Untersuchungen über die endogene Expression und Regulation des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) in extrathyreoidalen Tumoren in vitro und in vivo

Florian C. Gärtner

München 2009

Aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Schwaiger

Untersuchungen über die endogene Expression und Regulation des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) in extrathyreoidalen Tumoren in vitro und in vivo

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

vorgelegt von
Florian C. Gärtner

aus München

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Markus Essler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Stefan Endres, Prof. Dr. Christoph Nerl

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung **xiii**

1 Einleitung **1**
1.1 Grundlagen der Radioiodtherapie 1
1.1.1 Schilddrüsenhormonsynthese 1
1.1.2 Isotope zur Diagnostik und Therapie thyreoidaler Erkrankungen . . 2
1.1.3 Radioiodtherapie benigner Schilddrüsenerkrankungen 4
1.1.4 Radioiodtherapie maligner Schilddrüsenerkrankungen 5
1.2 Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) 7
1.2.1 Struktur 7
1.2.2 Funktion 7
1.2.3 Expression 9
1.3 Ziel der Arbeit 10

2 Material und Methoden **11**
2.1 Puffer 11
2.2 Medien 12
2.3 Antikörper 12
2.4 Chemikalien 12
2.5 Oligonukleotide und Plasmide 13
2.6 Radionuklide 14
2.7 Zellkultur 14
2.8 Bakterien 15
2.9 Tiermodelle 15
2.9.1 Allotransplantate 15
2.9.2 Transgene murine Modelle des kolorektalen Karzinoms 16
2.10 Anästhesie und Euthanasie 16
2.11 Iodidaufnahme in vitro 17
2.12 Iodidaufnahme in vitro unter Modulation zellulärer Signalwege 19
2.13 Proteinmengenbestimmung 19
2.14 RNA-Präparation 21
2.15 cDNA-Synthese 22
2.16 Photometrische Nukleinsäurebestimmung 22

2.17 Konventionelle PCR . . . 23
2.18 Agarose-Gelelektrophorese . . . 23
2.19 Sequenzierung . . . 24
2.20 Real-time PCR . . . 25
2.21 Immunzytochemie . . . 27
2.22 Deglykosylierung . . . 27
2.23 SDS-PAGE, Elektrotransfer und Immunoblotting . . . 27
2.24 Biodistribution in vivo . . . 28
2.25 Szintigraphie in vivo . . . 29
2.26 Genistein-Stimulation in vivo . . . 29
2.27 Statistik . . . 30

3 Ergebnisse **31**
3.1 Endogene Iodidaufnahme in vitro . . . 31
3.2 Genexpression des NIS in murinen Zelllinien . . . 36
3.2.1 Konventionelle PCR . . . 36
3.2.2 Sequenzierung . . . 37
3.2.3 Real-time PCR . . . 38
3.3 Immunfluoreszenz . . . 40
3.4 Immunoblot . . . 41
3.5 Modulation der Iodidaufnahme in vitro . . . 41
3.6 Modulation der Genexpression des NIS in vitro . . . 44
3.7 Iodidaufnahme in vivo . . . 45
3.8 Modulation der Aktivität des NIS in vivo . . . 48
3.9 NIS-Expression in murinen Modellen des kolorektalen Karzinoms . . . 49
3.10 NIS-Expression in humanen Zelllinien . . . 52
3.11 NIS-Expression in humanen kolorektalen Karzinomen . . . 54

4 Diskussion **57**
4.1 Expression des NIS in murinen extrathyreoidalen Tumorzelllinien . . . 57
4.1.1 NIS-Expression in der Brustdrüse (EMT6) . . . 57
4.1.2 NIS-Expression in Kolon und Rektum (CMT93) . . . 58
4.1.3 NIS-Expression in Bronchialgewebe (CMT64) . . . 59
4.2 Funktionelle Regulation der NIS-Aktivität . . . 60
4.2.1 cAMP . . . 61
4.2.2 Tyrosinphosphorylierung . . . 63
4.2.3 PPARγ . . . 64
4.2.4 Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase . . . 64
4.2.5 Proteinkinase C . . . 65
4.3 NIS-Expression in extrathyreoidalen Tumoren in vivo . . . 65
4.3.1 Iodidaufnahme in extrathyreoidalen Allotransplantaten . . . 65
4.3.2 Steigerung der NIS-Aktivität durch Genistein in vivo . . . 66
4.3.3 Expression in murinen transgenen intestinalen Tumoren . . . 67

4.4 NIS-Expression in humanen Zelllinien und kolorektalen Karzinomen 68
4.5 Ausblick 70

A mRNA und DNA Sequenzen **71**
A.1 Rattus norvegicus (rNIS) mRNA 71
A.2 Mus musculus (mNIS) mRNA 72
A.3 Homo sapiens (hNIS) mRNA 73
A.4 Vektorkarte pCR2.1 75

B NIS Protein Sequenzen **77**
B.1 Rattus norvegicus (rNIS) 77
B.2 Mus musculus (mNIS) 77
B.3 Homo sapiens (hNIS) 78
B.4 Protein alignment: rNIS - mNIS 78
B.5 Protein alignment: rNIS - hNIS 79

Danksagung **85**

Abbildungsverzeichnis

1.1 Strukturformel L-Thyroxin 1
1.2 Schilddrüsenhormonsynthese 2
1.3 Histologie der Schilddrüse 3
1.4 Beispiel einer ablativen Radioiodtherapie 6
1.5 Beispiel einer erfolgreichen Radioiodtherapie bei Metastasen 7
1.6 Struktur des Natrium-Iodid-Symporters 8

3.1 Zelluläre Iodidaufnahme in vitro (%) 32
3.2 Gesamtprotein 33
3.3 Zelluläre Iodidaufnahme in vitro (% / μg) 34
3.4 Inhibition der Iodidaufnahme in vitro durch $NaClO_4$ 35
3.5 konventionelle PCR `mNIS` 36
3.6 konventionelle PCR `mGAPDH` 37
3.7 Transformierte Klone des Sequenzierungsvektors pCR2.1 38
3.8 real-time PCR `mNIS` 39
3.9 Immunfluoreszenz EMT6, CMT93 und CMT64 40
3.10 Immunfluoreszenz LLC 41
3.11 Immunoblot EMT6, CMT93 und CMT64 42
3.12 Modulation der Iodidaufnahme in vitro 43
3.13 Modulation der mNIS-mRNA in vitro 44
3.14 Biodistribution $^{125}I^-$ in EMT6, CMT93 und CMT64, % ID/g 46
3.15 Biodistribution $^{125}I^-$ in EMT6, CMT93 und CMT64, Organ : Blut 47
3.16 Szintigraphie $^{99m}TcO_4^-$ in EMT6, CMT93 und CMT64 48
3.17 Modulation der NIS-Aktivität in vivo 49
3.18 mNIS-mRNA in murinen transgenen intestinalen Tumoren 51
3.19 hNIS-mRNA in humanen Zelllinien 53
3.20 hNIS-mRNA in humanen kolorektalen Karzinomen 55

4.1 NIS-Regulation in Thyreozyten 61
4.2 NIS-Regulation in EMT6, CMT93 und CMT64 62
4.3 Fehlerwahrscheinlichkeit bei humanen kolorektalen Karzinomen 69

A.1 Vektorkarte pCR2.1 76

Tabellenverzeichnis

2.1 Oligonukleotide 13
2.2 Faktoren zur Modulation zellulärer Signalwege 20
2.3 Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamidgele 28

3.1 Auf Iodidaufnahme evaluierte Zelllinien 31
3.2 Biodistribution $^{125}I^-$ in EMT6, CMT64 und CMT93, % ID/g 45
3.3 Biodistribution $^{125}I^-$ in EMT6, CMT64 und CMT93, Organ : Blut 46
3.4 mNIS-mRNA in murinen Tumoren, Übersicht 50
3.5 mNIS-mRNA in murinen Tumoren, aufgeschlüsselt nach Mutation 50
3.6 hNIS-mRNA in humanen Zelllinien 52

Zusammenfassung

Aufgrund der Expression des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) besitzt die Schilddrüse die Fähigkeit zur Iodidanreicherung. Dieser Mechanismus ermöglicht die Radioiodtherapie benigner und maligner Schilddrüsenerkrankungen. Da die Radioiodtherapie eine effektive und nebenwirkungsarme Therapiemodalität der differenzierten Schilddrüsenkarzinome ist, stellt sich die Frage, ob NIS auch in extrathyreoidalen Tumoren exprimiert ist und somit die Radioiodtherapie auch in diesen Fällen eine Option darstellen kann.

In extrathyreoidalen Geweben findet sich eine physiologische Expression des NIS in erster Linie in der Brustdrüse, im Magen, in den Speicheldrüsen und im Plexus choroideus. Extrathyreoidale Tumore betreffend wurden bisher einige Studien über die Aktivität des NIS bei Mammakarzinomen veröffentlicht: NIS-Überexpression mit konsekutiver Iodidaufnahme wurde in Zelllinien humaner Mammakarzinome und auch bei Patienten nachgewiesen. Über die funktionelle Expression des NIS in weiteren extrathyreoidalen Tumorentitäten ist jedoch deutlich weniger bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine endogene Expression des NIS mit daraus resultierender Iodidaufnahme in murinen Zelllinien aus Mamma-, Rektum- und Lungenkarzinomen nachgewiesen. Die Expression des NIS wurde funktionell durch Iodid- bzw. Pertechnetataufnahme in vitro und in vivo in präklinischen Tumormodellen dokumentiert. Molekularbiologisch konnte NIS auf mRNA- und auf Proteinebene mittels real-time RT-PCR, Immunfluoreszenzfärbungen und Immunoblots nachgewiesen werden. Es konnte in vitro eine Modulation der funktionellen Iodidaufnahme in Abhängigkeit von der Tyrosinphosphorylierung und des cAMP-Spiegels demonstriert werden. In vivo konnte in subkutanen allotransplantierten Tumoren dieser Zelllinien eine Steigerung der NIS-Aktivität durch Inhibition von Tyrosinkinasen induziert werden. Des Weiteren wurden mehrere murine transgene Modelle kolorektaler Karzinome auf NIS-Überexpression untersucht: in 14 % der Tumorgewebsproben konnte eine erhöhte Expression der NIS-mRNA dokumentiert werden.

Zusammenfassend wurde erstmals eine aktive endogene Iodidaufnahme in Tumoren kolorektalen und bronchialen Ursprungs dokumentiert und der Nachweis erbracht, dass diese Iodidaufnahme auf eine endogene Überexpression des NIS zurückzuführen ist. Des Weiteren wurde eine Steigerung der Iodidaufnahme in diesen Tumoren durch Tyrosinkinaseinhibition demonstriert. Weitere Versuche sind erforderlich um diese Ergebnisse auf humane Gewebe zu übertragen, mit dem langfristigen Ziel der Entwicklung neuer Anwendungsmöglichkeiten der Radionuklidtherapie in der Onkologie.

Kapitel 1

Einleitung

Bereits kurz nach der Entdeckung radioaktiver Isotope des Iods wurden diese seit den 1940er Jahren erfolgreich zur Therapie von Schilddrüsenerkrankungen eingesetzt [4]. Die Radioiodtherapie mit ^{131}I stellt heute eine effektive und nebenwirkungsarme Therapiemöglichkeit der Schilddrüsenüberfunktion sowie der papillär und follikulär differenzierten Schilddrüsenkarzinome dar.

