 0,40 \%$. Der Unterschied erwies sich auch hier als nicht signifikant ($p = 0,138$).

Vergleich:			Signifikanz	
keine Stim. / KJ 20 + EGF5	$3,73 \pm 0,22 \%$	$6,05 \pm 0,75 \%$	$p = 0,005$	basal
KJ 20 + EGF / KJ 20 + EGF 5 + MMI	$6,05 \pm 0,75 \%$	$4,10 \pm 0,51 \%$	$p = 0,005$	basal
keine Stim. / KJ 20 + EGF 5 + MMI	$3,73 \pm 0,22 \%$	$4,10 \pm 0,51 \%$	$p = 0,275$	basal
keine Stim. / KJ 20 + EGF5	$2,75 \pm 0,27 \%$	$4,25 \pm 0,44 \%$	$p = 0,005$	Selen 10nM
KJ 20 + EGF / KJ 20 + EGF 5 + MMI	$4,25 \pm 0,44 \%$	$3,25 \pm 0,40 \%$	$p = 0,012$	Selen 10nM
keine Stim. / KJ 20 + EGF 5 + MMI	$2,75 \pm 0,27 \%$	$3,25 \pm 0,40 \%$	$p = 0,138$	Selen 10nM

Tabelle 10: Der Einfluss von MMI 1 μM auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Angaben: KJ in μM , EGF in ng/ml, Se in nM und MMI in μM

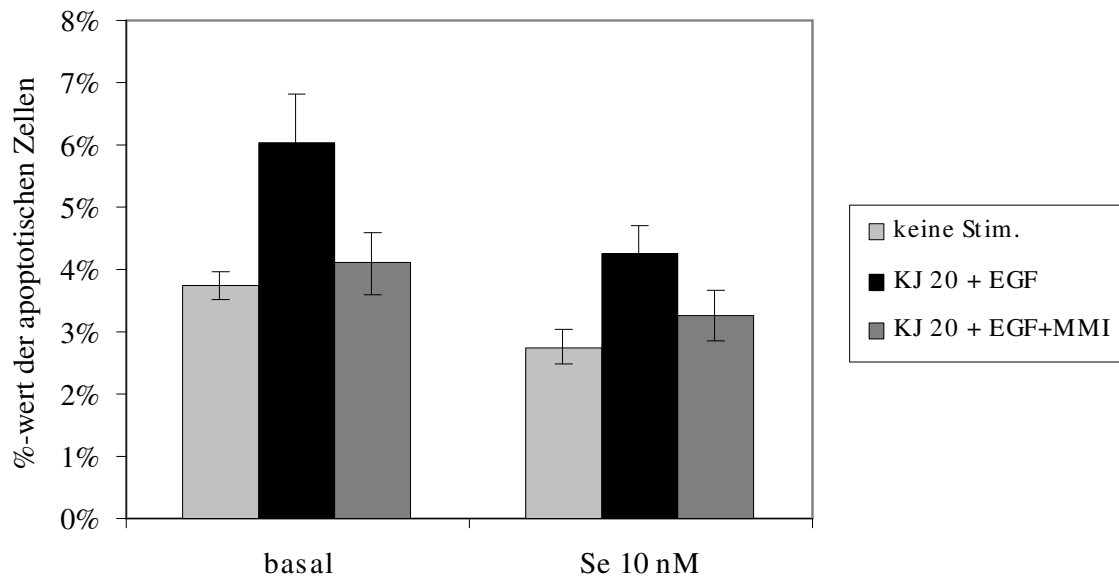


Abbildung 13. Der Einfluss von Methimazol auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben mit Standardabweichung. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen bewertet. Angaben: KJ in μM , EGF und MMI in μM

	basal (MW \pm SD)		Selen 10 nM(MW \pm SD)	
keine Stim.	3,73 \pm 0,22	n= 4	2,75 \pm 0,27	n= 4
KJ 20 + EGF	6,05 \pm 0,75	n= 4	4,25 \pm 0,44	n= 4
KJ 20 + EGF + MMI	4,10 \pm 0,51	n= 4	3,25 \pm 0,40	n= 4

Tabelle 11. Der Einfluss von Methimazol auf die Apoptoserate in humanen Schilddrüsenfollikeln. Die Werte sind in Prozentangaben. Es wurden jeweils mindestens 1000 Zellen bewertet. Angaben: KJ in μM , EGF und MMI in μM

3.4. Messung der Schilddrüsenhormone aus dem Überstand

Als Aktivitätsnachweis wurde zu zwei Zeitpunkten der Zellkultur freies T3 und T4 bestimmt: Gemessen wurde jeweils die Hormonkonzentration im Überstand nach Follikelbildung in der hydrophob beschichteten Petri-Perm-Schale und nach der Stimulation mit Kaliumjodid 10 μM und 20 μM . Die Messwerte unterschieden sich alle vom Leerwert, es wurde Standardkulturmedium verwendet.

	fT3	fT4
Leerwert (Kulturmedium)	0,31	1,94
basal (unstimuliert)	0,76	14,26
Se 10 nM (unstimuliert)	0,80	17,37
basal (Stim. KJ 10 μM)	0,29	2,91
Se 10 nM (Stim. KJ 10 μM)	0,34	3,58
basal (Stim. KJ 20 μM)	0,38	2,80
Se 10 nM (Stim. KJ 20 μM)	0,34	3,07

Tabelle 12. Aktivitätsnachweis der Follikel durch Messung von freiem T3 und T4 aus Überständen der Zellkultur vor und nach Stimulation.

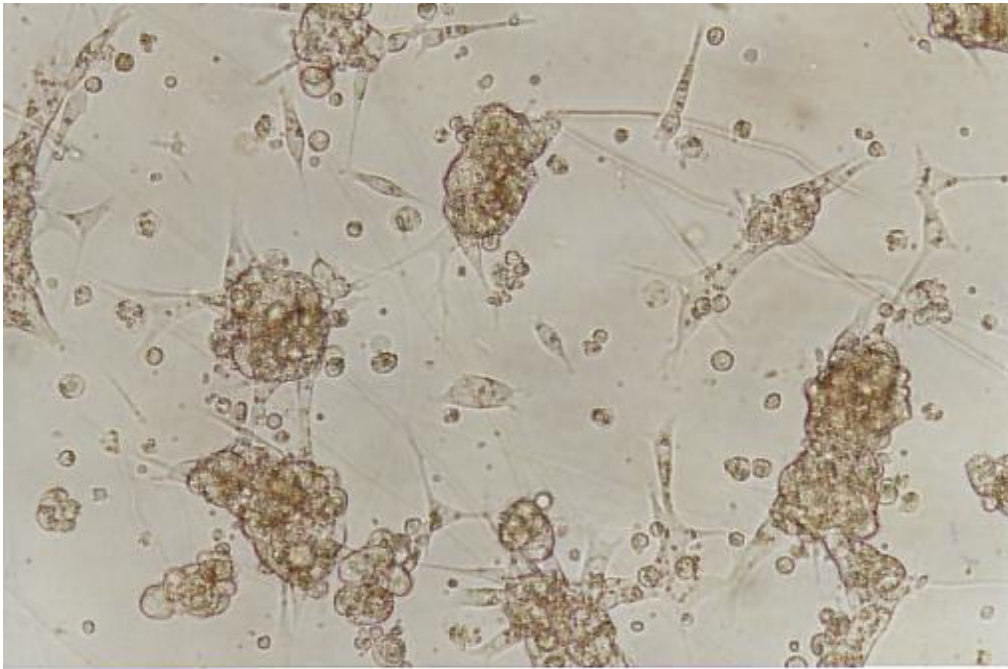


Abbildung 14. humane Thyreocyten nach Wachstum in hydrophober Petri-Perm-Schale

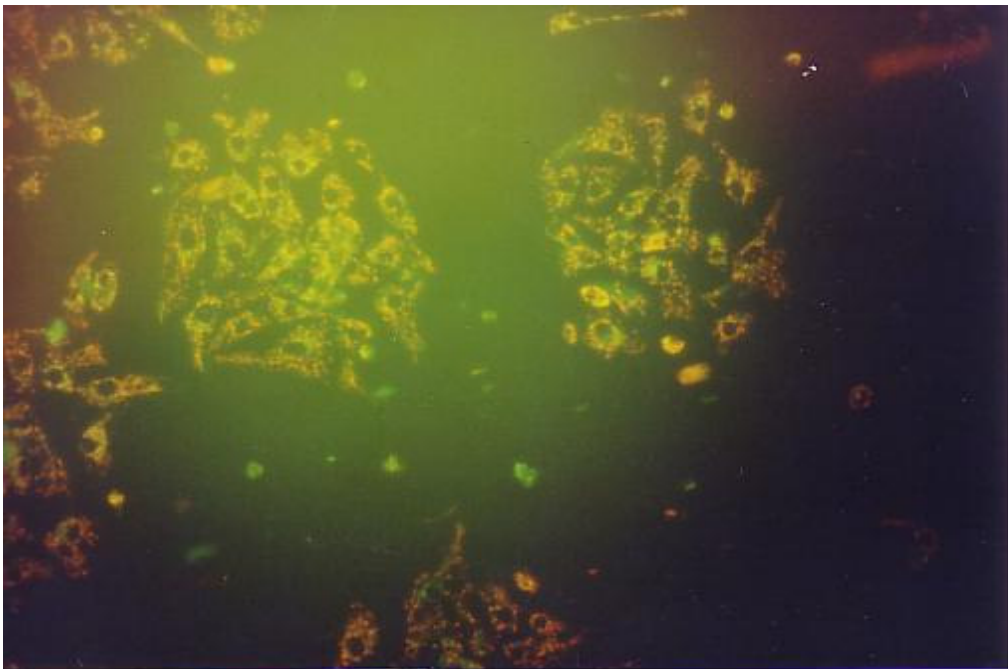


Abbildung 15. basal kultivierte Thyreocyten nach 50 Minuten Inkubation mit Kaliumjodid $20 \mu\text{M}$ und EGF 5 ng/dl

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Zellkultur

Die spezifische Funktion von Schilddrüsenzellen ist im Wesentlichen an die Follikelstruktur und den polaren Aufbau der einzelnen Zelle gebunden (Denef et al., 1980). Als kleinste funktionelle Einheit der Schilddrüse formen Thyrocyten einen durch tight-junctions verschlossenen, einschichtigen Epithelring. Das im Inneren befindliche Lumen dient als Speicherort für Thyreoglobulin, die Außenseite des Follikels ist von einer Basalmembran und Kapillaren umgeben (Bidey and Tomlinson, 1988). Die Zellen fügen sich morphologisch durch Asymmetrie in Umgebung und Funktionalität ein. Basolateral befinden sich Jodpumpe, Rezeptoren für TSH (Chambard et al., 1983) und das raue endoplasmatische Retikulum zur Thyreoglobulinsynthese. Apikal liegt der Golgi-Apparat und an der dem Lumen zugewandten Membran finden die Organifizierung von Jod sowie Endo- bzw. Exocytose der von der Zellen produzierten Hormone statt (Ericson, 1981). Thyrocyten, die als Monolayer wachsen, unterscheiden sich demnach in ihrer Physiologie deutlich von im Verbund wachsenden Follikelzellen. Da Einzelzellen mit einer Seite an der Unterlage haften, sind sie Medium, Wachstumsfaktoren und anderen Einflüssen nur schwer zugänglich. Aufgrund des Zell-Zellkontaktes sind follikelgebundene Zellen hinsichtlich des Wachstums ruhend, wohingegen Einzelzellen vermehrtes Wachstum und Teilung zeigen, bis sie einen geschlossenen Zellverband bilden. Ebenso haben sie ihre Jod- und Thyreoglobulinvorräte und damit ihre typischen physiologischen Eigenschaften verloren (Toda et al., 1995).

Unter TSH-Deprivation kommt es zur Bildung so genannter inside-out Follikel mit gestörter Zellfunktion (Inoue et al., 1980). Durch Umkehr der Polarität ist die basolaterale Seite dem Lumen zugewandt - Jodpumpe und Rezeptoren liegen hier verborgen. Ebenso wird Thyreoglobulin in das umgebende Medium abgesondert (Herzog, 1983).

Versuche an intakten, porcinen Schilddrüsenfollikeln mit erhaltener Zellpolarität zeigten TSH-abhängige Jodaufnahme und Hormonsekretion. (Gärtner et al., 1985b) Diese, den physiologischen Bedingungen entsprechenden Umstände wurden in unseren Untersuchungen an humanen Schilddrüsenfollikeln genutzt. In hydrophob beschichteten Petri-Perm Schalen, die ein Anwachsen verhinderten und statt dessen die „Wiederfindung“ der Zellen untereinander förderten, konnte mikroskopisch die Bildung von kugeligen Zellaggregaten beobachtet werden. Sie unterschieden sich nur in ihrer Größe von intakten, isolierten Follikeln aus frisch präparierten Schilddrüsen. Messungen aus dem Kulturmedium zu mehreren Zeitpunkten zeigten eine Produktion von freiem T3 und T4 und bewiesen somit den intakten Stoffwechsel der Zellen.

Die Möglichkeiten zur Gewinnung von humanem Schilddrüsenewebe sind, im Gegensatz zu porcinen Gewebe, eingeschränkt und erlauben nur die Verwendung von pathologisch verändertem Material aus Operationen. Die Physiologie der Schilddrüsen weist jedoch artspezifische Unterschiede auf (Rapoport et al., 1982; Kraiem et al., 1991). Für unsere Untersuchungen bevorzugten wir deshalb die Verwendung von humanem Schilddrüsenewebe. Ein weiteres Problem stellte die Inhomogenität des Materials dar. Das schwankende Alter und die unterschiedlichen Erkrankungen der Patienten spiegeln sich in der Qualität des Gewebes wider. Durch Ausschluss schlechter Drüsen einerseits und durch Vereinigung und gemeinsames Wachstum der Zellen unterschiedlichen Ursprungs andererseits, versuchten wir, diese Ungleichheit zu beheben und homogene, qualitativ gleichwertige Proben herzustellen.

4.1.2. Nachweis der Apoptose

Wahl der Methode

Die herausragende Bedeutung der Apoptose in physiologischen und pathologischen Prozessen aller Bereiche führte zu intensiver Forschung und der Etablierung einer Fülle von Nachweisverfahren. Neben dem Goldstandard der aufwendigen Elektronenmikroskopie (Savill, 1994) und anderen Verfahren zur Beurteilung morphologischer Kriterien wurden eine Reihe cytochemischer Methoden entwickelt. Nennenswert sind unter anderem in situ end-labelling (ISEL), Nachweis von Annexin V und Phosphatidylserin oder, als neuere Methoden, Nachweis der Caspasen und Cytochrom c. (Barrett et al., 2001)

Für unsere Untersuchungen war eine Methode nötig, die die quantitative Erfassung der apoptotischen Zellen ermöglichte und sensitiv genug war, um eine niedrige Apoptoserate zu erfassen. Diese liegt bei porcinen Schilddrüsenfollikeln unter 10 % (Bechtner et al., 1999). Zudem musste der Nachweis am intakten Follikel geschehen, da durch eine Vorbehandlung zur Erzielung von Einzelzellen eine falsch-hohe Apoptoserate zu befürchten war.

Nachweis von Strangbrüchen mittels ISNT und Gel-Elektrophorese

Breite Anwendung unter den cytochemischen Methoden findet die Markierung von Strangbrüchen, die bei der Degradierung der DNA durch Endonukleasen entstehen. Die hierfür am gebräuchlichsten Methoden basieren auf ISEL (in situ end-labeling) und werden entweder als in situ nick-translation (ISNT) oder mittels terminaler Transferase (TUNEL) durchgeführt. TUNEL wurde bislang wegen seiner Neigung zur Artefaktbildung (Ansari et al., 1993) und Unspezifität hinsichtlich der Markierung (Allen et al., 1997) kontrovers diskutiert. ISNT ergibt zudem bei in Kultur gehaltenen Zellen ein stärkeres Signal (Barrett et al., 2001). Die ISNT-markierten Strangbrüche können, wie in der vorliegenden Arbeit bereits beschrieben (s. S. 26), durch Elektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden.

Es war mit dieser Methode nicht möglich, messbare Signale zu produzieren. Als Gründe hierfür sind anzuführen, dass diese Art von Nachweis eine beträchtliche Menge an DNA erfordert. Dafür muss der Prozess der Apoptose relativ synchron ablaufen (Willingham, 1999). Beide Voraussetzungen waren in unserem Kultursystem nicht zur Genüge gegeben. Gemäß Voruntersuchungen (Bechtner et al., 1999) war mit einer Apoptoserate von weniger als 10 % zu rechnen. Durch zellzyklusabhängige, unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen für Apoptoseinduktion sind zudem Unregelmäßigkeiten im zeitlichen Apoptoseablauf zu erwarten. Ferner sei erwähnt, dass Degradierung der DNA zwar ein typisches Phänomen der Apoptose ist, das jedoch nicht in allen Zellen zu seiner vollen Ausprägung gelangt (Walker et al., 1999).

Apoptosenachweis mittels ELISA

Weitere, sehr empfindliche Nachweisverfahren beruhen auf der Verwendung von monoklonalen, spezifischen Antikörpern. Toné et al. (1988) fanden heraus, dass DNA-Fragmentierung mit der Bildung von Einzelstrangbrüchen einhergeht, und die Nukleosomen, als kleinste Einheit von an Histonen gebundene DNA, in das Cytoplasma wandern. Spezifisch gegen diese Strangbrüche (Naruse et al., 1994; Frankfurt et al., 1996) gerichtete Antikörper dienen der Apoptosemessung. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Protokoll verband dieses Detektionsverfahren mit ELISA-Technik. Nukleosomale DNA apoptotischer Zellen wird auf einer mit entsprechenden Antikörpern beschichteten Platte gebunden. Ein Grund für die Wahl dieser Methode war seine hohe Sensitivität. Salgame et al. (1997) erreichten in einem ELISA von ähnlichem Aufbau eine 500 x höhere Sensitivität als durch den Nachweis der typischen DNA-Leiter mittels Gel-Elektrophorese. Zur Erstellung der Eichkurve beinhaltete der hier verwendete KIT eine Suspension von Nukleosomen aus UV-bestrahlten Daudi-Zellen. Nukleosomen aus 444 Daudi-Zellen waren als eine Einheit definiert (U/ml). Der Assay war, nach Angaben des Herstellers, imstande 0,15 U/ml von Null zu unterscheiden. Dies entspricht einer Anzahl von 30 apoptotische Zellen (oncogene research products, 2000).

Trotz dieser Angaben ließ sich kein verwertbares Ergebnis messen. Um methodische Fehler bei Zellernte und Durchführung der Versuche auszuschließen, wurden HL-60-Zellen als Kontrolle hinzugezogen. Diese zeigten nach entsprechender Inkubation eine deutlich messbare Apoptoserate. Sowohl Zugabe von Standard zu den Proben (so genannte Wiederfindung), als auch Inkubation der beschichteten Wells mit Probenlösung und nachfolgender Durchführung des ELISAs mit Standard, führten zu einer Abnahme der zu erwartenden Signalintensität. Es blieb zu vermuten, dass eine in der Zellkultur verwendete Substanz oder ein von den Follikelzellen produzierter Stoff, der durch die verschiedenen Waschschrte nicht zu eliminieren war, mit der Beschichtung interagierte.

Die daraufhin vorgenommene Stabilisierung des Belags mit Glutaraldehyd bestätigte die Vermutungen zum Teil, da bei den Proben daraufhin insgesamt höhere Werte gemessen werden konnten. Im Allgemeinen führte diese Behandlung aber zu großen Schwankungen der Doppelwerte sowie zu Ungenauigkeiten in der Eichkurve und musste deshalb verlassen werden.

Weder durch Gel-Elektrophorese noch durch einen hoch-sensitiven ELISA war es gelungen einen Apoptosenachweis zu erbringen. Ähnliche Probleme zeigten sich auch in einem Kultursystem adhärent wachsender Astrocyten (Micoud et al., 2001). Nach Apoptoseinduktion durch Urin von Patienten, die an Multipler Sklerose erkrankt waren, verglichen die Autoren verschiedene Nachweisverfahren untereinander und in Referenz zur Flow Cytometrie Analyse nach Färbung mit Propriumjodid. Auch hier ergab sich keine typische DNA-Leiter und kein messbares Signal im ELISA, wohingegen verschiedene Färbungen mit Immunfluoreszenz (TUNEL, Annexin V, Phosphatidylserin) Apoptose-positiv waren.

Messung der Apoptoserate mit einem Mitochondrial Potential Assay

Änderung der Permeabilität und Intaktheit von Zellorganellen oder -membranen werden für verschiedene apoptotische Nachweisverfahren genutzt. Farbstoffe, die sich aufgrund von Größe oder chemischer Eigenschaften nur unter bestimmten Bedingungen anreichern, lassen eine relativ gute Unterscheidung von lebenden und apoptotischen Zellen zu. Auch die Abgrenzung von Nekrosen ist möglich. Als Substanzen mit diesen Eigenschaften sind vor allem Propriumjodid und DAPI weit verbreitet (Willingham, 1999). Eine weitere, gute Möglichkeit zur Identifikation apoptotischer Zellen stellen die Mitochondrien dar. Dysfunktionen der Mitochondrien sind ein frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose. Noch vor Veränderungen im Zellkern kommt es zum Zusammenbruch des Membranpotentials, Entkoppelung der oxidativen Phosphorylierung von der ATP-Bildung und zur Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (Webb et al., 1997).

Verschiedene Nachweisverfahren von Apoptose orientieren sich an diesen Veränderungen. Es besteht die Möglichkeit der Messung freiwerdender mitochondrieller Proteine, wie Cytochrom c oder der proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie. Ebenso kann der Anstieg des intramitochondriellen freien Calciums gemessen werden. Eine weitere, etablierte Methode bedient sich der Tatsache, dass aufgrund des bestehenden negativen Membranpotenzials von -180 bis -200 mV verschiedene lipophile Kationen in den Mitochondrien angereichert werden. Mithilfe fluoreszierender oder markierter Substanzen kann der Zusammenbruch des Potenzials quantifiziert werden. Gebräuchlich sind Rhodamin- und Zyaninderivate. Ein Problem dieser Methode ist die teilweise unspezifische Bindung dieser Stoffe in anderen Zellkompartimenten und ihre Phototoxizität, durch deren Auswirkung auf besonders lichtempfindliche Strukturen in den Mitochondrien sie teilweise selbst zur Induktion von Apoptose befähigt sind und sogar zur Therapie von Tumoren herangezogen werden (Bernardi et al., 1999).