1.1 Grundlagen der Radioiodtherapie

1.1.1 Schilddrüsenhormonsynthese

Iod ist mit einem molekularen Gewichtsanteil von 65 % der Hauptbestandteil des Schilddrüsenhormons L-Thyroxin (3,5,3',5'-Tetraiod-L-thyronin, L-T_4, siehe Abbildung 1.1). Die Thyreozyten benötigen daher zur Schilddrüsenhormonsynthese einen effektiven Mechanismus zur spezifischen Iodidanreicherung: Über ein Membranprotein in der basolateralen Zellmembran, den Natrium-Iodid-Symporter (NIS, siehe Abschnitt 1.2), wird aktiv Iodid in den intrazellulären Raum transportiert (siehe Abbildung 1.2). Treibende Kraft ist hier-

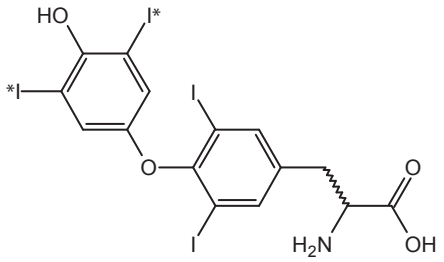

Abbildung 1.1: Strukturformel des Schilddrüsenhormons L-Thyroxin (Tetraiod-L-thyronin, L-T_4), wie es von Thyreozyten sezerniert wird [26]. Peripher entsteht durch Abspaltung eines der mit * markierten Iodatome durch Deiodasen die biologisch aktive Form Triiod-L-thyronin (L-T_3).

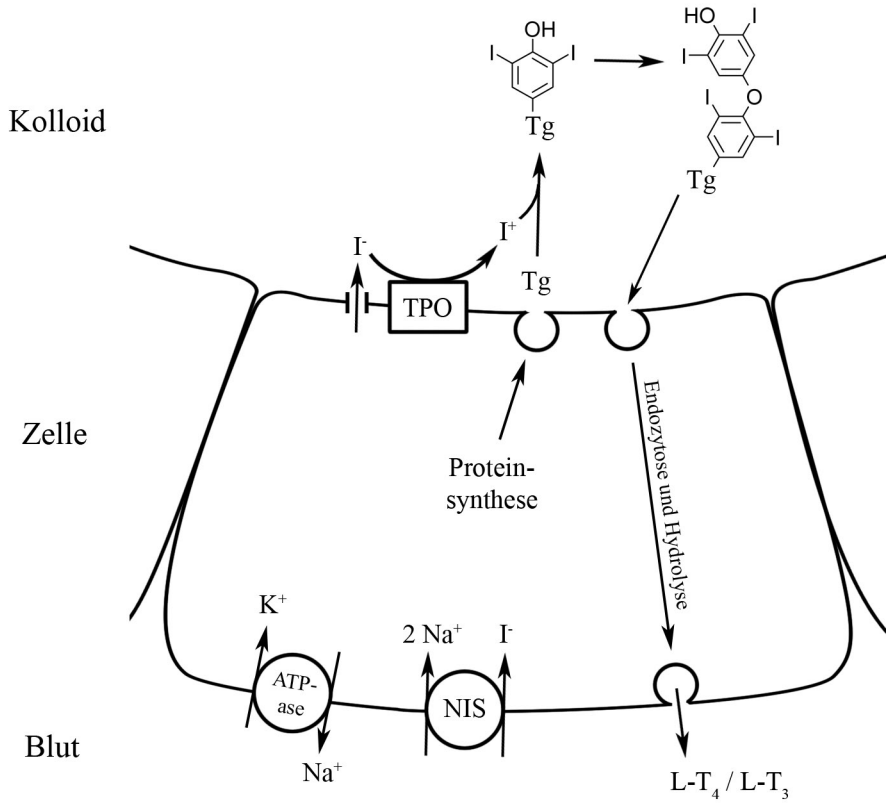

Abbildung 1.2: Iodidaufnahme in Thyreozyten und Schilddrüsenhormonsynthese, nach [8]. Über NIS wird im Kotransport mit Na^+-Ionen I^- aktiv nach intrazellulär transportiert. Dieses wird an der apikalen Zellmembran durch die TPO oxidiert, an Tyrosylreste des Thyreoglobulins (Tg) gebunden und in den Schilddrüsenfollikeln gespeichert. Durch Endozytose und Hydrolyse wird dieses dann in Form von L-Thyroxin in den Blutkreislauf abgegeben.

bei der Na^+-Gradient, der durch die Na^+/K^+-ATPase aufrecht erhalten wird. Im weiteren Verlauf der Hormonsynthese wird Iodid durch das membranständige Enzym TPO (thyreoidale Peroxidase) an der apikalen Zellmembran oxidiert und kovalent an Tyrosylreste des Glykoproteins Thyreoglobulin (Tg) gekoppelt. Ein iodierter Tyrosylrest wird auf einen zweiten Tyrosylrest übertragen, wodurch tyreoglobulingebundenes Tetraiodthyronin gebildet wird. Dieses wird extrazellulär in den Schilddrüsenfollikeln (histologisch als Kolloid bezeichnet) gespeichert (siehe Abbildung 1.3). Bei Bedarf wird dieses von den Thyreozyten endozytiert, proteolytisch gespalten und als L-Thyroxin in den Blutkreislauf abgegeben.

1.1.2 Isotope zur Diagnostik und Therapie thyreoidaler Erkrankungen

Wie auch das physikalisch stabile ^{127}I werden radioaktive Isotope des Iods mit hoher Effizienz von der Schilddrüse aufgenommen und im Verlauf der Schilddrüsenhormonsynthese an

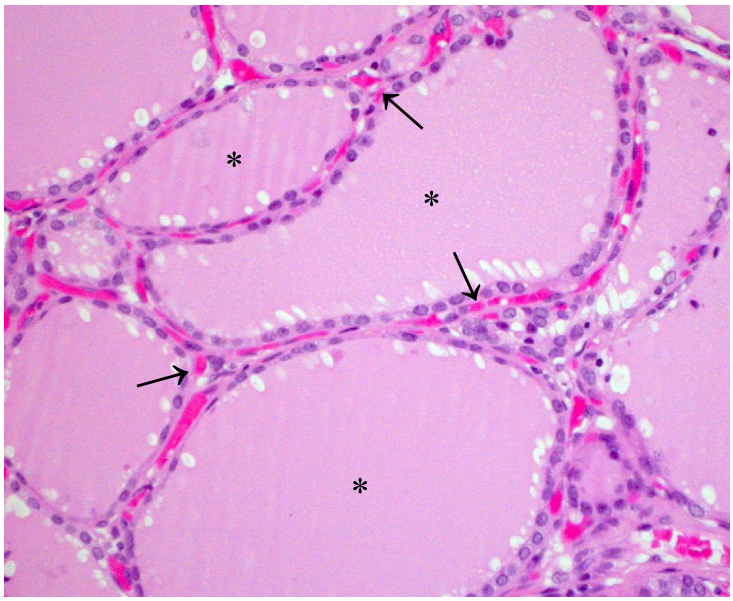

Abbildung 1.3: Histologischer Aufbau der Schilddrüse (Abdruck mit freundlicher Genehmigung von Prof. Perren, Institut für Pathologie, Technische Universität München). Mit * sind die Kolloid enthaltenden Follikel (Durchmesser ca. 0,1 – 0,8 mm) gekennzeichnet, die von einem einschichtigen Follikelepithel aus Thyreozyten umschlossen werden. Zwischen den Follikeln befinden sich Blutgefäße (Pfeile) und C-Zellen. HE-Färbung, 200-fache Vergrößerung.

Thyreoglobulin gebunden und gespeichert. Durch den radioaktiven Zerfall wird Strahlung emittiert, die je nach den physikalischen Zerfallseigenschaften des Isotops zu diagnostischen oder therapeutischen Zwecken genutzt werden kann:

- γ-Strahlung erfährt als elektromagnetische Strahlung eine relativ geringe Absorption durch das Gewebe. Sie kann zu einem großen Anteil den Körper des Patienten verlassen und von außen detektiert werden. Daher eignet sich γ-Strahlung gut zu diagnostischen Zwecken. In der Praxis kann diese rein quantitativ mit einer γ-Sonde oder räumlich aufgelöst mit einer γ-Kamera (Szintigraphie) detektiert werden. In der Nuklearmedizin kann als diagnostisches Iodisotop beispielsweise ^{123}I (physikalische Halbwertszeit $T_{\text{phys}} = 13,3$ Stunden, γ-Energie hauptsächlich 159 keV) verwendet werden.

  An dieser Stelle sei erwähnt, dass in der Praxis zur Schilddrüsendiagnostik (bei benignen Schilddrüsenerkrankungen) jedoch in der Regel $^{99\text{m}}$Tc (Technetium) statt ^{123}I verwendet wird. $^{99\text{m}}$Tc wird bevorzugt eingesetzt, da es aus kommerziell verfügbaren ^{99}Mo/$^{99\text{m}}$Tc-Generatoren jederzeit eluiert werden kann und somit eine bessere Verfügbarkeit als ^{123}I aufweist, welches nur in einem Reaktor produziert werden kann und dessen Transport aufgrund der kurzen Halbwertszeit logistisch aufwändig ist. $^{99\text{m}}$Tc weist als γ-Strahler mit 140 keV und $T_{\text{phys}} = 6,0$ Stunden ebenfalls hervorragende physikalische Eigenschaften zur nuklearmedizinischen Diagnostik auf. $^{99\text{m}}$Tc wird in seiner oxidierten Form (Pertechnetat, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) als Iodidanalogon ebenfalls

von Thyreozyten aufgenommen (siehe Abschnitt 1.2.2), jedoch im Rahmen der Schilddrüsenhormonsynthese nicht weiter metabolisiert.

- β-Strahlung besteht aus Elektronen. Als Korpuskularstrahlung wird diese in in deutlich höherem Maße als γ-Strahlung im Gewebe absorbiert, wobei nahezu die gesamte Energie auf das Gewebe übertragen wird. Daher werden β-Emitter vornehmlich zu therapeutischen Zwecken verwendet. In der Praxis wird zur Radioiodtherapie als Iodisotop ^{131}I ($T_{\text{phys}} = 8,0$ Tage) verwendet. Die mittlere Reichweite der β-Strahlung des ^{131}I ($E_{\text{max}} = 807$ keV) im Gewebe beträgt 0,44 mm bei einer maximalen Reichweite von 2,2 mm [5], daher ist bei einer Radioiodtherapie die Strahlenwirkung lokal auf iodspeicherndes Gewebe beschränkt.

  Zusätzlich emittiert ^{131}I ebenfalls γ-Strahlung (hauptsächlich 364 keV), die bei einer therapeutischen ^{131}I-Applikation gleichzeitig zu diagnostischen Zwecken genutzt werden kann.

1.1.3 Radioiodtherapie benigner Schilddrüsenerkrankungen

Die Radioiodtherapie kann zur Behandlung von Schilddrüsenautonomien, der Autoimmunthyreopathie vom Typ M. Basedow und zur Volumenreduktion einer euthyreoten Struma eingesetzt werden.

Die Radioiodtherapie fokaler Schilddrüsenautonomien („heiße Knoten“) wird bei einem supprimierten TSH-Spiegel (TSH $<$ 0,03 mU/L) durchgeführt. Dadurch wird erreicht, dass nur das autonome Gewebe, welches nicht mehr der TSH-Regulation unterliegt, $^{131}I^-$ aufnimmt. Das paranoduläre Schilddrüsengewebe zeigt aufgrund der fehlenden TSH-Stimulation keine Iodidaufnahme. Durch die kurze Reichweite der β-Strahlung im Gewebe (siehe Abschnitt 1.1.2) bleibt somit die Strahlenwirkung auf das autonome Gewebe beschränkt. Bei einer ausreichenden Masse an paranodulärem Schilddrüsengewebe kann somit nach der Radioiodtherapie eine Ausschaltung der Autonomie ohne anschließende L-Thyroxin-Substitutionspflichtigkeit erreicht werden. Bei disseminierten Autonomien oder der Autoimmunthyreopathie vom Typ M. Basedow hingegen wird ^{131}I vom gesamten Schilddrüsenvolumen aufgenommen, sodass das Risiko einer posttherapeutischen Substitutionspflichtigkeit in diesen Fällen deutlich höher ist.