Wir verwendeten JC-1 (s. S. 32), ein Zyaninderivat, das sich bei intaktem Membranpotenzial in den Mitochondrien anreichert und dort reversibel rot-fluoreszierende Aggregate bildet. Im Gegensatz zu anderen Substanzen geschieht diese Anreicherung selektiv in den Mitochondrien. Nach Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotenzials in untergehenden Zellen verbleibt der Farbstoff als grünes Monomer im Zytoplasma. Die Konzentration der Aggregate steht in linearer Abhängigkeit zu Potenzialänderungen, die durch Messungen mit TPP⁺-Elektroden und über Kalkulation des K⁺-Diffusionspotenzials ermittelt werden konnten (Cossarizza et al., 1996; Reers et al., 1991). Mit dieser Methode war die Bestimmung der Apoptoserate am intakten Follikel möglich. Die Zellen erwiesen sich als gut färbbar und anhand der festgelegten Kriterien ließen sich lebende von apoptotische Zellen deutlich unterscheiden. Die Auswertung wurde von zwei erfahrenen Personen vorgenommen, die unabhängig voneinander vorgingen. Die jeweiligen gemittelten Zählergebnisse zeigten wenig Abweichung und waren rekonstruierbar. Die Ergebnisse sind im Einklang mit den in Voruntersuchungen an porcinen Follikeln erzielten Resultaten. Die Apoptoseraten wurden hier jeweils durch TUNEL-Assay und Elektronenmikroskopie bestätigt (Bechtner et al., 1999; Langer et al., 2003).

Inkubationszeit

Degradierung der DNA ist ein frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose (Webb et al., 1997). Im weiteren Verlauf des Zelluntergangs kommt es zur Instabilität und Durchlässigkeit der Membran, die DNA-Bruchstücke treten aus der Zelle aus und gehen für den Nachweis verloren. Mangelnde Synchronisierung beim Eintritt der Apoptose in den Zellen ist demnach hinderlich, und so versuchten wir, einen Zeitpunkt zu wählen, der uns ein Maximum an Zellen im Stadium der Messbarkeit lieferte. Aus einer Zeitreihe (30 min, 1 h, 2 h, 3 h) wählten wir die Inkubationslänge aus, die das stärkste Signal zeigte. Es ergab sich ein Optimum, das zwischen 30 min und 1 h lag. Deshalb wurden 50 min als Standardinkubationszeit festgesetzt.

4.1.3. Fazit

Die Rekonstruktion von intakten Follikeln *in vitro* ermöglicht das Studium verschiedener Prozesse im Metabolismus der Schilddrüse unter nahezu physiologischen Bedingungen. Im Gegensatz zu Einzelzellen erhalten im Verbund wachsende Thyreozyten ihre spezifische Funktion und polare Zellanordnung aufrecht. Dieses Modell ist nicht nur besonders aussagekräftig hinsichtlich der Regulation von Wachstum und Involution in der Schilddrüse, sondern erlaubt eine genaue Beobachtung apoptotischer Vorgänge, da untergehende Zellen *in-vivo* innerhalb kurzer Zeit von Nachbarzellen und Makrophagen beseitigt werden. Durch die Verwendung humaner Thyreozyten wurden speziesspezifische Unterschiede ausgeschlossen.

Potenzialstörungen in den Mitochondrien, ein frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose, ließen sich darstellen, ohne dass die Follikelstruktur zerstört werden musste. Die Methode gewährleistete eine schonende Behandlung der Follikel und durch gute Beurteilbarkeit der Zellmorphologie eine aussagekräftige Ermittlung der Apoptoserate.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Induktion der Apoptose

Kaliumjodid

Der inhibierende Einfluss von Jod auf das Wachstum von Schilddrüsenzellen und seine Rolle bei der Strumainvolution sind oftmals belegt worden. Dieser Effekt zeigte sich sowohl in vivo in verschiedenen Tiermodellen (Wollmann et al., 1968; Van den Hove-Vandenbroucke et al., 1982; Mahmoud et al., 1986), als auch in vitro an FRTL-5 Zellen (Golstein und Dumont, 1996) und Schilddrüsenzellkulturen in Form von Monolayer (Sherwin et al., 1975; Rapoport et al., 1976). In Versuchen an porcinen Follikeln zeigte sich eine wachstumsfördernde Wirkung von Jod in geringen Dosen (1 μM), in höheren Dosen (5 μM – 80 μM) überwog jedoch der proliferationshemmende Effekt (Dugrillon und Gärtner, 1992; Gärtner et al., 1985). Durch neuere Untersuchungen konnten anhand von morphologischen Kriterien, Nachweis typischer DNA-Bruchstücke und anderen spezifischen Verfahren festgestellt werden, dass die jodinduzierte Zellabnahme über den Mechanismus der Apoptose stattfindet (Vitale et al., 2000; Burikanov et al., 2000; Tamura et al., 1998). Ebenso konnte gezeigt werden, dass als vermittelnde Substanzen der jodinduzierten Apoptose die so genannte Jodlaktone eine wichtige Rolle spielen. Hierbei handelt es sich um jodinierte Derivate mehrfach ungesättigter Fettsäuren (Langer et al., 2003).

Während in Einzelzellkulturen hohe Joddosen von 10 mM (Golstein und Dumont, 1996) oder auch 50 mM (Vitale et al., 2000) zur Apoptoseinduktion erforderlich sind, zeigten unsere als Follikel kultivierten Zellen bereits bei geringen Konzentrationen von 10-20 μM einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate. Als Grund hierfür lässt sich zum einen der bereits erwähnte Unterschied in der Physiologie der polaren, im Follikelverband eingebetteten zur allein wachsenden Zelle nennen. Zum anderen wird für Einzelzellen ein anderer Weg der Jodaufnahme postuliert. Jod entfaltet hier seine Wirkung erst über die Jodination von Oberflächenproteinen. (Rodesch et al., 1968) Die apoptotische Wirkung von Jod scheint spezifisch für die Schilddrüse zu sein. Vitale et al. (2000) inkubierten Osteosarkomzellen und Fibroblasten mit Jod, ohne eine Wirkung festzustellen.

Thyreocytenstimulierendes Hormon

Das thyreocytenstimulierende Hormon (TSH) übt Einfluss auf die strukturelle und vor allem funktionelle Differenzierung der Schilddrüse aus. Das Hormon bewirkt durch Rezeptorbindung die Stimulierung des membrangebundenen Adenylatcycalse-Komplexes und die Bildung des second-messenger cAMP. Hierdurch werden die spezifischen Funktionen wie Jodaufnahme, Hormonproduktion und -abgabe gesteigert (Gärtner, 1997a). Ebenso können verschiedene TSH-induzierte Veränderungen in der Zellmorphologie beobachtet werden. Die Zellachse vom basolateralen zum apikalen Pol verlängert sich, und luminal werden Mikrovilli zur Resorption von Thyreoglobulin ausgebildet (Tash et al., 1981). Einerseits wirkt TSH der Apoptose entgegen. Über die Blockade von FAS (Kawakami et al., 1996) und Verminderung der Konzentration von TGF- β -mRNA (Gärtner et al., 1997b) kann TSH Apoptose verhindern, TSH-Entzug hingegen führt in vitro zur Induktion von Apoptose (Dremier et al., 1994). Andererseits fördert TSH die Organifizierung von Jod und damit die Radikalentstehung, was zu einer vermehrten Apoptoseneigung führt. Zur Steigerung des Effekts von Kaliumjodid stimulierten wir deshalb die Zellen zusätzlich mit TSH in folgenden Konzentrationen: TSH 1 mU/ml + KJ 5 μ M und TSH 10 mU/ml + KJ 10 μ M; die daraus resultierende Apoptoserate zeigte sich konzentrationsabhängig.

Transforming Growth Factor- β -1

Transforming Growth Factor- β -1 (TGF- β -1) ist ein autokriner, inhibierend auf Wachstum wirkender Regulationsfaktor in epithelialen Zellen, einschließlich Thyreocyten. Er beeinflusst Zellzusammenhalt, Matrixformation und verhindert eine überschießende Proliferation der Schilddrüse nach Wachstumsstimulation (Gärtner et al., 1997b; Gärtner et al., 1998). Ebenso werden cAMP-induzierte Mechanismen, wie die Jodaufnahme, gehemmt (Gärtner et al., 1997a). Seine Fähigkeit, Apoptose zu induzieren konnte in vivo und in vitro nachgewiesen werden. TGF- β führt durch Minderexpression von antiapoptotischen Substanzen zu einer Sensibilisierung der sezernierenden Zelle und veranlasst die umliegenden Zellen zur Produktion von proapoptotischen Signalstoffen (Haufel et al., 1999). Dies gilt sowohl für Thyreocyten (Bechtner et al., 1999), als auch für Zellen anderer Gewebe (Oberhammer et al., 1991; Kyprianou et al., 1989). Für unsere Versuche wurde humanes, rekombinantes TGF- β -1 in einer Kombination von 5 ng/ml verwendet. Es zeigte sich damit ein signifikanter

Unterschied im Vergleich zur basalen Apoptoserate, sowohl bei mit als auch ohne Selen (10 nM) kultivierten Zellen.

Epidermal Growth Factor-1

Epidermal growth factor (EGF-1) unterstützt das Wachstum in den meisten Zellen epithelialer Herkunft. Auch in Thyreocyten stellt er in vitro einen potenten Wachstumsfaktor dar (Gärtner et al., 1985; Bourke et al., 1991), jedoch, im Gegensatz zu TSH, mit einer entdifferenzierenden, die Jodaufnahme und Hormonproduktion inhibierenden Wirkung (Eggo et al., 1984). Beide Substanzen antagonisieren den jeweiligen Einfluss des anderen in der Zielzelle (Gärtner et al., 1990), sowie auch ihren eigenen. TSH erhöht die EGF-Rezeptorexpression an der basolateralen Membran (Westermarck et al., 1986), und EGF hemmt gleichzeitig seine Wachstumsinduktion durch Vermehrung der TGF- β -mRNA (Gärtner 1997a). In vivo wird EGF bzw. sein Rezeptor im gesunden Schilddrüsengewebe nicht exprimiert. Immunhistochemische Färbungen zeigen die Beschränkung seiner Ausprägung auf maligne verändertes Gewebe (Gorgoulis et al., 1992) und multinodulare Strumen (Sugenoya et al., 1992). In der vorliegenden Arbeit wurde die apoptoseunterstützende Wirkung dieses Botenstoffes genutzt. In vorangehenden Studien ließ sich die Apoptoserate unter TGF- β durch Vorinkubation der Zellen mit EGF in einer Konzentration von 5 ng/ml nochmals signifikant erhöhen (Bechtner et al., 1999).

Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Jodid wird über einen basolateral gelegenen Transporter aktiv in der Schilddrüsenzelle angereichert und zur Hormonsynthese durch die thyreoidale Peroxidase oxidiert (Nunez und Pommier, 1982). Für diese Reaktion wird Wasserstoffperoxid generiert (Corvilain et al., 1991; Raspé und Dumont, 1995). Auch Thyreocyten sind hierfür empfindlich, im Besonderen bei Mangel an reduzierenden Substanzen, wie der Glutathionperoxidase. Sie reagieren auf hohe Konzentrationen mit Nekrose, auf niedrigere mit Apoptose. Riou et al. (1998) demonstrierten den Zelluntergang von porcinen Thyreocyten in Monolayerkultur durch Apoptose. Nach Inkubation mit H₂O₂ in Konzentrationen zwischen 50 μ M – 300 μ M ließen sich Zellen mit typischer DNA-Fragmentierung nachweisen und mittels TUNEL-Technik

quantifizieren. Höhere Konzentrationen erwiesen sich als toxisch und führten zu rascher Ablösung der Zellen. Die Veränderungen waren nicht mehr mit Apoptose assoziierbar. Ein Maximum war nach 3-4 Stunden zu beobachten, darauffolgend nahm die Apoptoserate stetig ab um nach 24 Stunden den basalen Wert zu erreichen. In weiteren Versuchen konnte eine H_2O_2 -abhängige Veränderung des Verhältnisses von Bcl-2, einem der Apoptose entgegenwirkenden Protein, zugunsten des proapoptotischen Bax gezeigt werden (Riou et al., 1999). Auch in unseren Versuchen waren die Schilddrüsenfollikel für dieses Radikal empfindlich. Nach dreistündiger Inkubation mit $100 \mu M H_2O_2$ konnte eine deutliche Zunahme der Apoptoserate verzeichnet werden.