In der Schilddrüse wird aufgenommenes Iodid im Rahmen der Schilddrüsenhormonsynthese kovalent an Thyreoglobulin gebunden. Das Iodid kann danach nicht mehr durch passive Diffusion das Gewebe verlassen, wodurch eine lange Retentionsdauer in der Schilddrüse erreicht wird. An Thyreoglobulin gebundenes Iod kann die Schilddrüse prinzipiell nur noch in gebundener Form durch Freisetzung von L-Thyroxin verlassen. Somit ist die biologische Halbwertszeit T_{biol} des Iods in der Schilddrüse hauptsächlich vom Schilddrüsenhormonumsatz und damit von der thyreoidalen Stoffwechsellage abhängig. Zur Ermittlung der bei einer Radioiodtherapie im Schilddrüsengewebe deponierten Energiedosis ist die effektive Halbwertszeit T_{eff} von Bedeutung, die nach Formel (1.1) berechnet werden kann. In der Praxis beträgt diese normalerweise 3,5 – 7 Tage.

$$\frac{1}{T_{\text{eff}}} = \frac{1}{T_{\text{phys}}} + \frac{1}{T_{\text{biol}}} \tag{1.1}$$

Bei der Radioiodtherapie benigner Schilddrüsenerkrankungen beträgt die Zieldosis im Schilddrüsengewebe 120 – 400 Gy. Vor Applikation der therapeutischen Aktivität wird im Rahmen eines Radioiodtests nach Gabe einer diagnostischen Menge an ^{131}I (3 MBq) mittels Sondenmessungen der in die Schilddrüse aufgenommene Anteil des Radionuklids (thyreoidaler Uptake) und die effektive Halbwertszeit gemessen. Die zur Therapie erforderliche Aktiviät an ^{131}I kann dann nach Marinelli et al. [34] berechnet werden durch:

$$D = \frac{A \times U \times T_{\text{eff}}}{V \times 24,67} \times \frac{\text{mL} \times \text{Gy}}{\text{MBq} \times \text{d}} \tag{1.2}$$

D ist die Energiedosis in Gy, A die dem Patienten zu verabreichende Aktivität an $^{131}\text{I}^-$ in MBq, U der thyreoidale Uptake in %, T_{eff} die effektive Halbwertszeit des Iods in der Schilddrüse in Tagen und V das Volumen des iodspeichernden Gewebes (in der Praxis sonographisch ermittelt) in mL.

Umgekehrt kann durch Sondenmessungen nach Gabe der therapeutischen Aktivität der thyreoidale Uptake und die effektive Halbwertszeit gemessen und somit die erzielte Energiedosis berechnet werden, wodurch die Effektivität der Radioiodtherapie abgeschätzt werden kann.

Aus der Formel (1.2) gehen die zwei spezifischen Eigenschaften des Schilddrüsengewebes hervor, die für die Effektivität der Radioiodtherapie von entscheidender Bedeutung sind:

1. hohe Iodaufnahme (U) und

2. lange Retention (T_{eff} bzw. T_{biol}) durch Bindung des Iods an Thyreoglobulin.

1.1.4 Radioiodtherapie maligner Schilddrüsenerkrankungen

Da in papillär und follikulär differenzierten Schilddrüsenkarzinomen die Fähigkeit zur Iodidanreicherung in der Regel erhalten ist, hat die Radioiodtherapie als effektive und nebenwirkungsarme Therapiemodalität einen festen Platz in deren Behandlung.

Zum einen wird sie als ablative Radioiodtherapie bei Patienten nach Erstoperation eines Schilddrüsenkarzinoms eingesetzt, um nach der Operation verbliebenes Schilddrüsenrestgewebe sowie mögliche verbliebene Tumorzellen zu eliminieren. Nach erfolgreicher Ablation des Schilddrüsenrestgewebes fällt die Serumkonzentration des Thyreoglobulins (Tg) unter die Nachweisgrenze, da dieses Glykoprotein spezifisch von Thyreozyten synthetisiert wird. In der weiteren Nachsorge kann das Tg dann als sensitiver und spezifischer Tumormarker eingesetzt werden. Vor einer ablativen Radioiodtherapie wird 24 Stunden nach Gabe einer diagnostischen Aktivitätsmenge an ^{131}I (1 – 10 MBq) der im Bereich der Schilddrüsenloge aufgenommene Anteil des Iodids bestimmt. An diesem Wert orientiert sich die therapeutische Aktivitätsmenge, die nach den europäischen Leitlinien 1 – 5 GBq beträgt. In Abbildung

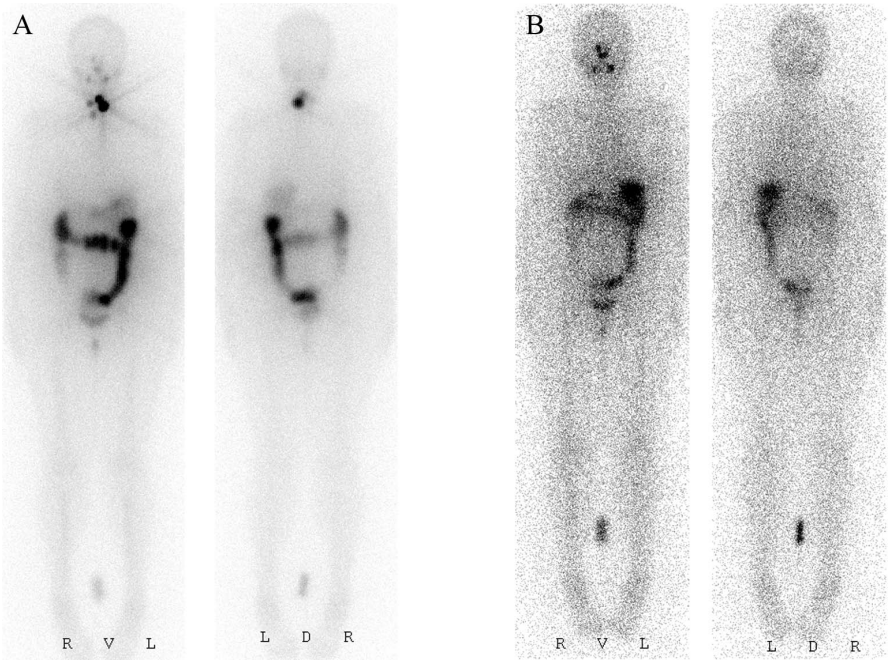

Abbildung 1.4: Beispiel einer erfolgreichen ablativen Radioiodtherapie mit 5,6 GBq ^{131}I bei einem Patienten mit papillärem Schilddrüsenkarzinom. Links (A) ist eine posttherapeutische ^{131}I-Ganzkörperszintigraphie (ventral und dorsal) mit deutlich iodspeicherndem postoperativ verbliebenem Schilddrüsenrestgewebe abgebildet. Bei einer Kontrollszintigraphie (Rechts, B) 6 Monate später zeigte sich eine physiologische Tracerverteilung.

1.4 ist auf der linken Seite (A) eine posttherapeutische Ganzkörperszintigraphie einer ablativen Radioiodtherapie eines Patienten mit Zustand nach totaler Thyreoidektomie bei papillärem Schilddrüsenkarzinom dargestellt. Deutlich ist die Iodspeicherung im Bereich des Schilddrüsenrestgewebes zu sehen. Eine Kontrollszintigraphie 6 Monate später zeigt keinen Hinweis mehr auf Schilddrüsenrestgewebe oder Metastasen (B).

Zum anderen stellt die Radioiodtherapie ebenfalls eine effektive Behandlungsmöglichkeit bei metastasierten papillären oder follikulären Schilddrüsenkarzinomen dar. Hierbei werden therapeutische Aktivitäten zwischen 4 – 11 GBq ^{131}I verwendet. In Einzelfällen kann im Bereich der Filiae eine Energiedosis von bis zu 1.000 Gy erreicht werden [5], eine genaue Dosimetrie ist in diesen Fällen jedoch in der Praxis meist nicht möglich. In Abbildung 1.5 ist eine Radioiodtherapie einer zerebralen und hilären Metastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms dargestellt. Links (A) ist die deutliche Iodspeicherung der Metastasen in der posttherapeutischen Szintigraphie zu erkennen, bei einer Kontrolle 4 Monate später (B) zeigte sich in diesen Bereichen keine Iodanreicherung mehr.

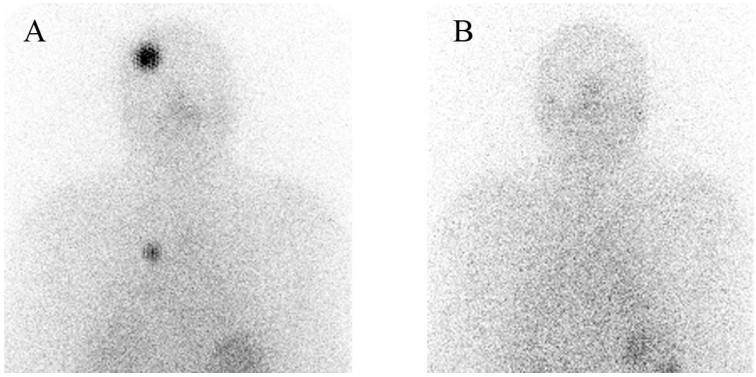

Abbildung 1.5: Beispiel einer erfolgreichen Radioiodtherapie mit 7,3 GBq ^{131}I einer zerebralen und hilären Metastase eines follikulären Schilddrüsenkarzinoms. Links (A) ist die posttherapeutische ^{131}I-Szintigraphie mit fokaler Tracerspeicherung im Bereich der Filiae dargestellt. Eine Kontrolle 4 Monate nach der Radioiodtherapie zeigte eine physiologische Tracerverteilung (B).

1.2 Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS)

Das Phänomen der Iodanreicherung in der Schilddrüse ist bereits seit ca. 1915 bekannt [33]. Die Grundlagen dieses Mechanismus wurden auf molekularer Ebene jedoch erst 1996 durch die Klonierung der cDNA des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) der Ratte [7], kurz darauf auch der des humanen NIS [49] entschlüsselt.

1.2.1 Struktur

Der Natrium-Iodid-Symporter der Ratte (rNIS, siehe Anhang A.1 und B.1) und der Maus (mNIS, siehe Anhang A.2 und B.2) besteht aus 618 Aminosäuren, das relative Molekulargewicht beträgt ca. 65.000. Zwischen mNIS und rNIS besteht eine Homologie von ca. 95 % (siehe Anhang B.4). Der humane NIS (hNIS, siehe Anhang A.3 und B.3) besteht aus 643 Aminosäuren ist zum rNIS zu ca. 81 % homolog (siehe Anhang B.5).

Die Erstbeschreiber postulierten ursprünglich zwölf Transmembrandomänen [7], das aktuelle Modell der Sekundärstruktur des NIS (siehe Abbildung 1.6) geht jedoch von 13 Transmembrandomänen aus, wobei der N-Terminus extrazellulär und der C-Terminus intrazellulär liegt. Physiologisch wird NIS in verschiedenen Glykosylierungsformen exprimiert [55], Glykosylierungsstellen wurden für die Aminosäuren Asn-225, Asn-485 und Asn-497 (rNIS und mNIS) beschrieben [31]. Phosphorylierungsstellen wurden für die Aminosäuren Ser-43, Thr-49, Ser-227, Thr-577 und Ser-581 (rNIS und mNIS) identifiziert [57].

1.2.2 Funktion

Durch elektrophysiologische Studien von Eskandari et al. [11] wurden wichtige Informationen über den Mechanismus des Iodidtransports gewonnen. NIS fungiert als ein Kotransporter, der Iodid zusammen mit Natrium-Ionen im stöchiometrischen Verhältnis 1:2 trans-

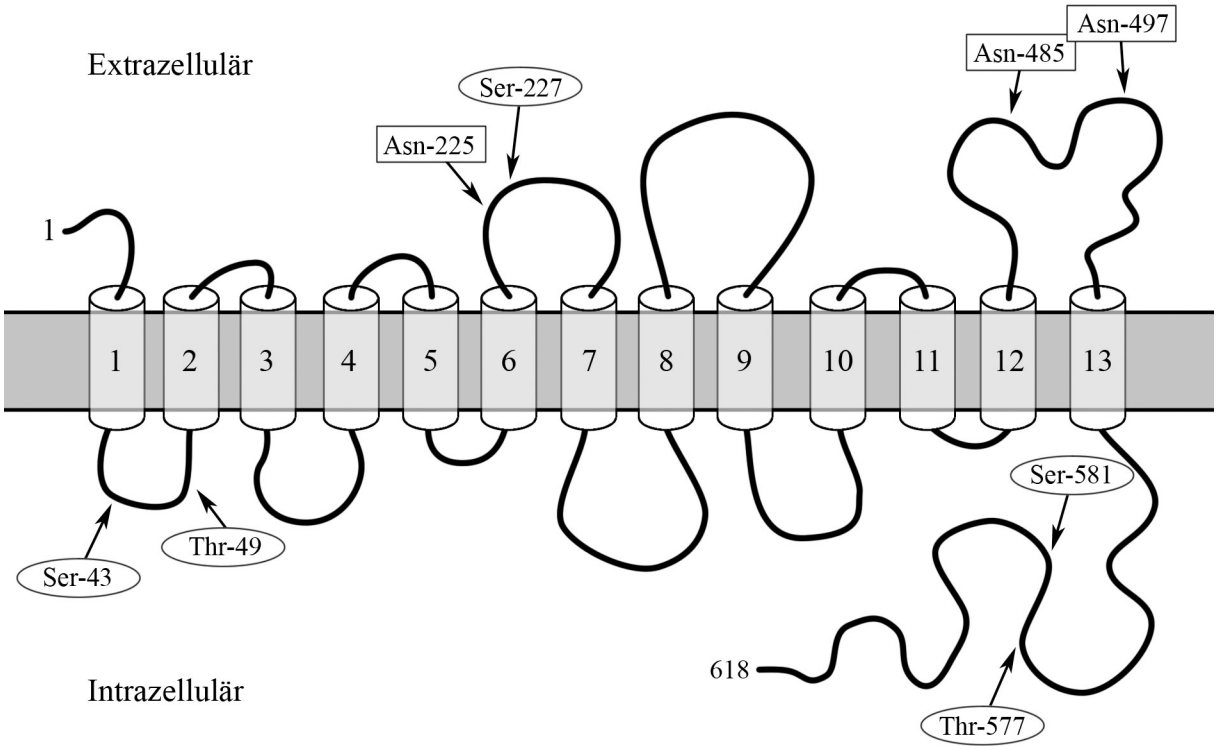

Abbildung 1.6: Sekundärstruktur des Natrium-Iodid-Symporters der Ratte und der Maus, nach [31]. Die Zylinder repräsentieren die 13 Transmembrandomänen. Glykosylierungsstellen sind mit Rechtecken markiert, Phosphorylierungsstellen sind elliptisch eingerahmt.

portiert. Die treibende Kraft ist hierbei der Na^+-Gradient, der physiologischerweise durch die Na^+/K^+-ATPase aufrecht erhalten wird. Zwei Na^+-Ionen gelangen entlang ihres Konzentrationsgradienten in das Zytosol, gleichzeitig wird aktiv ein I^--Ion entgegen seines Konzentrationsgefälles in die Zelle aufgenommen.

NIS transportiert nicht ausschließlich I^--Ionen, analog werden unter anderem auch TcO_4^- (Pertechnetat), ClO_3^-, SCN^-, $SeCN^-$, NO_3^-, Br^-, BF_4^-, IO_4^- und BrO_3^--Ionen transportiert.

ClO_4^- (Perchlorat) bindet zwar an NIS, wird jedoch nicht in den Intrazellularraum transportiert. Diese Eigenschaft wird pharmakologisch zur kompetitiven Inhibition der Iodaufnahme in die Schilddrüse genutzt. In der Praxis wird Natriumperchlorat als Thyreostatikum eingesetzt, z.B. um bei Patienten mit vorbekannter oder vermuteter Schilddrüsenautonomie vor Gabe großer Iodmengen (insbesondere iodhaltiges Röntgenkontrastmittel) die Schilddrüse zu blockieren und somit einer iodinduzierten Hyperthyreose vorzubeugen.

1.2.3 Expression

NIS wird nicht ausschließlich von Thyreozyten exprimiert, eine relevante und funktionell aktive Expression ist auch in der laktierenden Brustdrüse bekannt [55], die wahrscheinlich der Iodversorgung des Nachwuchses dient. Außerdem wird NIS ebenfalls in der Magenschleimhaut exprimiert, die physiologische Funktion des Iodtransports ist hier jedoch unklar. Da der Iodtransport im Magen lumenwärts gerichtet ist, dient die NIS-Expression der Magenmucosa nicht der Iodresorption. Ebenso wird Iodid in den Speicheldrüsen und im Plexus choroideus durch NIS sekretiert, auch hier ist die physiologische Funktion bisher unbekannt, teils wird über eine antioxidative Wirkung spekuliert [60]. Darüber hinaus kann über das Potenzial der Iodaufnahme in weiteren Gewebetypen diskutiert werden: Teils wurde NIS auf mRNA- und auch auf Proteinebene in weiteren Gewebetypen nachgewiesen, unter anderem in kolorektalen und Lungengewebsproben [27, 50, 51, 52, 55, 59, 62]. In diesen Studien wurde jedoch nicht die funktionelle Iodaufnahme der Gewebe evaluiert. Da in diesen Geweben NIS häufig nicht auf der Zelloberfläche, sondern lediglich intrazellulär nachgewiesen werden konnte, kann nicht zwangsläufig von einer funktionellen Iodaufnahme in diese Gewebe ausgegangen werden.

Bei der malignen Entartung gehen spezifische Gewebseigenschaften teils verloren, bleiben teils jedoch auch erhalten oder werden verstärkt. Beim papillär oder follikulär differenzierten Schilddrüsenkarzinom ist meist die NIS-Expression und somit die Fähigkeit der Iodaufnahme erhalten, was die molekulare Grundlage der Radioiodtherapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms darstellt (siehe Abschnitt 1.1.4).

Analog zur physiologischen NIS-Expression einiger extrathyreoidaler Normalgewebe kann eine aktive Iodaufnahme auch in manchen extrathyreoidalen Tumoren beobachtet werden. Eine Iodaufnahme in extrathyreoidalen Tumoren ist in erster Linie für das Mammakarzinom beschrieben [37, 55, 61]. Auch in vitro kann in Modellen des Mammakarzinoms, speziell in den humanen Brustkrebszelllinien MCF-7, TD46D und BT474, durch Stimulation mit z.B. Retinolsäure eine aktive Iodaufnahme induziert werden [24, 53]. Im nativen Zustand jedoch zeigen diese Zelllinien keine NIS-Aktivität.

Mit Ausnahme des Mammakarzinoms ist jedoch in weiteren extrathyreoidalen Tumorentitäten eine NIS-vermittelte Iodaufnahme weitgehend unbekannt. Dennoch kann über das Potential einer endogenen NIS-Expression mit konsekutiver Iodaufnahme in weiteren extrathyreoidalen Tumorentitäten spekuliert werden, da einige Fallberichte über Iodid- bzw. Pertechnetataufnahme, unter anderem auch in kolorektalen und Lungentumoren, veröffentlicht wurden [6, 15, 36, 42, 65]. Letztendlich jedoch wurde in diesen Berichten nicht auf molekularbiologischer Ebene nachgewiesen, dass die beobachtete Iodidaufnahme tatsächlich durch NIS vermittelt wurde.

Auf molekularer Ebene wurde diese lediglich in einer Arbeit von Liu et al. [32] dokumentiert: In einem präklinischen Modell des hepatozellulären Karzinoms in Ratten wurde eine endogene, funktionell aktive NIS-Expression nachgewiesen und durch eine Radioiodtherapie mit ^{131}I konnte in diesem Modell ein signifikanter therapeutischer Effekt erzielt werden. In der gleichen Studie wurde in humanen cholangiozellulären Karzinomen ebenfalls erhöhte NIS-mRNA-Expression und an der Zelloberfläche lokalisiertes NIS-Protein detektiert, dies wurde jedoch nicht auf funktioneller Ebene bestätigt.

1.3 Ziel der Arbeit

Die Radioiodtherapie ist eine effektive Therapiemodalität der differenzierten Schilddrüsenkarzinome. Die molekulare Grundlage der Radioiodtherapie stellt die Expression des Natrium-Iodid-Symporters in den Thyreozyten dar. Eine Expression des NIS in extrathyreoidalen Geweben könnte somit eine Radioiodtherapie extrathyreoidaler Tumore ermöglichen.

Über endogene NIS-Expression in extrathyreoidalen Tumoren ist mit Ausnahme des Mammakarzinoms bisher jedoch wenig bekannt. Insbesondere wurden bisher keine Studien über die Expression des NIS in Tumoren des Kolons und des Rektums veröffentlicht, obwohl diese Tumorentitäten eine der Hauptursachen für krebsassoziierte Morbidität und Mortalität in den hochentwickelten Ländern darstellen. Darüber sind diese Tumorentitäten aufgrund der gut erforschten Adenom-Karzinom-Sequenz und der Identifikation einer limitierten Anzahl assoziierter onkogener Mutationen ein Musterbeispiel für die Genese solider Tumore [12]. Erkenntnisse aus diesem Tumormodell könnten auch auf weitere Tumorentitäten übertragen werden. Ebenso ist noch nicht abschließend geklärt, durch welche Mechanismen die subzelluläre Distribution des NIS in extrathyreoidalen Tumoren reguliert wird. Dies ist ein wichtiger Regulationsmechanismus, da nur an der Plasmamembran lokalisierter NIS eine funktionelle Iodaufnahme vermitteln kann.

Daher war Ziel dieser Arbeit, extrathyreoidale Tumorentitäten auf endogene NIS-Expression zu untersuchen und die zellulären Signalwege zu charakterisieren, die die Expression und Aktivität des NIS in diesen Tumormodellen regulieren.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Puffer

PBS:	Dulbecco PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
PBST:	PBS 0,05 % Tween-20
Blockpuffer:	PBST 5 % fettfreies Trockenmilchpulver (Biomol, Hamburg, Deutschland)
TAE:	40 mmol/L Tris-Acetat 1 mmol/L EDTA pH 8,3
HBSS [64]:	137 mmol/L NaCl 5,4 mmol/L KCl 1,3 mmol/L $CaCl_2$ 0,4 mmol/L $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,5 mmol/L $MgCl_2$ 0,4 mmol/L $Na_2HPO_4 \cdot 7\ H_2O$ 0,44 mmol/L KH_2PO_4 5,55 mmol/L Glukose 10 mmol/L HEPES pH 7,3
Elektrophoresepuffer:	25 mmol/L Tris Base 192 mmol/L Glyzin 0,1 % SDS
Towbin-Puffer:	25 mmol/L Tris Base 192 mmol/L Glyzin 15 % Methanol

2.2 Medien

DMEM:	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gefriermedium:	Recovery Cell Culture Freezing Medium, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB:	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LB/Amp:	LB + 100 μg/mL Ampicillin
RPMI 1640:	Biochrom, Berlin, Deutschland
Waymouth:	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA:	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA (Biochrom, Berlin, Deutschland)
FKS:	Fötales Bovines Serum (Biochrom, Berlin, Deutschland)
P/S:	Penicillin 10.000 E/mL, Streptomycin 10.000 μg/mL (Biochrom, Berlin, Deutschland)

2.3 Antikörper

Name	Spezies	Klasse	Antigen	Konjugat	Hersteller
NIS S-16	Goat	IgG	mNIS	—	Santa Cruz Biotechnology, CA, USA
A 5420	Rabbit	IgG	Goat-Ig	Peroxidase	Sigma-Aldrich, Deutschland
F 7367	Rabbit	IgG	Goat-Ig	FITC	Sigma-Aldrich, Deutschland

2.4 Chemikalien

Abbott: Baar, Schweiz	Isofluran (Forene)
Bayer: Leverkusen, Deutschland	Natriumperchlorat (Irenat) Xylazin (Rompun)
Biomol: Hamburg, Deutschland	GF109203X
Bio-Rad: München, Deutschland	Acrylamid (40 % Acrylamid / Bis, 37,5 : 1) SDS (Sodium-Dodecylsulfat)
Calbiochem: La Jolla, CA, USA	PP2 Tyrphostin AG1478
Merck: Darmstadt, Deutschland	Diethylether Ethanol Methanol
New England Biolabs: Frankfurt, Deutschland	PNGase F (N-glycopeptide-(N-acetyl-β-D-glucosaminyl)-L-asparagin amidohydrolase)