4.2.2. Inhibition der Hormonsynthese durch Methimazol

Methimazol, ein Thyreostatikum aus der Gruppe der Thionamide, hemmt spezifisch die Schilddrüsenperoxidase und somit die Oxidation von Jodid (Forth, 1998). Dementsprechend unterbleibt auch die Bildung des bei dieser Reaktion als Elektronenempfänger dienenden Radikals H_2O_2 . Dugrillon und Gärtner (1992) zeigten in Wachstumsexperimenten, dass die proliferationshemmende Wirkung von Jodid, die, wie bereits in dieser Arbeit beschrieben, über den Mechanismus der Apoptose gesteuert wird, durch MMI aufgehoben werden kann. Auch in unseren Untersuchungen war MMI imstande, die Wirkung von Kaliumjodid zu unterdrücken und die Apoptoserate auf basalem Niveau zu halten. Diese Tatsache verdeutlicht den Zusammenhang von Hormonsynthese und potentieller Zellschädigung und unterstreicht nochmals die Wichtigkeit von Selen in seiner enzymgebundenen Form für Thyrocyten als schützende Substanz vor oxidativem Stress.

4.2.3. Die Auswirkungen von Selen auf die Apoptoserate

Es zeigte sich, dass durch Präinkubation der Thyreocyten mit Natriumselenit in einer Konzentration von 10 nM die basale und die durch Kaliumjodid, TGF- β und H₂O₂ gesteigerte Apoptoserate signifikant vermindert werden konnte. Nach Inkubation mit KJ 10 μ M und KJ mit TSH in beiden Konzentrationen konnte Selen sogar einen Anstieg verhindern. Die hiermit verzeichnete Zunahme apoptotischer Zellen erwies sich als nicht signifikant.

Ähnliche Beobachtungen konnten bereits in verschiedenen in vivo- und in vitro-Modellen gemacht werden. Yoon et al. (2002) zeigten, dass sich in HT1080-Zellen die durch H₂O₂ (500 μ M) induzierte Apoptose mit Selen in einer Konzentration von 2 μ M fast vollständig blockieren ließ. Dieser Effekt ließ sich selenbedingt zum einen auf eine Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials und zum anderen auf eine verminderte Aktivität der Caspasen zurückführen. Auch kam es unter Selen zu vermehrter Bcl-2 Produktion, Glucoseaufnahme und ATP-Bildung.

Die cytoprotektive Wirkung von Selen wurde ebenso an humanen Endothelzellen unter Bestrahlung nachgewiesen (Schleicher et al., 1999). In diesem Experiment wurden die Zellen eine Stunde vor Telekobaltbestrahlung (2 Gy und 10 Gy) mit Selenkonzentrationen zwischen 60 μ g/l und 200 μ g/l inkubiert. Dem radiogenen Wachstumsstopp konnte dadurch entgegengewirkt werden – der Proliferationsindex stieg unter allen Konzentrationen um ein Mehrfaches an.

Auch in vivo konnte ein Zellschutz durch Selen bereits belegt werden. Huang et al. (2002) verglichen elektronenmikroskopisch die Oberfläche der Aorta von Wistar Ratten, die unter selenarmer bzw. -adäquater Diät gehalten wurden und zusätzlich verschiedene Cholesterinabkömmlinge erhielten. Tiere, die an Selenmangel litten, bildeten deutlich mehr Läsionen, entzündlich veränderte Areale und Plaques an der Endothelfläche ihrer Gefäße aus.

In den beschriebenen Versuchen wurde Selen in wesentlich höheren Konzentrationen als 10 nM eingesetzt. Yoon et al. (2002) inkubierten ihre Zellen mit 2 μM , Schleicher et al. verwendeten bis zu 200 $\mu\text{g/ml}$, was einer Konzentration von ungefähr 2,6 μM entspricht. Eine weitere Studie berichtete von einem günstigen Einfluss auf den Zellzyklus von HL-60-Zellen bei 250 nM (Zeng, 2002). Toxische Wirkungen stellten sich meist erst zwischen 3 μM - 5 μM ein (Biswas et al., 2000; Ip et al., 2000). Im Widerspruch dazu war in unseren Versuchen bereits bei 100 nM kein günstiger Einfluss mehr nachzuweisen. Die Apoptoserate in den Follikeln konnte hierunter nicht mehr vermindert werden. Als Erklärung könnte zum einen dienen, dass in unseren Untersuchungen die Zellen mindestens 60 h mit Selen präinkubiert wurden, während es sich in den beschriebenen Veröffentlichungen um wesentlich kürzere Einwirkzeiten handelte. Zum anderen handelt es sich bei der Schilddrüse um das Organ mit dem höchsten Selengehalt (Dickson und Tomlinson, 1967; Oster et al., 1988). Es ist dementsprechend wahrscheinlich, dass Schilddrüsenzellen, aufgrund der bedeutenden Rolle von Selen in ihrem Stoffwechsel, dieses Element stärker anreichern und das GPx-Sättigungsniveau früher erreichen. Weiterhin zeigte sich, dass der positive Effekt nur unter den „physiologischen“ Regulationsfaktoren, wie Kaliumjodid, TGF- β und TSH nachließ. Der oxidative Stress ist unter diesen Substanzen geringer ausgeprägt, erkennbar an der Apoptoserate, die maximal 6 % erreichte. Unter dem toxischen H_2O_2 konnten die Thyreocyten wiederum von der hohen Selenkonzentration (100 nM) profitieren. Hier war eine deutliche Apoptosereduktion festzustellen.

4.2.4. Proapoptotische Wirkung von Selen

Ein überhöhtes Angebot an Selen führt jenseits des Sättigungsniveaus der Selenoproteine zur Inkorporation in verschiedene nicht-enzymatische Verbindungen, die zur Induktion von Apoptose befähigt sind. Versuche zeigten, dass Selen in diesen Formen über unterschiedliche Mechanismen die Vitalität der Zelle beeinträchtigen kann.

In toxischer Verbindung mit Sauerstoff führt SeO_2 zur Abnahme von Bcl-2, vermehrter Expression von p53 und kann die DNA direkt schädigen (Wei et al., 2001). Als besonders potente Induktoren gelten Vertreter der Selen-Methylverbindungen. Die methylseleninische Säure (Methylseleninic Acid, MSeA) beeinflusst den Zellzyklus (G1-Arrest) und proapoptotische Kinasen wie AKT und JNK 1/2 (Jiang et al, 2002). Selen-Methylselenocystein (MSC) konnte Apoptose in HL-60-Zellen durch vermehrte Radikalproduktion und nachfolgender Aktivierung von Caspasen und Cytochrom c-Freisetzung bewirken (Uhee et al, 2001). Gemäß neuesten Erkenntnissen beeinflusst Selen auch die Permeabilität der Mitochondrienmembran. Eine Studie an selensubstituierten Ratten führte zu vermehrter mitochondrialer Schwellung, sowie erleichterter Calcium- und Cytochrom c-Freisetzung. Die Qualität der Mitochondrien, gemessen an der ATP-Produktion, wurde nicht beeinflusst, es kam lediglich zu einer Sensibilisierung und gesteigerten Neigung zur Apoptose (Shilo et al., 2003).

Diese über die antioxidativen Schutzmechanismen hinausgehende Wirkung der Selenverbindungen führen zu dem zweiphasigen Effekt, der vor allem für tumorprotektiven Eigenschaften von Selen verantwortlich gemacht wird.

4.2.5. Apoptoseinduktion über das Redoxpotenzial der Zelle

Die Entstehung von freien, reaktiven Radikalen als Nebenprodukt verschiedener biologischer Prozesse stellt den gesamten Organismus vor ein „Entsorgungsproblem“. Hydroxylradikale (OH^\cdot), Superoxide (O_2^\cdot) und Peroxide wie H_2O_2 bedrohen die Intaktheit von DNA und Zellstoffwechsel. Ungenügende Entgiftung kann in Störung von Signalketten, DNA-Mutation, maligner Transformation oder Apoptose resultieren (Matès et Sánchez-Jiménez, 2000). Besonders die Schilddrüse ist durch ständig bei der Hormonproduktion anfallendes H_2O_2 auf ein funktionstüchtiges System von Radikalfängern angewiesen. Selenabhängige Enzyme wie die Glutathion- und Thioredoxin-Reduktase erfüllen den größten Teil dieser Aufgabe (Köhrle 1999).

Radikalüberschuss in der Zelle, also oxidativer Stress, führt zur Aktivierung und Expressierung charakteristischer Moleküle, deren Interaktionen erst zum Teil verstanden werden. Im Folgenden soll auf NF- κ B und TNF- α eingegangen werden. Ihre Aktivität wird vor allem auch durch den Redoxstatus der Zelle gesteuert (Flohé et al., 1997).

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor von großer Bedeutung im Immunsystem. Durch DNA-Bindung stimuliert er die Produktion verschiedener Zytokine, Onkogene, Immunrezeptoren und akuter Phase Proteine mit proinflammatorischer oder proapoptotischer Wirkung (Baeuerle et Henkel, 1994). NF- κ B befindet sich ubiquitär als Komplex mit seinem inhibierenden Liganden I κ B α im Zytosol. Entsprechende Signale führen über eine Kaskade zur Phosphorylierung und Degradierung von I κ B α (Naumann et al., 1994). Der Transkriptionsfaktor diffundiert in den Zellkern und bindet dort unter anderem auch an den Promotor, der zur Neusynthese seines Inhibitors führt. I κ B α gelangt ebenfalls in den Kern, kann dort NF- κ B binden und zurück ins Zytoplasma transportieren (Rice et al., 1993; Chiao et al., 1994). NF- κ B-Aktivierung erfolgt zum einen über virale und bakterielle Antigene oder lymphozytenabhängig (Baldwin et al., 1996; Flohé et al., 1997). Zum anderen konnte gezeigt werden, dass auch Änderungen des Redoxpotenzials die Freisetzung des Transkriptionsfaktors bewirken. Substanzen, die die Radikalbildung fördern, triggern die NF- κ B-Aktivierung, während so genannte Antioxidantien inhibitorisch wirken (Hayashi et al., 1993; Schreck et al., 1991; Kretz-Remy et Arrigo, 2001).

Das Zytokin TNF- α induziert durch seine Wirkung auf Zellen mit immunmodulatorischer Funktion, sowie epithelialer und endothelialer Herkunft lokale und systemische Entzündungsreaktionen. Zudem gehört er einer Substanzfamilie an, die zur Induktion von Apoptose befähigt ist (Flohé et al., 1997; Nagata, 1997). Als molekularer Wirkungsmechanismus wird Radikalfreisetzung, vor allem H₂O₂, aus den Mitochondrien postuliert (Schulze-Osthoff et al., 1992; Hennes et al., 1993). TNF- α -bedingte Änderungen des Redoxpotenzials stimulieren unter anderem die NF- κ B-Freisetzung. Dieser Botenstoff gilt sogar als besonders potenter Induktor des Transkriptionsfaktors (Menon et al., 1995; Singh et al., 1995). Zudem wird die TNF- α -Bildung auch durch NF- κ B veranlasst (Bauerle et al., 1994). Ein Entzündungsprozess kann somit durch Radikalentstehung angeregt oder aufrechterhalten werden.