Pharmacia: Erlangen, Deutschland	Ketamin (Ketavet)
Sigma-Aldrich: Taufkirchen, Deutschland	DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) Dibutyryl-cAMP DMSO (Dimethylsulfoxid) DTT (Dithiothreitol) Eisenammoniumzitrat Genistein IPTG (Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid) Natriumorthovanadat Phalloidin-TRITC S-Gal (3,4-cyclohexeneoesculetin-β-D-galactopyranosid) Tyrphostin AG825 Wortmannin

2.5 Oligonukleotide und Plasmide

Name	Sequenz (5' → 3')	Schmelz-temperatur	Amplifikat-länge
mNIS-fw	TGG ATT ACT GTG GTG GGA CCT	59,8 °C	165 bp
-rv	AGA TAC AGG GGG TGG GTC T	58,8 °C	
hNIS-fw	ACT TGG TCA AGG GTC CTG AA	57,3 °C	101 bp
-rv	CTC CTT CTG CCC CAA GAA A	56,7 °C	
GAPDH-fw	TGC (A/C)TC CTG CAC CAC CAA CT	58,8 °C	349 bp
-rv	(C/T)GC CTG CTT CAC CAC CTT C	58,0 °C	
mb-Actin-fw	AGC CAA GTC CAG ACG CAG G	61,0 °C	66 bp
-rv	ACC CAC ACT GTG CCC ATC TAC	61,8 °C	
hHPRT-fw	GCT TTC CTT GGT CAG GCA GTA TAA T	61,3 °C	142 bp
-rv	AAG GGC ATA TCC TAC AAC AAA CTT G	59,7 °C	
M13 uni -21	TGT AAA ACG ACG GCC AGT	53,7 °C	—
$dT_{23}VN$	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N	45,0 °C	—

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide zur PCR und Sequenzierung.

Das Oligonukleotid $dT_{23}VN$ ist im Protoscript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) enthalten. Alle anderen Oligonukleotide wurden von MWG Biotech (Martinsried, Deutschland) synthetisiert.

Die Primer `mNIS-fw` und `-rv` wurden auf Grundlage der Daten der GeneBank Accession Number NM_053248.1 erstellt, die jedoch im Dezember 2007 durch die Version NM_053248.2 ersetzt wurde. Aufgrund der neuen Datenlage sollte für zukünftige Versuche am 5'-Ende des Primers `mNIS-fw` das Thymin durch ein Cytosin ersetzt werden.

Der Sequenzierungsvektor pCR2.1 wurde von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen, die Vektorkarte ist in Anhang A.4 abgebildet.

2.6 Radionuklide

$Na^{125}I$ wurde von Hartmann Analytic (Braunschweig, Deutschland) bezogen. $Na^{99m}TcO_4$ wurde mit 0,9 % NaCl-Lösung aus einem $^{99}Mo/^{99m}Tc$ Generator (Ultra-Technekow FM, Tyco Healthcare, Neustadt, Deutschland) eluiert.

2.7 Zellkultur

Zur Zellkultur wurden beschichtete Kulturflaschen mit Filterdeckel mit einer Bodenfläche von 175 cm^2 (Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland) benutzt. Soweit nicht anders vermerkt wurden die Zellen in einem Zellinkubator bei 37 °C, 5 % CO_2, 100 % relative Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Arbeiten mit Zellen fanden an einer Sterilwerkbank mit konstantem laminaren Luftstrom statt.

Die murine Mammakarzinomzelllinie EMT6 wurde in Waymouth-Medium kultiviert. Für die murine Rektumkarzinomzelllinie CMT93 wurde DMEM verwendet, die murine Lungenkarzinomzellinie CMT64 wurde in RPMI 1640 kultiviert. Alle Medien wurden mit 100 U/mL Penicillin, 100 μg/mL Streptomycin (P/S) und 10 % FKS supplementiert.

Alle Zelllinien wurden zwei bis drei mal pro Woche bei Erreichen einer konfluenten Zellschicht subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die adhärenten Zellen mit 37 °C PBS-Pufferlösung gewaschen und mit 7 mL Trypsin-EDTA bei 37 °C für 2 – 10 Minuten inkubiert, bis die Zellen vollständig abgelöst waren. Die Zellsuspension wurde zur Inaktivierung des Trypsins mit dem gleichen Volumen des entsprechenden FKS-haltigen Mediums vermischt, in 15 mL Zentrifugationsgefäße überführt und 3 Minuten bei 300 g pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 10 mL Medium resuspendiert und 1 mL der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche mit 25 mL Medium ausgesät.

Um Zellen zur längerfristigen Lagerung einzufrieren wurden diese mit Trypsin-EDTA abgelöst und bei 300 g pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 3,2 – 6,4 mL Gefriermedium pro Kulturflasche resuspendiert, zu 1,6 mL Portionen in Polypropylenröhrchen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) aliquotiert und stufenweise gekühlt: zunächst 2 – 6 h bei −20 °C, danach 16 h bei −80 °C. Die langfristige Lagerung erfolgte bei −196 °C in flüssigem Stickstoff. Um tiefgefrorene Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde ein 1,6 mL Zellaliquot im Wasserbad bei 37 °C erwärmt, bei beginnender Verflüssigung mit 25 mL Medium verdünnt, in eine Zellkulturflasche überführt und über Nacht kultiviert. Vor dem Einsatz in Versuchen wurden aufgetaute Zellen mindestens zwei mal subkultiviert.

2.8 Bakterien

Chemokompetente *E.coli* TOP10 wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Der Genotyp dieser Bakterien ist F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) Φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*)7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G.

2.9 Tiermodelle

Die Tierversuche wurden mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern mit der AZ-Nummer 55.2-1-54-2531-34-2002 durchgeführt.

Mäuse wurden in gemäß dem Sozialverhalten der Tiere ausgestalteten Käfigen mit Filterdeckeln zu je 5 Tieren in einem Tierstall mit automatischem Lichtprogramm (je 12 Stunden Licht / Dunkelzyklus) bei 26 °C und 50 – 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Sofern nicht anders vermerkt wurde die ad-libitum Versorgung mit Mäusestandardfutter Altromin 1314 (Altromin GmbH, Lage Deutschland) sichergestellt. Zweimal wöchentlich wurden die Käfige gereinigt und desinfiziert. Die Einstallung der Tiere erfolgte mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn.

2.9.1 Allotransplantate

Die für Allotransplantate verwendeten weiblichen NMRI nu/nu Nacktmäuse wurden im Alter von 6 Wochen aus spezifiziert pathogenfreier Zucht (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) bezogen.

Pro Allotransplantat wurde eine 175 cm^2 Zellkulturflasche mit konfluent zellbewachsener Bodenfläche kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und das Trypsin durch Zugabe FKS-haltigen Mediums inaktiviert. Die Suspensionen wurden in 50 mL Zentrifugengefäßen gepoolt und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden zwei mal mit 50 mL PBS gewaschen, jeweils 3 Minuten bei 300 g pelletiert und das resultierende Pellet mit einer Konzentration von 10^7 Zellen / 200 μL in PBS resuspendiert.

Pro Allotransplantat wurden 200 μL der Zellsuspension (entsprechend 10^7 Zellen) in eine Insulinspritze aufgezogen und unter sterilen Bedingungen subkutan in den Oberschenkel einer NMRI nu/nu Nacktmaus nach intraperitonealer Anästhesie (siehe Abschnitt 2.10) injiziert. Diese Lokalisation wurde gewählt, da dieser Bereich bei einer Szintigraphie in Bauchlage nicht durch Areale mit physiologischer Iodid- bzw. Pertechnetat-Anreicherung (z.B. Magen, Milchleiste) überlagert wird. Je nach Proliferationsgeschwindigkeit der verwendeten Zelllinie wurden die Tiere für weitere 10 – 30 Tage gehalten, bis die Tumorknoten einen Durchmesser von 5 – 8 mm erreichten.

2.9.2 Transgene murine Modelle des kolorektalen Karzinoms

Die in dieser Arbeit verwendete cDNA-Bank der transgenen murinen Tumormodelle war ein Geschenk der Arbeitsgruppe von Dr. Klaus-Peter Janssen, Chirurgische Forschergruppe, Chirurgische Klinik und Poliklink, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München. Die Genotypisierung dieser Modelle wurde nach [19] durchgeführt.

Die Expression des NIS wurde in fünf genetisch definierten Mausmodellen spontaner Tumorgenese des Gastrointestinaltraktes analysiert:

1. Spezifische Expression eines onkogenen KRAS ($KRAS^{V12G}$) im intestinalen Epithel unter dem Villin-Promoter [20].

2. Heterozygote Mutation des Allels Apc^{1638N} des *adenomatous polyposis coli*-Lokus [14].

3. Knock-in Mutation $A33^{DN-Bcat}$ im A33-Genlokus , wodurch spezifisch im Intestinalgewebe eine onkogene, aminoterminal verkürzte Variante des β-Catenin exprimiert wird [39].

4. $KRAS^{V12G}/Apc^{+/1638N}$-Doppelmutation [19].

5. $KRAS^{V12G}/A33^{DN-Bcat}$-Doppelmutation.

Insgesamt wurden Gewebsproben von zwei Wildtyp-Mäusen, zwölf KRAS, fünf APC, drei β-Catenin, drei KRAS/APC und drei KRAS/β-Catenin-Mäusen analysiert.

2.10 Anästhesie und Euthanasie

Zur Anästhesie der Versuchstiere wurden je Anforderungen an die Narkose folgende Methoden eingesetzt:

- Bei geplanter kurzer Narkosedauer von weniger als drei Minuten wurde die Ethernarkose eingesetzt. Ein zylindrischer Glasbehälter wurde mit Diethylether durchtränkten Papiertüchern ausgelegt, darüber wurden trockene Papiertücher geschichtet und der Behälter verschlossen. Das Versuchstier wurde in diesem Behälter narkotisiert, bei Verlöschen der Willkürbewegungen und Stellreflexe wurde es umgehend aus dem Behälter entnommen. Die weitere Narkose wurde unter ständiger Beobachtung der Atmung mittels eines kleinen mit Diethylether getränkten Papiertüchern gefüllten Behälters aufrecht erhalten, der bei Bedarf vor Mund und Nase des Versuchstiers gehalten wurde. Zum Beenden der Narkose wurde der Behälter entfernt und das Versuchstier über weitere 5 Minuten bis zum vollständigen Erwachen beobachtet.

- Bei einer geplanten Narkosedauer von bis zu 20 Minuten wurden die Versuchstiere mittels Ketamin und dem α_2-Agonisten Xylazin narkotisiert. Durch Zugabe von 10 mL Ketamin (100 mg/mL) und 8 mL Xylazin (20 mg/mL) zu 100 mL NaCl

(0,9 %) wurde eine Stammlösung mit 8,5 mg/mL Ketamin und 1,36 mg/mL Xylazin erstellt. Zur Narkose wurden 10 μL der Stammlösung pro Gramm Körpergewicht des Versuchstieres (typischerweise 200 – 250 μL pro Maus) mit einer 26G Kanüle intraperitoneal injiziert und das vollständige Einsetzen der Narkosewirkung nach 3 – 5 Minuten abgewartet. Die Tiere wurden bis zum spontanen Wirkungsverlust der Narkose (20 – 40 Minuten) ständig überwacht.

- Für geplante Anästhesieperioden länger als 20 Minuten wurden die Tiere durch Isofluran-Inhalation narkotisiert. Hierzu wurde ein Inhalationsnarkosegerät von Völker GmbH (Kaltenbach, Deutschland) verwendet. Ein zylindrischer Behälter wurde 2 Minuten mit 4 L/min O_2 und 3 % (v/v) Isofluran vorgeflutet. Die Versuchstiere wurden in den Behälter gesetzt, bei Erlöschen der Willkürbewegungen und Stellreflexe entnommen und während der verbleibenden Narkosedauer mit 2 L/min O_2, 1,5 % (v/v) Isofluran beatmet. Zum Beenden der Anästhesie wurden die Tiere 2 Minuten mit 4 L/min O_2 beatmet und bis zum vollständigen Wirkungsverlust der Narkose überwacht.