4.2.6. Schlussfolgerung

Die Pathomechanismen der Apoptose und inflammatorischer Prozesse sind über ihre auslösenden Umstände und Vermittlersubstanzen eng miteinander verknüpft. Ihre Induktion beziehungsweise Aufrechterhaltung über redoxabhängige Botenstoffe wie NF- κ B und TNF- α bietet Angriffspunkte für antioxidativ wirkende Enzyme, und die Möglichkeit der Intervention durch Optimierung des Angebots an Katalysator-Substanzen. Die Selenoenzyme GPx und TRx gehören zu den bedeutendsten Stellvertretern dieser Gruppe und spielen, wie bereits beschrieben, vor allem in der Schilddrüse eine wichtige Rolle. In vitro Versuche zeigten, dass bei gesteigerter GPx-Aktivität unter entsprechender Selensubstitution die H₂O₂-induzierte NF- κ B-Aktivierung geringer ausfiel (Kretz-Remy et al., 1996; Makropoulos et al., 1996). In selenarm kultivierten Thyrocyten konnten höhere Spiegel von NF- κ B und anderen apoptosefördernden Zytokinen festgestellt werden (Dreher et al., 1996).

Dieser Zusammenhang bietet eine Erklärung für gewisse Phänomene beim Auftreten autoimmuner und destruktiver Thyreoiditiden. Apoptose ist auch in der Schilddrüse als physiologischer Vorgang zu betrachten, im Rahmen der Strumainvolution ist sie sogar erwünscht.

Der programmierte Zelltod ist jedoch auch eng verknüpft mit krankhaften Geschehen, vor allem wenn die antioxidativen Fähigkeiten der Schilddrüse eingeschränkt sind. Dafür sprechen Selenmangelkrankheiten wie der myxödematöse Kretinismus. Die unter Jod- und Selenmangel auftretende Fibrosierung der Schilddrüse ist als Folge der eingeschränkten Funktionalität der Glutathionperoxidase zu betrachten.

Auch das Auftreten von Autoimmunthyreoiditiden wird durch niedrige Selenspiegel begünstigt. In derartig verändertem Schilddrüsengewebe wurde eine Verringerung der GPx-Aktivität und des Selengehaltes festgestellt (Köhrle et al., 1999). Zudem kann Selensubstitution bei Hashimoto-Thyreoiditis zu einer signifikanten Verminderung der Autoantikörper und zu einer Verbesserung des subjektiven Befindens führen (Duntas et al., 2003; Gärtner et al., 2002; Schmidt et al., 1998).

Passend in diesen Zusammenhang wurde auch für Jod eine proinflammatorische Wirkung festgestellt. In Versuchen an Ratten konnte durch Jodidgabe eine Thyreoiditis ausgelöst oder eine bereits bestehende Entzündung verschlechtert werden (Rasmussen et al., 1999). Ebenso wird diskutiert, dass vor allem in der durch Mangel dauerstimulierten Schilddrüse Jodgaben zur Auslösung von Autoimmunkrankheiten führen. Als Grund hierfür wird eine durch vermehrte Apoptose veränderte antigene Struktur des Organs angenommen. Unter physiologischen Umständen „verborgene“ Antigene werden nach Zelluntergang dem Immunsystem präsentiert (Salmaso et al., 2002).

Unter Berücksichtigung der genannten Aspekte lässt sich zusammenfassend sagen, dass Selen durch seine antioxidativen Eigenschaften einen protektiven Einfluss auf Thyreocyten ausübt und zur Prophylaxe und Therapieunterstützung für Erkrankungen der Schilddrüse herangezogen werden sollte.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Apoptose spielt eine zentrale Rolle in physiologischen und pathologischen Prozessen. Auch in der Schilddrüse dient sie als Mittel zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und wird als Mechanismus bei Strumainvolution, Thyreoditiden sowie maligner Entartung diskutiert. Es wurde bereits gezeigt, dass Substanzen wie Jodid in hohen Dosen, TGF- β oder EGF Apoptose induzieren können. Es wird hierbei vermutet, dass durch Radikalentstehung redoxabhängig Apoptose eingeleitet wird. Zum Schutz vor oxidativem Stress ist die Schilddrüse mit reduzierenden Enzymen ausgestattet, deren wichtigster Vertreter die Glutathionperoxidase ist. Als Selenoprotein ist ihre Aktivität von der Verfügbarkeit des Spurenelements Selen im Organismus abhängig.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Kaliumjodid, TGF- β , TSH, EGF und H₂O₂ auf das Apoptoseverhalten von Thyreocyten in Abhängigkeit von einer Präinkubation mit Natrium-Selenit untersucht. Hierfür wurden die Zellen mit Selen (10 nM, 100 nM) oder ohne Selen kultiviert und anschließend mit den genannten Substanzen Apoptose induziert. Um zu belegen, dass die H₂O₂-Entstehung bei der durch TSH und Jodid induzierten Hormonsynthese für die Apoptose verantwortlich ist, wurde die Apoptoserate von jodstimulierten Zellen mit und ohne Zugabe von Methimazol verglichen. Es handelt es sich dabei um einen Wirkstoff, der die Aktivität der thyreoidalen Peroxidase hemmt und somit die H₂O₂-Entstehung vermindert. Die Zellkultur sollte in vivo Bedingungen möglichst genau nachahmen. Deshalb erfolgten alle Versuche an Zellen, die aus humanem Schilddrüsengewebe gewonnen und nach Wachstum als Monolayer zur Rekonstruktion funktionstüchtiger Follikel in hydrophobe Schalen überführt wurden.

Der Nachweis der Apoptose wurde mit einem Mitochondrial Potential Assay durchgeführt. Die Unterscheidung von lebenden und apoptotischen Zellen wurde durch eine Substanz ermöglicht, die in der Membran intakter Mitochondrien aggregiert oder als Monomer im Zytoplasma apoptotischer Zellen verbleibt. Der jeweilige Zustand lässt sich durch unterschiedliche Farberscheinung im Fluoreszenzlicht abgrenzen.

Die Zahl apoptotischer Zellen in basal kultivierten Proben stieg durch Inkubation mit Kaliumjodid, TSH, TGF- β und EGF von einer Grundrate von 2-3 % auf 5-6 %, unter H₂O₂ auf 12 % an. Mit Selen (10 nM) kultivierte Zellen zeigten nur nach Zugabe von KJ 20 μ M und TGF- β 5 ng/ml einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate, auf Werte um 4 %, bzw. 6 % unter H₂O₂. Unter Selen 100 nM ergaben sich durch Stimulation keine signifikanten Veränderungen. Der Vergleich der Apoptoseraten untereinander zeigte eine signifikante Verminderung in allen mit Selen 10 nM kultivierten Proben. Im Gegensatz dazu erwies sich Selen in einer Konzentration von 100 nM als nicht vorteilhaft. Eine signifikante Änderung der Apoptoserate war hierunter nicht erkennbar. Die deutlichsten Veränderungen waren unter H₂O₂ erkennbar. Hier erwiesen sich beide Selenkonzentrationen als antiapoptotisch wirksam, es kam zu einem Abfall der Apoptoserate von 12 bzw. 13 % auf 6 %. Die Hemmung der Jodination und Hormonsynthese mit Methimazol ließ sich in einem fehlenden signifikanten Anstieg der Apoptoserate nach Jodzugabe erkennen.

Die Ergebnisse zeigen, dass Selen in geringer Dosierung (10 nM) der apoptotischen Wirkung von Jodid und TGF- β entgegenwirken kann. Bei höheren Konzentrationen (100 nM) glichen sich der pro- und antiapoptotische Effekt von Selen gegenseitig aus. Lediglich nach Inkubation mit dem toxischen H₂O₂ konnte eine Verminderung der Apoptoserate mit beiden Konzentrationen erzielt werden. Diese Beobachtungen stützen die Annahme, dass redox-abhängigen Vorgänge für das Zellsterben verantwortlich sind. Die Tatsache, dass auch Methimazol eine Zunahme apoptotischer Zellen verhindern konnte, verdeutlicht den Zusammenhang zwischen schilddrüseneigener Hormonsynthese und programmiertem Zelltod. Dies tritt besonders deutlich unter ungenügender Selenversorgung und daraus resultierender ungenügender GPx-Aktivität hervor.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Effektivität von Selen als antioxidative Substanz mit protektiver Wirkung für Thyreocyten darzustellen und den in klinischen Studien belegten positiven Effekt einer Selensubstitution bei Autoimmunthyreoidits in vitro nachzuvollziehen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Schilddrüse besonders unter Belastung aus einer zusätzlichen Selengabe Nutzen ziehen kann. In allen Zuständen mit gesteigertem Schilddrüsenstoffwechsel, sei er durch Überfunktion, Jodsubstitution oder Entzündung bedingt, sollte deshalb eine Selensubstitution erfolgen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ALLEN RT, HUNTER WJ, AGRAWAL DK (1997)
Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis
J Pharmacol Toxicol Methods 37: 215-218
2. ANDRIKOULA M, TSATSOULIS A (2001)
The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease
Eur J Endocrinol 144: 561-568
3. ANSARI B, COATES BD, GREENSTEIN BD, HALL PA (1993)
In situ end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states
J Pathol 170: 1-8
4. ARSCOTT PL, KNAPP J, RYMASZEWSKI M, BARTRON JL, BRETZ JD, THOMPSON NW, BAKER JR (jr) (1997)
Fas (APO-1, CD95)-mediated apoptosis in thyroid cells is regulated by a labile protein inhibitor
Endocrinology 138: 5019-5027
5. ARTHUR JR, NICOL F, BECKETT GJ (1990)
Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium
Biochem J 272: 537-540
6. ASHKENAAZI A, DIXIT VM (1999)
Apoptosis control by death and decoy receptors
Curr Opin Cell Biol 11: 255-260

7. BAEUERLE PA, HENKEL T (1994)
Function and activation of NF- κ B in the immune system
Annu Rev Immunol 12: 141-179
8. BALDWIN AS (1996)
The NF- κ B and I κ B α proteins: New discoveries and insights
Annu Rev Immunol 14: 649-681
9. BARRETT KL, WILLINGHAM JM, GARVIN AJ, WILLINGHAM MC (2001)
Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis
J Histochem & Cytochem 49(7): 821-832
10. BECK MA, SHI Q, MORRIS VC, LEVANDER OA (1995)
Rapid genomic evolution of a non-virulent Coxsackievirus B3 in selenium-deficient mice
results in selection of identical virulent isolates
Nat Med 1: 433-436
11. BECHTNER G, FRÖSCHL H, SACHSE A, SCHOPOHL D, GÄRTNER R (1999)
Induction of apoptosis in porcine thyroid follicles by transforming growth factor β 1 and
epidermal growth factor
Biochimie 81: 315-320
12. BEHNE D, HILMERT H, SCHEID S, GESSNER H, KYRIAKOPOULOS A,
ELGER W (1989)
Studies on new selenoproteins and specific selenium target tissues
Selenium and medicine, Springer, Berlin-Heidelberg: 14-20
13. BEHNE D, KYRIAKOPOULOS A, MEINHOLD H, KÖHRLE J (1990)
Identification of type-I-iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme
Biochem Biophys Res Commun 173: 1143-1149