Bei länger anhaltender Narkosedauer wurden die Tiere durch eine Infrarotlampe oder eine Wärmematte vor Auskühlung geschützt und die Hornhaut der Augen bei fehlendem Lidschluss durch ein carbomerhaltiges Augengel (Vidisic, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland) vor Austrocknung geschützt.

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Betäubung in einer CO_2-Kammer bei Atemstillstand durch Eröffnung des Brustkorbs und Durchtrennung der Aorta im Bereich des Aortenbogens zum Entbluten der Organe.

2.11 Iodidaufnahme in vitro

Die Iodidaufnahme in Zellen wurde in vitro in Anlehnung an die von Weiss et al. [64] beschriebene Methode bestimmt. Die Zellen wurden in zellkulturbeschichtete 24-Well-Polystyren-Platten ausgesät. Für die meisten Zelllinien wurden 8×10^5 Zellen in 500 μL Medium pro Well ausgesät. Aufgrund des geringeren Zellvolumens der Zelllinien CMT93 und CMT64 wurden für diese $1,6 \times 10^6$ Zellen in 500 μL Medium ausgesät, um am nächsten Tag einen konfluenten Monolayer zu erhalten. Gegebenenfalls wurde das Medium mit einem Faktor zur Modulation der Iodidaufnahme supplementiert (siehe Abschnitt 2.12) und die Zellen 16 Stunden über Nacht im Zellinkubator kultiviert.

Nach Inkubation wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop im Phasenkontrast auf Konfluenz geprüft, das Medium abgesaugt und durch 1 mL HBSS-Puffer (Hank's balanced salt solution [64], 37 °C, sterilfiltriert), ggf. einen Modulationsfaktor enthaltend, ersetzt. Die Zellen wurden über 30 Minuten bei 37 °C, 100 % Luft inkubiert, die Überstände abgesaugt und die Wells mit 500 μL HBSS, 10 μmol/L NaI (nicht-radioaktiv) als Träger und ggf. einen Modulationsfaktor enthaltend befüllt. Zu jedem Well wurden 37 kBq $Na^{125}I$ in 10 μL HBSS (sterilfiltriert) zugefügt und die Zellen 1 Stunde bei 37 °C, 100 % Luft inkubiert. Zusätzlich

wurden 3 Standardproben erstellt, indem 10 μL der $Na^{125}I$-Lösung (entsprechend 37 kBq) in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt wurden.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Wells in einem zeitkritischen Schritt zwei mal mit je 800 μL HBSS (37 °C) gewaschen, um nicht aufgenommenes Iodid aus den Wells zu entfernen. Dazu wurden zunächst die 6 Wells der oberen Reihe nacheinander je 2 Sekunden lang mit einem Vakuumsauger abgesaugt und die Wells durch eine zweite Person in der gleichen Reihenfolge ebenfalls in 2 Sekunden-Intervallen mit je 800 μL HBSS befüllt. Dieser Schritt wurde wiederholt und anschließend die Wells in 2 Sekunden-Intervallen nochmals abgesaugt. In dieser Weise wurde nun nacheinander mit den Reihen 2 – 4 der Platte fortgefahren. Dieser Arbeitsgang wurde zur Zeitoptimierung durch 2 Personen durchgeführt, sodass ein entleerter Well durch die zweite Person mit HBSS befüllt werden konnte, während die erste Person bereits den nächsten Well absaugen konnte. Eine 24-Well-Platte wurde in dieser Weise in 2 – 3 Minuten vollständig bearbeitet. Dieser Arbeitsschritt ist zeitkritisch, da das aufgenommene Iodid rasch aus den Zellen diffundiert. Unterschiedlich lange Inkubationsintervalle im Waschpuffer führen zu einem systematischen Fehler.

Das in die Zellen aufgenommene Iodid wurde mit 500 μL Ethanol (absolut, > 99,8 %) pro Well über 20 Minuten bei Raumtemperatur extrahiert und anschließend in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Zur vollständigen Übertragung der Aktivität wurden die Wells zusätzlich mit je 500 μL H_2O gewaschen und dieses ebenfalls in die Reaktionsgefäße überführt. Die Radioaktivität der Proben wurden anschließend in einem γ-Szintillationszähler (1480 Wizard, PerkinElmer, Turku, Finnland) gemessen. Zur Messung des ^{125}I wurden Ereignisse im Energiefenster von 15 keV bis 85 keV über eine Minute gezählt (cpm, counts per minute).

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge pro well wurden anschließend die Zellen mit Natriumhydroxid-Lösung lysiert. Dazu wurde jedes Well 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 300 μL 0,1 mol/L NaOH inkubiert und das resultierende leicht visköse Lysat in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese Proben wurden vor der Proteinmengenbestimmung im γ-Szintillationszähler auf Radioaktivität überprüft, um die praktisch vollständige Überführung des ^{125}I im vorangegangenen Arbeitsschritt zu bestätigen. Anschließend wurden die Proben wenige Sekunden mit dem Reaktionsgefäßschüttler bei 2500 rpm durchmischt und jeweils 10 μL zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode eingesetzt, wie in Abschnitt 2.13 beschrieben.

Die quantitative Auswertung dieses Versuchs erfolgte durch Bildung des Quotienten der gemessenen Radioaktivität aus der jeweiligen Probe und des Mittelwerts der 3 Standardproben, dieser entspricht somit dem Anteil des zellulär aufgenommenen Iodids. Um verschiedene Zelllinien untereinander vergleichen zu können, wurde dieser Quotient auf die Gesamtproteinmenge des jeweiligen Wells normalisiert und das Ergebnis UT (uptake) als prozentualer Anteil des aufgenommenen Iodids pro μg Protein (% UT/μg) dargestellt:

$$UT = \frac{cpm_{\text{Probe}}}{\overline{cpm}_{\text{Standards}} \times \text{Gesamtprotein}_{\text{Probe}}} \times 100\ \% \tag{2.1}$$

2.12 Iodidaufnahme in vitro unter Modulation zellulärer Signalwege

Zur Erfassung der Veränderung der Iodidaufnahme durch Modulation zellulärer Signalwege wurde eine Methode aufbauend auf Abschnitt 2.11 verwendet. Die Zellen wurden wie beschrieben ausgesät und 3 Stunden später das Kulturmedium mit den in Tabelle 2.2 aufgeführten Faktoren supplementiert. Von jedem Faktor wurde eine sterilfiltrierte 100-fach konzentrierte Ausgangslösung in PBS erstellt, bei geringer Wasserlöslichkeit unter Zusatz von 10 % DMSO. Davon wurden 5 μL in die entsprechenden 500 μL Medium enthaltenden Wells überführt, um die gewünschte Endkonzentration zu erreichen. Der weitere Versuchsablauf wurde unverändert durchgeführt.

Zur quantitativen Auswertung wurde der in Abschnitt 2.11 beschriebene Wert UT auf den Mittelwert dreier Kontrollwells normalisiert. Als Kontrolle diente PBS bei Natriumperchlorat, Dibutyryl-cAMP und Natriumorthovanadat, sowie 0,1 % DMSO in PBS bei Wortmannin, Genistein, GF109203X, PP2, Tyrphostin AG1478 und Tyrphostin AG825. Die Ergebnisse sind als Vielfaches der Iodaufnahme der Kontrollen (fold control, FC) angegeben:

$$FC = \frac{UT_{\text{Probe}}}{\overline{UT}_{\text{Kontrolle}}} \tag{2.2}$$

2.13 Proteinmengenbestimmung

Die Proteinmenge in Lösungen wurde nach der Bicinchoninsäure-Methode (BCA Protein Assay Kit, Pierce, Rockford, USA) bestimmt. Der Nachweis von Proteinen beruht hierbei auf der Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} in einem alkalischen Puffer unter Anwesenheit von Peptidbindungen, sowie direkt durch Interaktion mit den Seitenketten der Aminosäuren Cystein, Tyrosin und Tryptophan. Die entstehenden Cu^{+}-Ionen bilden mit zwei Bicinchonsäure-Molekülen einen Komplex mit einem Extinktionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 562$ nm. Die Extinktion verhält sich dabei proportional zur eingesetzten Proteinmenge.

Die absolute Proteinkonzentration einer Probe kann bei gleichzeitiger Extinktionsbestimmung mehrerer Standardlösungen bekannter Proteinmenge unter Erstellung einer Eichgerade interpoliert werden. Folgende Standardlösungen wurden durch entsprechende Verdünnung einer 2 mg/mL BSA-Lösung (BCA Protein Assay Kit, Pierce) mit 0,1 mol/L NaOH in folgenden Konzentrationen erstellt: 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25, 0 μg/mL.

Die Proteinbestimmung wurde in transparenten 96-Well-Polystyrenplatten mit Flachboden durchgeführt. Von jeder Standardkonzentration wurden je 10 μL in zwei benachbarte Wells überführt. Aus jeder der zu bestimmenden Zelllysatproben wurden nach sorgfältigem Durchmischen auf dem Reagenzgefäßschüttler ebenfalls 10 μL in ein Well übertragen. Anschließend wurde jede Probe mit 200 μL BCA-Arbeitslösung (BCA Protein Assay Kit,

Faktor	Effekt	100-fache Konzentration	Endkonzentration	IC_{50}
PBS†	—	—	—	—
DMSO†	—	10 %	0,1 %	—
Natriumperchlorat	NIS ↓	15 mM	150 μM	0,4 – 0,6 μM [58]
Dibutyryl-cAMP	cAMP ↑	100 mM	1 mM	—
Wortmannin	PI3-Kinase ↓	100 μM + 10 % DMSO	1 μM + 0,1 % DMSO	2 – 4 nM [44]
Genistein	Tyrosinkinasen ↓	1 mM + 10 % DMSO	10 μM + 0,1 % DMSO	EGFR: 2,6 μM [2]
Natriumorthovanadat	Phosphatasen ↓	1 mM	10 μM	0,5 – 1 μM [16]
GF109203X	Proteinkinase C ↓	10 μM + 10 % DMSO	100 nM + 0,1 % DMSO	10 nM [56]
PP2	src-Kinasen ↓	5 μM + 10 % DMSO	50 nM + 0,1 % DMSO	4 – 5 nM [17]
Tyrphostin AG1478	EGFR (HER1) ↓	3 μM + 10 % DMSO	30 nM + 0,1 % DMSO	3 nM [30]
Tyrphostin AG825	HER2 ↓	350 μM + 10 % DMSO	3,5 μM + 0,1 % DMSO	350 nM [30, 40]

Tabelle 2.2: Faktoren zur Modulation zellulärer Signalwege. In der Tabelle sind die biologischen Effekte der Faktoren, die Konzentrationen der Stocklösungen (100-fach), die für die Versuche eingesetzten Konzentrationen und, falls verfügbar, die IC_{50} der Inhibitoren aufgeführt. †Kontrollzellen wurden mit PBS bzw. DMSO behandelt.

Pierce), bestehend aus Natriumtartrat, Natriumhydroxid, Bicinchoninsäure und Kupfersulfat in einem alkalischen Natriumcarbonatpuffer versetzt. Die Platte wurde mit Parafilm abgedeckt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde zur Nullwertbestimmung der folgenden photometrischen Auswertung ein zusätzliches Well mit 210 μL H_2O befüllt. Die Extinktionsmessung fand anschließend in einem ELISA-Reader (EL 800, Bio-Tek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm statt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde durch Erstellung einer Eichgerade der Standards interpoliert und die Gesamtproteinmenge pro Lysat durch Multiplikation mit dem Lysatvolumen (0,3 mL) ermittelt.

2.14 RNA-Präparation

Die zu untersuchenden Zelllinien wurden in zellkulturbeschichtete 6-Well-Polystyrenplatten ausgesät. Pro Well wurden für die meisten Zelllinien 8×10^5 Zellen in 4 mL Medium ausgesät und anschließend im Zellinkubator über Nacht kultiviert. Nur bei den Zelllinien CMT93 und CMT64 wurden aufgrund des kleineren Zellvolumens pro Well $1,6 \times 10^6$ Zellen in 4 mL Medium ausgesät, um nach Inkubation über Nacht ebenfalls eine konfluente Zellschicht zu erhalten.

Bei Versuchen zur Modulation der mRNA-Transkriptionsaktivität wurden die zu evaluierenden Faktoren ca. 3 Stunden nach Aussaat der Zellen bei einsetzender Adhärenz in die Wells pipettiert. Um die Testbedingungen zu den Iodidaufnahme-Versuchen vergleichbar zu halten, wurde nach Inkubation über Nacht das Zellmedium durch 1 mL HBSS ersetzt, mit dem zu evaluierenden Faktor supplementiert und die Zellen 30 Minuten bei 37 °C, 100 % Luft inkubiert. Die Inkubationslösung wurde erneuert, mit 10 μmol/L nicht radioaktivem NaI versetzt und die Zellen 1 Stunde bei 37 °C, 100 % Luft inkubiert.

Die zelluläre Gesamt-RNA wurde anschließend mit dem SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA) isoliert: Das Zellmedium wurde abgesaugt und die Wells mit je 5 mL PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 175 μL RNA-Lysepuffer pro Well einige Sekunden inkubiert, mit einer Pipettenspitze abgeschabt und das Lysat 5 mal durch eine 20G Kanüle gezogen, um die Viskosität der Lösung durch Scherung der genomischen DNA zu verringern. Endogene Ribonukleasen werden hierbei durch das im Lysepuffer enthaltene Guanidinthiocyanat und β-Mercaptoethanol inaktiviert. Die Proben wurden mit 350 μL RNA dilution buffer verdünnt, 3 Minuten bei 70 °C denaturiert und 10 Minuten bei 16.000 g zentrifugiert, wodurch die zellulären Proteine präzipitiert und pelletiert wurden. Die klaren Überstände wurden in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 200 μL Ethanol (95 %) gemischt, in die Zentrifugationssäulen überführt und 60 Sekunden bei 16.000 g zentrifugiert. Bei diesem Schritt bindet die durch das Ethanol präzipitierte RNA an die kieselgelbeschichtete Glasfaseroberfläche der Membran der Zentrifugationssäulen. Die Säulen wurden mit 600 μL RNA-Waschlösung befüllt und erneut zentrifugiert, um die gebundene RNA von kontaminierenden Salzen und Proteinen zu reinigen. Anschließend wurde an die Membran gebundene genomische DNA durch Inkuba-

tion mit 50 μL DNAse I-Lösung 15 Minuten bei Raumtemperatur gespalten und das Enzym anschließend durch Zugabe von DNAse Stop Solution inhibiert. Anschließend wurde die Säule zwei mal mit RNA-Waschlösung zentrifugiert, um die entstandenen DNA-Fragmente und DNAse I zu entfernen. Die aufgereinigte RNA wurde durch Zentrifugation mit 100 μL nukleasefreiem H_2O in ein 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß eluiert.

Die Konzentration und Reinheit der RNA in den Eluaten wurde anschließend photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.16) und die Proben bei $-80\,^{\circ}C$ gelagert.

2.15 cDNA-Synthese

Komplementäre DNA (cDNA) wurde aus isolierter zellulärer Gesamt-RNA (siehe Abschnitt 2.14) durch reverse Transkription (Protoscript First Strand cDNA Synthesis Kit, New England Biolabs, Ipswich, USA) synthetisiert: 1 μg RNA wurde mit 6,25 μmol/L dT_{23}VN-Oligonukleotiden und je 0,31 μmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP in einem Volumen von 16 μL H_2O 5 Minuten auf 70 °C erhitzt, kurz zentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die reverse Transkription in einem Volumen von 20 μL mit 50 mmol/L Tris (pH 8,3), 75 mmol/L KCl, 3 mmol/L $MgCl_2$, 10 mmol/L DTT, 5 μmol/L dT_{23}VN-Oligonukleotiden, je 0,5 μmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 10 Units RNase Inhibitor und 25 Units M-MuLV Reverse Transkriptase durchgeführt. Hierzu wurde der Reaktionsansatz 1 Stunde bei 42 °C inkubiert und danach die Reverse Transkriptase durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C inaktiviert. Zur Degradierung der mRNA-Matritze wurde das Produkt mit 2 Units RNase H 20 Minuten bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C inaktiviert. Der Gesamtansatz wurde auf 50 μL mit H_2O verdünnt und bei $-20\,^{\circ}C$ gelagert.

2.16 Photometrische Nukleinsäurebestimmung

Konzentration und Reinheit der RNA und DNA-Proben wurden photometrisch (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Die Proben wurden in einer 100-fachen Verdünnung (3 μL Probe + 297 μL H_2O) in Quarzglasküvetten gegen 300 μL H_2O bei den Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm gemessen. Die Nukleinsäuren haben ein Extinktionsmaximum bei 260 nm, die DNA-Konzentration kann durch

$$c_{\mathrm{DNA}} = 50\frac{\mathrm{ng}}{\mu\mathrm{L}} \times A_{260} \tag{2.3}$$

berechnet werden, die RNA-Konzentration ergibt sich durch

$$c_{\mathrm{RNA}} = 40\frac{\mathrm{ng}}{\mu\mathrm{L}} \times A_{260} \tag{2.4}$$

und Multiplikation des Ergebnisses entsprechend dem Verdünnungsfaktor der Probe in der Messküvette.

Der Quotient der Extinktionen einer nukleinsäurehaltigen Lösung bei $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm ($\frac{A_{260}}{A_{280}}$) entspricht dem Grad der Proteinkontamination. Proteine haben ein Extinktionsmaximum bei $\lambda = 280$ nm, wohingegen das Extinktionsmaximum von Nukleinsäuren bei $\lambda = 260$ nm liegt. Ein Quotient von ca. 2,1 entspricht reiner DNA bzw. RNA ohne nennenswerte Proteinkontamination, wohingegen ein niedriger Wert von ca. 1,6 auf einen hohen Proteingehalt der Probe hinweist.

2.17 Konventionelle PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde mit dem Thermocycler Omnigene (Hybaid, Thermo Scientific, Waltham, USA) in 0,2 mL PCR-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Ein Reaktionsansatz mit insgesamt 50 μL bestand aus OptiBuffer (Tris-freier PCR-Puffer pH 7,8 – 8,0 bei 70 °C – 72 °C, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), Bio-Enhancer (Stabilisator für DNA-Polymerase, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland), 2 mmol/L $MgCl_2$, je 2,5 mmol/L dATP, dCTP, dGTP, dTTP, je 2 μmol/L der als Primer verwendeten Oligonukleotide (siehe Abschnitt 2.5), 5 Units thermostabile DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (PANscript, PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 1 μL der zu amplifizierenden DNA-Lösung. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis vorbereitet und anschließend im Thermocycler inkubiert.

Das Programm bestand stets aus einem initialen Denaturierungsschritt für 5 Minuten bei 95 °C, anschließend in angegebener Zyklenzahl 1 Minute Denaturierung bei 95 °C, 1 Minute Annealing bei der angegeben Temperatur und 1 Minute Elongation bei 72 °C. Abschließend wurde ein finaler Elongationsschritt für 10 Minuten bei 72 °C durchgeführt und die Proben bei 4 °C gelagert.

2.18 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse von DNA-Fragmenten wurde die DNA-haltige Probe durch Elektrophorese in 2 % Agarosegel aufgetrennt: Pro Gel wurden 50 mL TAE-Puffer mit 1 g Agarose in einem Mikrowellenofen erhitzt, bis eine klare Lösung entstand. Diese wurde nach Zugabe von 8 μL 0,1 % Ethidiumbromid in 7 cm × 10 cm große Gelträger gegossen, mit einem Kamm mit 8 Zähnen versehen und 30 – 60 Minuten bei Raumtemperatur bis zur Aushärtung inkubiert. Der Kamm wurde entfernt und das Gel auf dem Träger in eine Laufkammer übertragen, in der das Gel vollständig mit TAE-Puffer bedeckt war. Eine Geltasche wurde mit 3 μg DNA-Standardmarker (pUC Mix Marker 8, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) beladen, die restlichen Taschen wurden mit je 12 μL Probenansatz (10 μL DNA-Probe + 2 μL 6X Loading Dye, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) befüllt. Anschließend wurde über 40 Minuten eine Spannung von 100 V an die Laufkammer angelegt, bis die vordere Farbstofffront der Proben die Mitte des Gels erreichte. Das Gel wurde anschließend zur Analyse auf einen UV-Transilluminator (TI 4, Biometra, Göttingen, Deutschland) gelegt und das Bandenmuster mit einer Sofortbildkamera (GelCam, Polaroid) dokumentiert.

2.19 Sequenzierung

Um das Amplifikat eines PCR-Produktes zur Sequenzierung vorzubereiten wurde es wie folgt in ein Plasmid kloniert, in *E. coli* transformiert und vervielfältigt:

Bei der PCR wurden durch die verwendete DNA-Polymerase am 3'-Ende des produzierten DNA-Strangs A-Überhänge erzeugt (siehe Abschnitt 2.17). 2 μL des zu sequenzierenden PCR-Produktes wurden in einem Volumen von 20 μL mit 50 ng linearisierter pCR2.1 Vektor-DNA mit T-Überhängen am 3'-Ende (TA Cloning Kit, Invitrogen, siehe Anhang A.4) und 6 Weiss-Units T4 DNA Ligase (aus *E. coli* C600 pcl857 pPLc28 lig8, New England Biolabs, Ipswich, USA) in T4 DNA Ligase Reaction Buffer (5 mmol/L Tris pH 7,5, 1 mmol/L $MgCl_2$, 1 mmol/L DTT, 100 μmol/L ATP, New England Biolabs, Ipswich, USA) 16 Stunden bei 16 °C inkubiert.

Das ligierte zirkuläre Plasmid wurde anschließend in *E. coli* transformiert. Pro Transformation wurden 2 μL des Ligationsansatzes mit 50 μL chemokompetenten *E. coli* TOP10 (TA Cloning Kit, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, siehe Abschnitt 2.8) durch vorsichtiges Rühren mit einer Pipettenspitze in 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäßen vermischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 30 Sekunden auf 42 °C erwärmt und sofort wieder auf Eis gestellt, mit 250 μL LB-Medium (Raumtemperatur) aufgefüllt und 1 Stunde bei 37 °C horizontal schüttelnd (300 rpm) inkubiert. Die Transformationsansätze wurden anschließend auf LB-Agar Platten mit 100 μg/mL Ampicillin, 0,72 mmol/L S-Gal, 1,8 mmol/L Eisenammoniumzitrat und 0,2 mmol/L IPTG ausgestrichen. Um eine gute Vereinzelung der Kolonien zu erreichen wurde jeder Ansatz auf zwei Platten verteilt, 20 μL auf die erste Platte und der restliche Ansatz auf die zweite Platte.

Bei der Ligationsreaktion werden teils die Enden der linearisierten Plasmid-DNA direkt ohne Insertion des PCR-Amplifikats verbunden. Somit können bei der Transformation Klone entstehen, die kein PCR-Amplifikat enthalten und für die weitere Analyse ungeeignet sind. Diese Klone können durch die Methode der α-Komplementierung schnell identifiziert werden: Das ω-Fragment des Gens der β-Galaktosidase, welches den C-terminalen Teil codiert, ist auf der chromosomalen DNA des Bakteriums kodiert. Das α-Fragment, welches den N-terminalen Teil des Enzyms codiert, befindet sich auf der pCR2.1-Vektor DNA. Die Schnittstelle zur Ligation des PCR-Amplifikats befindet sich innerhalb des α-Fragments, sodass bei Insertion des PCR-Amplifikats das Leseraster des α-Fragments unterbrochen und dessen Funktion zerstört wird. Im Gegensatz dazu bleibt bei unerwünschter direkter Ligation der Enden des Plasmids das Gen intakt. Die β-Galaktosidase hydrolysiert das in den LB-Agar-Platten enthaltene farblose S-Gal, wodurch in Anwesenheit von Eisenammoniumzitrat ein tiefschwarzes Präzipitat entsteht. Dadurch zeichnen sich amplifikatlose Kolonien mit intakter β-Galaktosidase durch eine dunkle Färbung aus, wohingegen amplifikathaltige Kolonien weiß erscheinen.