14. BERMANO G, NICOL F, DYER JA, SUNDE RA, BECKETT GH, ARTHUR JR (1995)
Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats
Biochem J 311: 425-430

15. BERNARDI P, SCORRANO L, COLONNA R, PETRONILLI V, DI LISA F (1999)
Mitochondria and cell death, mechanistic aspects and methodological issues
Eur J Biochem 264: 687-701

16. BIDEY SP, TOMLINSON S (1988)
The regulation and integration of thyroid follicular differentiation and function
Clin Endocrinol 28: 423-444

17. BISWAS S, TALUKDER G, SHARMA A (2000)
Chromosome damage induced by selenium salts in human peripheral lymphocytes
Toxicology in Vitro 14: 405-408

18. BOISE LH, GONZALEZ-GARCIA M, POSTENA CE, DING L, LINDSTEN T, TURKA LA, MAO X, NUNEZ G, THOMPSON CB (1993)
Bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death
Cell 74(4): 597-608

19. BOURKE JR, MURDOCH S, MANLEY SW, MATAINAHO T, HUXHAM GJ, WATERS MJ (1991)
Epidermal growth factor (EGF) inhibits the secretomotor response of thyroid: effects of EGF on radioiodine turnover and fluid transport in cultured porcine thyroid cells
J Endocrinol 128: 213-218

20. BRASH DE, HAVRE PA (2002)
New careers for antioxidants
PNAS 99 (22): 13969-13971

21. BURIKHANOV RB, MATSUZAKI S (2000)
Excess iodine induces apoptosis in the thyroid of goitrogen-pretreated rats in vivo
Thyroid 10 (2): 123-129

22. CHAMBARD M, VERRIER B, GABRION J, MAUCHAMP J (1983)
Polarisation of thyroid cells in culture: evidence for the basolateral localisation of the iodide pump and of the thyroid-stimulating hormone receptor-adenyl cyclase complex
J Cell Biol 96: 1172-1177

23. CHENG J, ZHOU T, LIU C (1994)
Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule
Science 263: 1759-62

24. CHIAO PF, MIYAMOTO S, VERMA IM (1994)
Autoregulation of I κ B α activity
Proc Natl Acad Sci USA 91: 28-32

25. COCLET J, FOUREAU F, KETELBANT P, GALAND P, DUMONT JE (1989)
Cell population kinetics in dog and human adult thyroid
Clin Endocrinol 31: 655-665

26. COHEN PL, EISENBERG RA (1991)
Lpr and gld : single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease
Annu Rev Immunol 9: 243-259

27. COMBS GF(Jr), GRAY WP (1998)
Chemopreventive agents: selenium
Pharmacol Ther 79: 179-192

28. CONTEM PRÉ B, DUMONT JE, BEBE N, THILLY CH, DIPLOCK AT, VANDERPAS J (1991)
Effect of selenium supplementation in hyperthyroid subjects of an iodine and selenium deficient area: the possible danger of indiscriminate supplementation of iodine-deficient subjects with selenium
J Clin Endocrinol Metab 73: 213-215

29. CORVILAIN B, VAN SANDE J, LAURENT E, DUMONT JE (1991)
The H₂O₂-generating system modulates protein iodination and the activity of the pentose phosphate pathway in dog thyroid
Endocrinology 128: 779-785

30. COSSARIZZA A, CECCARELLI D, MASINI A (1996)
Functional heterogeneity of an isolated mitochondrial population revealed by cytofluorometric analysis at the single organelle level
Exp Cell Res 222: 84-94

31. COULTAS L, STRASSER A (2000)
The molecular control of DNA damage-induced cell death
Apoptosis 5: 491-507

32. DENECKER G, VERCAMMEN D, DECLERCQ W, VANDENABELLE P (2001)
Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors
CMLS Cell Mol Life Sci 58: 356-370

33. DENEFF J-F, BJÖRKMAN U, EKHOLM R (1980)
Structural and functional characteristics of isolated thyroid follicles
J Ultrastruct Res 71: 185-202

34. DICKSON RC, TOMLINSON RH (1967)
Selenium in blood and human tissue
Clin Chem Acta 16: 311-321

35. DREHER I, KÖHRLE J (1996)
Studies on the activation of the nuclear transcription factors NF- κ B and AP1 in cultured FRTL-5 rat thyroid cells
Exp Clin Endocrinol Diabetes 104: 15

36. DREMIER S, GOLSTEIN J, MOSSELMANS K, DUMONT JE, GALAND P, ROBAYE (1994)
Apoptosis in dog thyroid cells
Biochem Biophys Res Commun 200: 52-58

37. DUGRILLON A, GÄRTNER R (1992)
The role of iodine and thyroid cell growth
Thyroidology 4 (1): 31-36

38. DUMONT JE, ERMANS AM, BASTENIE PA (1969)
Mechanism of thyroid failure in the Uele endemic cretins
J Clin Endocrinol 23: 847-860

39. DUNTAS LH, MANTZOU E, KOURTRAS DA (2003)
Effects of a six month treatment with selenomethionine in patients with autoimmune thyroiditis
Eur J Endocrinol 148(4): 389-393

40. EBERT-DÜMIG R, SEUFERT J, SCHNEIDER D, KÖHRLE J, SCHÜTZE N, JAKOB F (1999)
Expression von Selenoproteinen in Monocyten und Makrophagen – Implikationen für das Immunsystem
Med Klin 94(Suppl III): 29-34
41. EGGO MC, BACHRACH LK, FAYET G, ERRICK J, KUDLOW JE, COHEN MF, BURROW GN (1984)
The effects of growth factors and serum on DNA synthesis and differentiation in thyroid cells in culture
Mol Cell Endocrinol 38: 141-150
42. ERICSON LE (1981)
Exocytosis and endocytosis in the thyroid follicle
Mol Cell Endocrinol 22: 1-24
43. ERRICK JE, ING K, EGGO K, BURROW GN (1986)
Growth and differentiation in cultured human thyroid cells: effects of epidermal growth factor and thyrotropin
In vitro cellular & developmental biology 22(1): 28-36
44. FAMULARO G, DESIMONE C, MARCELLINI S (1997)
Apoptosis: mechanisms and relation to AIDS
Med Hypotheses 48(5): 423-429
45. FEUERSTEIN GZ, YOUNG PR (2000)
Apoptosis in cardiac disease: stress- and mitogen-activated signalling pathways
Cardiovasc Res 45(3): 560-569

46. FLOHÉ L (1997)
Selen im Peroxidstoffwechsel
Med Klin 92(Supl III): 5-7

47. FLOHÉ L, BRIGELIUS-FLOHÉ R, SALIOU C, TRABER MG, PACKER L (1997)
Redox regulation of NF- κ B activation
Free Rad Biol & Med 22(6): 1115-1126

48. FLOHÉ L, GÜNZLER WA, SCHOCK HH (1973)
Glutathion peroxidase: A selenoenzyme
FEBS Letters 32: 132-134

49. FLOYD RA, HENSLEY K (2002)
Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases
Neurobiol Aging 23(5): 795-807

50. FORTH W, HENSCHLER D, RUMMEL W, STARKE K (1998)
Allgemeine und spezielle Pharmakologie, S. 629/ S. 661-663/ S. 348, 7. Auflage
Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford

51. FRANKFURT OS, ROBB JA, SUGARBAKER EV, VILLA L (1996)
Monoclonal antibody to a single-stranded DNA is a specific and sensitive cellular marker of apoptosis
Exp Cell Res 226: 387-397

52. GANTHER HE (1999)
Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase
Carcinogenesis 20(9): 1657-1666

53. GÄRTNER R (1997a)
Growth factors in thyroid cells
Curr top in Pathology 91: 65-81
54. GÄRTNER R, ANGSTWURM M, SCHOTTDORF J (1997c)
Selensubstitution bei Sepsispatienten
Med Klin 92: 12- 14
55. GÄRTNER R, BECHTNER G, STÜBNER D, GREIL W (1987)
Growth regulation of porcine thyroid follicles in vitro by growth factors
Hom Metab Res Suppl 23: 61-67
56. GÄRTNER R, DUGRILLON A (1998)
Vom Jodmangel zur Struma: Pathophysiologie der Jodmangelstruma
Internist 39: 566-573
57. GÄRTNER R, GASNIER BCH, DIETRICH JW, KREBS B, ANGSTWURM MWA
(2002)
Selenium supplementation in patients with autoimmune thyroiditis decreases thyroid
peroxidase antibodies concentrations
J Clin Endocrinol Metab 87(4): 1687-1691
58. GÄRTNER R, GREIL W, DEMHARTER R, HORN K (1985)
Involvement of cyclic AMP, iodide and metabolites of arachidonic acid in the regulation
of cell proliferation of isolated porcine thyroid follicles
Mol Cell Endocrinol 42: 145-155

59. GÄRTNER R, SCHOPOHL D, SCHAEFER S, DUGRILLON A, ERDMANN A, TODA S, BECHTNER G (1997b)
Regulation of Transforming Growth Factor β 1 messenger ribonucleic acid expression in porcine thyroid follicles in vitro by growth factors, iodine, or d-Iodolactone
Thyroid 7(4): 633-640
60. GASSMANN B, BERGHOLZ-REHBRÜCKE (2000)
Dietary reference intakes, Report 3: Vitamine C und E, Selen, Carotinoide
Ernährungs-Umschau 47(7): 265-270
61. GE K, YANG G (1993)
The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China
Am J Clin Nutr 57(2): 259S-263S
62. GLATTRÉ E, THOMASSEN Y, THORESEN SO, HALDORSEN T, LUND-LARSEN PG, THEODORSEN L, AASETH J (1989)
Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer
Int J Epidemiol 18: 45-49
63. GOLSTEIN J, DUMONT JE (1996)
Cytotoxic effects of iodide on thyroid cells: difference between rat thyroid FRTL-5 cell and primary dog thyrocyte responsiveness
J Endocrinol Invest 19: 119-126
64. GORGOULIS V, ANINOS D, PRIFTIS C, EVAGELOPOULOU C, KARAMERIS A, KANAVAROS P, SPANDIDOS DA (1992)
Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in thyroid tumors
In Vivo 6: 291-296

65. GOUGEON ML, LEDRU E, LECOEUR H, GARCIA S (1998)
T-cell apoptosis in HIV infection: mechanisms and relevance for AIDS pathogenesis
Results Probl Cell Differ 24: 233-248
66. GOYENS P, GOLSTEIN J, NSOMBOLA B, VIS H, DUMONT JE (1987)
Selenium deficiency as a possible factor in the pathogenesis of myxoedematous endemic cretinism
Acta Endocrinol 114: 497-502
67. GUIMARAES MJ, PETERSON D, VICARI V (1996)
Identification of a novel SelD homolog from eukaryotes, bacteria, and archea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?
Proc Natl Acad Sci (USA) 93: 15068-15091
68. HAANEN C, VERMES I (1996)
Apoptosis: programmed cell death in fetal development
European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology 64: 129-133
69. HAUFEL T, DORMANN S, HANUSCH J, SCHWIEGER A, BAUER G (1999)
Three distinct roles for TGF- β during intercellular induction of apoptosis: a review
Anticancer Res 19(1a): 105-111
70. HAYASHI T, UENO Y, OKAMOTO T (1993)
Oxidoreductive regulation of NF- κ B. Involvement of a cellular reducing catalyst thioredoxin.
J Biol Chem 268: 11380-11388
71. HAWKES WC, HORNBOSTEL L (1996)
Effects of dietary selenium on mood in healthy men living in a metabolic research unit
Biol Psychiatry 39: 121-128

72. HENNET T, RICHTER C, PETERHANS E (1993)
Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells
Biochem J 289: 587-592
73. HERZOG V (1983)
Transcytosis in thyroid follicle cells
J Cell Biol 97: 607-617
74. HORI K, HATFIELD D, MALDARELLI F (1997)
Selenium supplementation suppresses tumor necrosis factor alpha-induced human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro
AIDS Res Hum Retroviruses 13: 325-332
75. HOWIE AF, WALKER SW, AKESON B, ARTHUR JR, BECKETT GJ (1995)
Thyroidal extracellular glutathion peroxidase: a potential regulator of thyroid hormone synthesis
Biochem J 308: 713-717
76. HUANG K, HONGMEI L, ZEXIAN C, HUIBI X (2002)
Role of selenium in cytoprotection against cholesterol oxide-induced vascular damage in rats
Atherosclerosis 162: 137-144
77. INOUE K, HORIUCHI R, KONDO Y (1980)
Effect of thyreotropin on cell orientation and follicle reconstitution in rotated suspension culture of hog thyroid cells
Endocrinology 197: 1162-1168

78. IP C, THOMPSON HJ, GANTHER HE (2000)
Selenium modulation of cell proliferation and cell cycle biomarkers in normal and premalignant cells of the mammary gland
Cancer Epidemiol Biomark Prev 9: 49-54
79. JIANG C, WANG Z, GANTHER H, LU J (2002)
Distinct effects of methylseleninic acid versus selenite on apoptosis, cell cycle, and protein kinase pathways in DU145 human prostate cancer cells
Mol Cancer Ther 1 (12): 1059-1066
80. JIANHUA H, OHTSUKA A, HAYASHI K (2000)
Selenium influences growth via thyroid hormone status in broiler chickens
British Journal of Nutrition 84: 727-732
81. KAARDINAL AFM, KOK FJ, KOHLMEIER L (1997)
Association between toenail selenium and risk of myocardial infarction in European men: the EURAMIC Study
Am J Epidemiol 145: 373-379
82. KAISER FH, BIENZ KA, ECKERT J, ZINKERNAGEL RM (1998)
Medizinische Mikrobiologie, S. 123/ 124
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
83. KAWAKAMI A, EGUCHI K, MATSUOKA N, TSUBOI M, KAWABE Y, ISHIKAWA N, ITO K, NAGATAKI S (1996)
Thyroid-stimulating hormone inhibits Fas antigen-mediated apoptosis of human thyrocytes in vitro
Endocrinology 137: 3163-3169

84. KAWAKAMI A, EGUCHI K, MATSUOKA N (1999)
Modulation of Fas-mediated apoptosis of human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxoedema
Clin Exp Immunol 110: 434-439
85. KERR JFR, WILLIE AH, CURRIE AR (1972)
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics
Br J Cancer 26: 239-257
86. KIREMIDJIAN-SCHUMACHER L, ROY M, WISHE HI, COHEN MW, STOTZKY G (1994)
Supplementation with selenium and human immune cell functions
Biol Trace Elem Res 41: 115-127
87. KIESS W, GALLAHER B (1998)
Hormonal control of programmed cell death/ apoptosis
Endocrinology 138: 482-491
88. KÖHRLE J (1996)
Thyroid hormone deiodinases – a selenoenzyme family acting as gate keepers to thyroid hormone action
Acta Med Austriaca 1/2: 17-30
89. KÖHRLE J (1999)
The trace element selenium and the thyroid gland
Biochimie 81: 527-533
90. KÖHRLE J (2000)
The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action
CMLS, Cell Mol life Sci 57: 1853-1863

91. KÖHRLE J, BRIGELIUS-FLOHÉ R, BÖCK A, GÄRTNER R, MEYER O, FLOHÉ L (2000)
Selenium in biology: facts and medical perspectives
Biol Chem 381: 849-864
92. KOGA M, HIROMATSU Y, JIMI A, TODA S, KOIKE N, NONAKA K (1999)
Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax and Bak expression in thyroid glands from patients with subacute thyroiditis
J Endocrinol Metab 84(6): 2221-2225
93. KOTANI T, ARATAKE Y, HIRAI K, FUKAZAWA Y, SATO H, OHTAKI S (1995)
Apoptosis in thyroid tissue from patients with Hashimoto's thyroiditis
Autoimmunity 20: 231-236
94. KRAIEM Z, SADEH O, YOSEF M (1991)
Iodide uptake and organification, tri-iodothyronine secretion, cyclic AMP accumulation and cell proliferation in an optimized system of human thyroid follicles cultured in collagen gel suspended in serum-free medium
Endocrinology 131: 499-506
95. KRETZ-REMY C, ARRIGO AP (2001)
Selenium: A key element that controls NF- κ B activation and I κ B α half life
BioFactors 14: 117-125
96. KRETZ-REMY C, MEHLEN P, MIRAULT ME, ARRIGO AP (1996)
Inhibition of I κ B α phosphorylation and degradation and subsequent NF- κ B activation by glutathion peroxidase overexpression
J Cell Biol 133: 1083-1093
97. KROEMER G, REED JC (2000)
Mitochondrial control of cell death
Nature Medicine 6(5): 513-519

98. KYPRIANOU N, ISAACS JT (1989)

Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration-induced programmed cell death
Mol Endocrinol 3: 1515-1522

99. LANGER R BURZLER C BECHTNER G GÄRTNER R (2003)

Evidence that apoptosis induced by iodide is mediated by iodolactones in intact porcine thyroid follicles
Exp Clin Endocrinol Diabetes (in press)

100. LEMARCHAND-BÉRAUD T, GENASSANIE AR, BAGNOLI F, CASOLI M (1972)

Thyroid function in the premature and the full term newborn
Acta Endocrinol 70: 445-453

101. LÖFFLER G, PETRIDES PE (1997)

Biochemie und Pathobiochemie, S. 168/ 169
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg

102. LOOK MP, ROCKSTROH JK, RAO GS, KREUZER KA, SPENGLER U,
SAUERBRUCH T (1997)

Serum selenium versus lymphocyte subsets and markers of disease progression and inflammatory response in human immunodeficiency virus-infection
Biol Trace Elem Res 56: 31-41

103. LUMACHI F, BASSO S (2002)

Apoptosis: Life through planned cellular death regulation mechanism, control systems, and relations with thyroid diseases
Thyroid 12(1): 27-33

104. MAHMOUD I, COLIN I, MANY MC, DENEJF JF (1986)
Direct toxic effect of iodine in excess on iodine-deficient thyroid glands: epithelial necrosis and inflammation associated with lipofuscin accumulation
Exp Mol Pathol 44: 259-271
105. MANI K, KIRSIS RN (2003)
Myocyte apoptosis: programming ventricular remodeling
J Am Coll Cardiol 41(5): 761-764
106. MATÈS JM, SÁNCHEZ-JIMÉNEZ FM (2000)
Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy
Int J Biochem & Cell Biol 32: 157-170
107. MAKROPOULOS V, BRUENING T, SCHULZE-OSTHOFF K (1996)
Selenium-mediated inhibition of transcription factor NF- κ B and HIV-1 LTR promoter activity
Arch Toxicol 70: 277-283
108. MCDONELL TJ, TONCOSO P, BRISBAY SM, LOGOTHETIS C, CHUNG LW, HSIEH JT, TU SM, CAMPBELL ML (1992)
Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer
Can Res 52(4): 6940-6944
109. MENON SD, GUY GR, TAN YH (1995)
Involvement of a putative protein-tyrosine phosphatase and I kappa B-alpha serine phosphorylation in nuclear factor kappa B activation by tumor necrosis factor
J Biol Chem 270: 18347-18351

110. MITOMO K, NAKAYAMA K, FUJIMOTO K (1994)
Two different cellular redox systems regulate the DNA-binding activity of the p50 subunit of NF κ B in vitro
Gene 145: 197-203
111. MUTAKU JF, POMA JF, MANY MC, DENEFF JF, VAN DEN HOVE MF (2002)
Cell necrosis and apoptosis are differentially regulated during goiter development and iodine-induced involution
Endocrinology 172: 375-386
112. NAGATA S (1997)
Apoptosis by death factor
Cell 88: 355-365
113. NAGATA S, GOLSTEIN P (1995)
The Fas death factor
Science 267: 1449-1445
114. NARUSE I, KEINO H, KAWARADA Y (1994)
Antibody against single-stranded DNA detects both programmed cell death and drug induced apoptosis
Histochemistry 101: 73-78
115. NAUMANN M, SCHEIDEREIT C (1994)
Activation of NF- κ B in vivo is regulated by multiple phosphorylations
EMBO J 13: 4597-4607
116. NUNEZ J, POMMIER J (1982)
Formation of thyroid hormones
Vitam Horm 39: 175-229

117. OBERHAMMER F, BURSCH W, PARZEFALL W, BREIT P, ERBER E, STADLER M, SCHULTE-HERMANN R (1991)
Effect of transforming growth factor beta on cell death of cultured rat hepatocytes
Cancer Res 51: 2478-2485
118. ONCOGENE RESEARCH PRODUCTS (2000)
Nucleosome ELISA, Detailed ELISA Protocol
119. OSTER O, SCHMIEDEL G, PRELLWITZ W (1988)
The organ distribution of selenium in German adults
Bil Trace Elem Res 15: 23-45
120. PILOTTI S, COLLINI P, RIKE F, CATTORETTI G, DELBO R, PIEROTTI MA (1994)
Bcl-2 protein expression in carcinomas origination from the follicular epithelium of the thyroid gland
J Pathol 172: 337-342
121. POMPL PN, YEMUL S, XIANG Z, HO L, HARONHANIAN V, PUROHIT D, VLOHS R, PASINERTI GM (2003)
Caspase gene expression in the brain as a function of the clinical progression of Alzheimer disease
Arch Neurol 60(3): 369-376
122. RAPOPORT B, TAKAI NA, FILETTI S (1982)
Evidence for species specificity in the interaction between TSH and thyroid-stimulating immunoglobulin and their receptor in thyroid tissue
J Clin Endocrinol and Metab 54: 1059-1062

123. RAPOPORT B, WEST MN, INGBAR SH (1976):
On the mechanism of inhibition by iodine of the thyroid adenylate cyclase response to thyrotropin hormone
Endocrinology 11
124. RASMUSSEN KA, HARTOFT-NIELSEN ML, FELDT-RASMUSSEN U (1999)
Models to study the pathogenesis of thyroid autoimmunity
Biochimie 81: 511-515
125. RASPÉ E, DUMONT J (1995)
Tonic modulation of dog thyrocyte H₂O₂ generation and Γ uptake by thyrotropin through the cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate cascade
Endocrinology 135: 965-973
126. RAYMAN MP (2000)
The importance of selenium to human health
Lancet 356: 233-241
127. REED JC (1997)
Bcl-2 family proteins: strategies for overcoming chemoresistance in cancer
Advances in Pharmacology 41: 501-513
128. REERS M, SMITH TW, CHEN LB (1991)
J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential
Biochemistry 30 (18): 4480-4486
129. RICE NR, ERNST MK (1993)
In vivo control of NF- κ B activation by I κ B α
EMBO J 12: 4685-4695

130. RIOU C, REMY C, RABILLOUD R, ROUSSET B, FONLUPT P (1998)
H₂O₂ induces apoptosis of pig thyrocytes in culture
Endocrinology 156: 315-322
131. RIOU C, TONOLI H, BERNIER-VALENTIN F, RABILLOUD R, FONLUPT P,
ROUSSET B (1999)
Susceptibility of differentiated thyrocytes in primary culture to undergo apoptosis after
exposure to hydrogen peroxide: relation with the level of expression of apoptosis
regulatory proteins, bcl-2 and bax
Endocrinology 140(5): 1990-1997
132. RODESCH F, JORTAY A, DUMONT JE (1968)
Two different iodinating systems in isolated thyroid cells
Experientia 24: 268
133. SALGAME P, VARADHACHARY AS, PRIMIANO LL, FINCKE JE, MULLER S,
MONESTIER M
An ELISA for detection of apoptosis
Nucleic Acids Research 25(3): 680-681
134. SALMASO C, BAGNASCO M, PESCE G, MONTAGNA P, BRIZZOLARA R,
ALTRINETTI V, RICHIUSA P, GALLUZZO A, GIORDANO C (2002)
Regulation of apoptosis in endocrine autoimmunity: insights from Hashimoto's thyroiditis
and Graves' disease
Ann N Y Acad Sci 966: 496-501
135. SAVILLE JS, FADOK VA, HENSON P, HASLETT C (1993)
Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis
Immunol Today 14: 131-136

136. SCHLEICHER UM, COTARELO CL, ANDREOPOULOS D, HANDT S, AMMON J (1999)
Radioprotektion humaner Endothelzellen durch Natriumselenit
Med Klin 94 (Suppl.III): 35-38
137. SCHMIDT KJ, BAYER W, SCHWEIZER T, HEWEL T (1998)
Selensubstitution - ein therapeutischer Ansatzpunkt bei Schilddrüsenerkrankungen ?
Vitaminspur 13: 33-39
138. SCHRECK R, RIEBER P, BAEUERLE PA (1991)
Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- κ B transcription factor and HIV-1
EMBO J 10: 2247-2258
139. SCHÜTZE N, DREHER I, JAKOB F (1998)
Neue menschliche Selenoproteine: Selenoprotein P und Thioredoxin
J Lab Med 22: 539-544
140. SCHULZE-OSTHOFF K, BAKKER AC, VANHAESEBROECK B, BEYAER R, JACOB WA, FIERS W (1992)
Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation.
J Biol Chem 267: 5317-5323
141. SCHWARZ K, FOLTZ CM (1957)
Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration
J Am Chem Soc 79: 3292-3293
142. SEO YR, KELLEY MR, SMITH ML (2002)
Selenomethionine regulation of p53 by a ref1- dependent redox mechanism
Proc Natl Acad Sci USA 99(22): 14548-14553

143. SHAPIRO H (1994)
Practical flow cytometry
Wiley-Liss, New York: 148-149

144. SHAMBERGER RJ, FROST DV (1969)
Possible protective effect of selenium against human cancer
Can Med Assoc J 100(14): 682

145. SHEN HM, YANG CF, LIU J, ONG CN (2000)
Dual role of glutathione in selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma cells
Free Radic Biol Med 28: 1115-1124

146. SHERWIN JR, TONG W (1975)
Thyroidal autoregulation. Iodide-induced suppression of thyrotropin-stimulated cyclic AMP production and iodination activity in thyroid cells
Biochim Biophys Acta 404: 30

147. SHILO S, ARONIS A, KOMARNITSKY R, TIROSH O (2003)
Selenite sensitizes mitochondrial permeability transition pore opening in vitro and in vivo: a possible mechanism for chemo-protection
Biochem J 370: 283-290

148. SINGH S, AGGARWAL BB (1995)
Protein-tyrosine phosphatase inhibitors block tumor necrosis factor-dependent activation of the nuclear transcription factor NF- κ B
J Biol Chem 270: 10631-10639

149. STELLER H (1995)
Mechanisms and genes of cellular suicide
Science 267: 1445-1449

150. SUGENOYA A, MASUDA H, KOMATSU M, YOKOYAMA S, SHIMIZU T, FUJIMORI M, KOBAYASHI S, IDA F (1992)
Adenomatous goitre: therapeutic strategy, postoperative outcome, and study of epidermal growth factor receptor
Br J Surg 79: 404-406
151. TAMURA M, KIMURA H, KOJI T, TOMINAGA T, ASHIZAWA K, KIRIYAMA T, NAOKATA Y, YOSHIMURA T, EGUCHI K, NAKANE P, NAGATAKI S (1998)
Role of apoptosis of thyrocytes in a rat model of goitre. A possible involvement of FAS System
Endocrinology 139 (8): 3646-3653
152. TAMURA T, STADTMAN TC (1996)
A new selenoprotein from human lung adenocarcinoma cells: Purification, properties, and thioredoxin reductase activity
Proc Nat Acad Sci (Wash) 93: 1006-1011
153. TASH JS, LEGRACE L, LYNCH DR, COX SM, BRINKELY BR, MEANS AR (1981)
Role of cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in microtubule assembly and function
Cold Spring Harbor Conference on Cell Proliferation, New York, vol. 8: 1171-1185
154. THANBICHLER M, BÖCK A (2001)
Selen: Biologie eines Spurenelements
Einsichten 1: 10-13
155. THOMSON CD, ROBINSON MF, BUTLER JA, WHANGER PD (1993)
Long-term supplementation with selenate and selenomethionine: selenium and glutathione peroxidase in blood components of New Zealand women
Br J Nutr 69: 577-588

156. TODA S, MATSUMARA S, YONEMITSU N, FUJITANI N, TERAYAMA S, FUNATSUMARU S, SUGIHARA H (1995)
Effects of various types of extracellular matrices on adhesion, proliferation, differentiation, and c-fos expression of porcine thyroid follicle cells
Cell Struct Funct 20: 345-354
157. TONÉ S, TANAKA S, KATO Y (1988)
The cell cycle population of kinetics in the programmed cell death in the limb-buds of normal and 5-bromodeoxyuridine-treated chick embryos
Dev Growth Diff 30: 261-270
158. TUJEBAJEVA RM, COPELAND PR, XU X, CARLSON BA, HARNEY IW, DRISCOLL DM, HATFIELD DL, BERRY MJ (2000)
Decoding apparatus for eukaryotic selenocystein insertion
EMBO Reports 1: 158
159. UHEE J, ZHENG X, YOON S, CHUNG AS (2001)
Se-Methylselenocysteine induces apoptosis mediated by reactive oxygen species in HL-60 cells
Free Rad Biol & Med 31(4): 479-489
160. VAN DEN HOVE-VANDENBROUCKE M-F, SANTISTEBAN P, COUVREUR M, OBREGON MF, LAMAS L (1982)
Involution of rat iodoprive hyperplastic goitre: effect of iodide administration on thyroid function and lysosomal properties
Endocrinology 10: 1812-1818
161. VILETTE S, BERMANO G, ARTHUR JR, HESKETH JE (1998)
Thyroid stimulating hormone and selenium supply interact to regulate selenoenzyme gene expression in thyroid cells (FRTL-5) in culture
FEBS Letters 438: 81-84

162. VITALE M, DI MATOLA T, D'ASCOLI F, SALZANO S, BOGAZZI F, FENZI F MARTINO E, ROSSI G (2000)
Iodide excess induces apoptosis in thyroid cells through a p53-independent mechanism involving oxidative stress
Endocrinology 14 (2): 598-605
163. VLAEMINCK-GUILLEM V, D'HERBOMEZ-BOIDEIN M, DECOULX M, WÉMEAU JL (2001)
Apoptose et thyroïde: le face à Fas
La Presse Médicale 30(2): 74-80
164. WAGNER DP, KNAUS WA, HATELL PE (1994)
Daily prognostic estimates for critically ill adults in intensive care: results from a prospective, multicenter, inception cohort analysis
Crit Care Med 22: 1359-1372
165. WALDMEIER PC (2003)
Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases
Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiatry 27(2)
166. WALKER PR, LEBLANC J, SMITH B, PANDEY S, SIKORSKA M (1999)
Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis
Methods 17: 329-338
167. WEBB SJ, HARRISSON DJ, WYLLIE AH (1997)
Apoptosis: an overview of the process and its relevance in disease
Advances in Pharmacology 41: 1-29

168. WEI Y, CAO X, OU Y, LU J, XING C, ZHENG R (2001)
SeO₂ induces apoptosis with down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of p53
expression in both immortal human hepatic cell line and hepatoma cell line
Mutat Res 490: 113-121
169. WESTERMARK K, WESTERMARK B, KARLSSON FA, ERICSON LE (1986)
Localisation of epidermal growth factor receptors on porcine thyroid follicle cells and
regulation by thyrotropin
Endocrinology 112: 1680-1686
170. WILLINGHAM MC (1999)
Cytochemical methods for the detection of apoptosis
J Histochem & Cytochem 47 (9): 1101-1109
171. WOLLMAN SH, ANDROS G, CONNON GB, EAGLETON GB (1968)
Production and involution of the hyperplastic thyroid gland
Thyroid Neoplasia: 201-209
172. WU X, BISHOPRIC NH, FISCHER DJ (1996)
Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change
Mol Cell Biol 16: 1035-1046
173. WYLLIE AH (1980)
Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease
activation
Nature 284: 555-556
174. YAN L, SPALLHOLZ JE (1993)
Generation of reactive oxygen species from the reaction of selenium compounds with
thiols and mammary tumor cells
Biochem Pharmacol 45: 278-287

175. YANG C, NIU C, BODO M, GABRIEL E, NOTBOHM H, WOLF E, MÜLLER PK (1993)
Fulvic acid supplementation and selenium deficiency disturb the structural integrity of mouse skeletal tissue. An animal model to study molecular defects of Kashin Beck disease
Biochem J 289(Pt3): 829-835
176. YOON SO, KIM MM, PARK SJ, KIM D, CHUNG J, CHUNG AS (2002)
Selenite suppresses hydrogen peroxide-induced cell apoptosis through inhibition of ASK 1/ JNK and activation of PI3-/ Akt pathways
FASEB J 16: 111-113
177. YOUNG LS, DAWSON CW, ELIOPOULOS AG (1997)
Viruses and Apoptosis
Br Med Bull 53(3): 509-521
178. YU S, HOWARD KA, WEDEKIND KJ, MORRIS JG, ROGER QR (2002)
A low-selenium diet increases thyroxine and decreases 3,5,3'triiodothyronine in the plasma of kittens
J Anim Physiol a Anim Nutr 86: 36-41
179. YU SY, ZHU YJ, LI WG (1997)
Protective role of selenium against hepatitis B virus and primary liver cancer in Qidong
Biol Trace Elem Res 56: 117-124
180. ZENG H (2002)
Selenite and selenomethionine promote HL-60 cell cycle progression
J Nutr 132: 674-679

Curriculum Vitae

Persönliche Daten:

Name: Lehmann
 Vorname: Petra
 Geburtsdatum: 04.05.1977
 Geburtsort: München

Ausbildung:

1996	Abitur am Käthe-Kollwitzgymnasium, München
1996/ 1997	Studium der französischen Sprache an der Universität Aix-en-Provence
seit 1997	Studium der Humanmedizin, LMU München
1999	Physikum
2000	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2002	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Ab 10/2002	Praktisches Jahr
10-12/02	Westmead Hospital, University of Sydney (Endokrinologie)
01-02/03	Medizinische Klinik Innenstadt (Gastroenterologie)
02-05/03	Krankenhaus München-Schwabing (Chirurgie)
06-07/03	Hopital Gui de Chauliac, Université Montpellier (Neurologie)
08-09/03	Klinikum Großhadern (Neurologie)
2003	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Seit 01/04	ÄIP in der IV. Med. Abteilung (Rheumatologie) im Krankenhaus München-Bogenhausen