Nach 16 Stunden Inkubation bei 37 °C wurden 6 – 12 weiße Kolonien jeder Transformation mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen, je 5 mL LB/Amp-Medium beimpft und im Bakterienschüttler bei 37 °C, 300 rpm über Nacht in 15 mL Zentrifugationsgefäßen kultiviert.

Anschließend wurde das amplifizierte Plasmid isoliert (E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I Classic, peqlab, Erlangen, Deutschland). 2 mL der Kulturen wurden bei 16.000 g eine Minute pelletiert und der Überstand verworfen. Das Bakterienpellet wurde nach Herstellerangaben resuspendiert, lysiert, die Proteine und genomische DNA gefällt bei 16.000 g 10 Minuten zentrifugiert. Der plasmidhaltige klare Überstand wurde in Hibind-Miniprep-Zentrifugensäulen (peqlab, Erlangen, Deutschland) überführt und eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert, wobei die Plasmid-DNA an die Silikamembran der Zentrifugensäule bindet. Durch zweimaliges Waschen der Säule mit 60 % Ethanol enthaltendem Waschpuffer wurden Protein- und Salzkontaminationen entfernt, das Plasmid anschließend durch Zentrifugation mit 50 μL H_2O eluiert und die DNA-Konzentration bestimmt (siehe Abschnitt 2.16).

Eine Probe jeder Plasmidpräparation wurde mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI (New England Biolabs, Ipswitch, USA) zum Nachweis des eingefügten PCR-Amplifikats gespalten. 8 μL der Plasmidpräparation (entsprechend ca. 0,8 – 1 μg DNA) wurden mit 20 Units *Eco*RI in in einem Volumen von 10 μL mit 10 mmol/L Tris pH 7,5, 5 mmol/L NaCl, 1 mmol/L $MgCl_2$ und 0,0025 % Triton X-100 eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Produkt auf einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.18).

Ein Klon, dessen Plasmid-Spaltprodukt im Agarosegel eine Bande der gewünschten Länge zeigte wurde zur Sequenzierung ausgewählt. Das entsprechende aufgereinigte Plasmid wurde ethanolisch gefällt, indem 3 μg Plasmid-DNA in 83 mmol/L Natriumazetat und 70 % Ethanol über Nacht bei −20 °C in einem 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert wurden. Die gefällte DNA wurde bei 16.000 g 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet zwei mal mit 200 μL 70 % Ethanol gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die restliche verbliebene Flüssigkeit wurde durch Vakuumzentrifugation über 15 Minuten abgedampft.

Das ausgefällte und getrocknete Plasmid wurde extern durch die Firma MWG Biotech AG (Martinsried, Deutschland) mit dem Primer `M13 uni -21` (siehe Abschnitt 2.5) sequenziert.

2.20 Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR mit SYBR-Green wurde auf dem Thermocycler AbiPrism 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems, CA, USA) durchgeführt, die Auswertung erfolgte mit der Sequence Detection Software v1.4 (Applied Biosystems, CA, USA).

SYBR-Green bindet an doppelsträngige DNA, der resultierende fluoreszierende Farbstoff-DNA-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{max} = 494$ nm und weist ein Emissionsmaximum bei $\lambda_{max} = 521$ nm auf [66]. Durch Fluoreszenzbestimmung der Proben während der Elongationsphase der PCR kann somit während jedes PCR-Zyklus ein Rückschluss auf die Amplifikatmenge der Probe gezogen werden.

Für die PCR wurde der qPCR MasterMix Plus for SYBR Green I w/o UNG (Eurogentec, Köln) eingesetzt, darin enthalten ist der Reaktionspuffer, dNTPs einschließlich dUTP, HotGoldStar DNA Polymerase, $MgCl_2$ und SYBR Green I. Die PCR wurde mit dem qPCR

MasterMix, je 670 μmol/L der Oligonukleotide eines Primerpaares und 100 ng cDNA in 30 μL Reaktionsvolumina durchgeführt. Aus jeder cDNA-Probe wurden vier PCR-Ansätze erstellt, zwei mit dem Primerpaar für das Zielgen (mNIS bzw. hNIS) und zwei mit dem Primerpaar für das endogene Referenzgen (β-Actin bei muriner cDNA und HPRT bei humanen Proben). Zusätzlich wurden Leerkontrollen durch Zugabe von H_2O anstelle der cDNA durchgeführt.

Das Programm des Thermocyclers führte 2 Minuten Inkubation bei 50 °C und 10 Minuten Denaturierung der DNA und Aktivierung der hot start DNA Polymerase bei 95 °C aus. Anschließend folgten 40 Zyklen mit je 15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C und 45 Sekunden Annealing und Elongation bei 60 °C. Anschließend wurde durch langsames Aufheizen der Proben auf 95 °C unter Fluoreszenzmessung die Dissoziationskurve der entstandenen PCR-Produkte durch Erfassung der Änderung der Fluoreszenzintensität pro Temperaturänderung ($-d\mathrm{F}/d\mathrm{T}$) erstellt.

Die quantitative Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_T}$-Methode. Hierzu wurde zunächst ein Fluoreszenzschwellenwert (threshold) knapp oberhalb der Grundfluoreszenz aller Proben (baseline) festgelegt. Für jeden PCR-Ansatz wurde die Zykluszahl C_T (threshold cycle) ermittelt, bei der die Fluoreszenz den Schwellenwert überschritt. Durch korrekte Wahl des Schwellenwerts befindet sich jeder PCR-Ansatz bei Erreichen des threshold cycle in der exponentiellen Phase der Reaktion. Für jede cDNA-Probe wurden nun die Mittelwerte $\overline{C_T}$ der jeweils doppelten Ansätze des Zielgens und des Referenzgens gebildet. Anschließend wurde der Abstand an PCR-Zyklen bestimmt, die zwischen Erreichen des Schwellenwerts des Zielgens und des Referenzgens lagen:

$$\Delta C_T = \overline{C_T}_{,\text{Zielgen}} - \overline{C_T}_{,\text{Referenzgen}} \tag{2.5}$$

Zur relativen Quantifizierung wurde eine cDNA-Probe als Kalibrator deklariert, auf die alle anderen Proben bezogen wurden:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T,\text{Probe}} - \Delta C_{T,\text{Kalibrator}} \tag{2.6}$$

Dieser Wert gibt an, um wie viele Zyklen sich die Abstände zwischen Zielgen und Referenzgen zwischen der Probe und Kalibrator unterscheiden. Unter der Voraussetzung, dass sich pro Zyklus die Amplifikatmenge annähernd verdoppelt und die Expression des Referenzgens zwischen den cDNA-Proben unverändert bleibt, kann die relative Genexpression RQ (relative quantification) des Zielgens jeder Probe in Bezug auf die Kalibratorprobe bestimmt werden:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T} \tag{2.7}$$

Für die Kalibratorprobe ergibt sich somit $RQ = 2^0 = 1$. Wenn nun beispielhaft in einer Probe die doppelte Menge an Ziel-cDNA als im Kalibrator vorhanden ist, die Menge der Referenz-cDNA in Probe und Kalibrator jedoch gleich bleibt, erreicht die Probe den Schwellenwert genau 1 PCR-Zyklus früher ($\Delta\Delta C_T = -1$) und somit ergibt sich $RQ = 2^{-(-1)} = 2$.

Da bei der Fluoreszenzmessung mit SYBR-Green im Gegensatz zu real-time PCR-Methoden mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden auch unspezifische PCR-Produkte

ein Fluoreszenzsignal verursachen, ist es notwendig, das Vorhandensein signifikanter Mengen unspezifischer Amplifikate nach Ablauf der PCR auszuschließen. Dazu wurden zum einen je 10 μL Stichproben der Reaktionsansätze nach Abschluss der PCR auf 2 % Agarosegel aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.18) und auf zusätzliche (unspezifische) Banden untersucht, zum anderen wurden unspezifische Signale (peaks) in den Dissoziationskurven der PCR-Ansätze ausgeschlossen.

2.21 Immunzytochemie

Je 10^4 Zellen wurden pro Well in 6-Well Polystyren-Platten auf Glasdeckgläsern im entsprechenden Kulturmedium ausgesät und über 16 Stunden kultiviert.

Die Deckgläser wurden zwei mal mit PBS gewaschen, die Zellen anschließend über 10 Minuten in 3,7 % Paraformaldehyd fixiert, zwei mal mit PBS gewaschen und mit 4 % BSA in PBS über 20 Minuten zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit dem Antikörper `NIS S-16` (1:50 Verdünnung) und 2 % BSA in PBS über 1 Stunde inkubiert und mit PBS gewaschen. Danach folgte ein Inkubationsschritt mit FITC-konjugiertem Antikörper `F 7367` (1:500), Rhodamin-konjugiertem Phalloidin (1:500), DAPI (1:2500) und 2 % BSA in PBS über 1 Stunde. Die Deckgläser wurden zwei mal mit PBS gewaschen, mit Vectashield H-1000 Medium (Vector Laboratories, CA, USA) eingedeckt, auf Objektträger übertragen und mit Nagellack versiegelt.

Die Bilddokumentation wurde mit einem Mikroskop mit integrierter CCD-Kamera und der Software Axiovision (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt.

2.22 Deglykosylierung

Je 10^6 Zellen pro Well wurden in 6-Well Polystyren-Platten ausgesät und 16 Stunden kultiviert. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 50 μL 0,5 % SDS, 40 mmol/L DTT pro Well lysiert und anschließend 10 Minuten bei 95 °C denaturiert. Zur anschließenden enzymatischen Spaltung N-glykosylierter Proteine wurden zu einer 20 μg Protein enthaltenden Probe 1 % Nonidet P-40, G7 reaction buffer und 1000 Einheiten PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, USA) hinzugefügt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.23 SDS-PAGE, Elektrotransfer und Immunoblotting

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen nach ihrem Molekulargewicht. Die in dieser Arbeit genutzte Zusammensetzung der 10 % Polyacrylamidgele ist in Tabelle 2.3 dargestellt. Die Zusammensetzung des Elektrophoresepuffers ist in Abschnitt 2.1 aufgeführt. Zur Elektrophorese wurde zunächst eine Spannung von 100 V angelegt, sobald die Farbstofffront das Trenngel erreichte 200 V.

	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
40 % Acrylamid / Methylenbisacrylamid (37,5:1)	5 mL	1,25 mL
1 mol/L Tris-Puffer pH 8,8	7,46 mL	—
1 mol/L Tris-Puffer pH 6,8	—	1,26 mL
10 % SDS	200 μL	100 μL
H_2O	7,33 mL	6,89 mL
0,1 % Bromphenolblau	—	300 μL
10 % Ammoniumpersulfat	100 μL	50 μL
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	50 μL	25 μL

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele.

Nach erfolgter Auftrennung der Proteine wurden diese mittels Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen (Tank-Blot-Methode mit Towbin-Puffer). Der Transfer fand 1 Stunde mit 400 mA bei 4 °C (Wasserkühlung) statt.

Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Membran wurden durch 2 Stunden Inkubation in Blockpuffer abgesättigt. Die Membran wurde anschließend mit dem Antikörper `NIS S-16` (1:200 Verdünnung) in Blockpuffer 16 Stunden bei 4 °C inkubiert und zwei mal mit PBST gewaschen. Danach folgte eine Inkubation über eine Stunde mit dem Peroxidase-gekoppeltem Antikörper `A 5420` (1:10.000 Verdünnung) in Blockpuffer bei Raumtemperatur. Anschließend wurden mit ECL western blotting detection reagents (GE Healthcare, München, Deutschland) fotografische Filme (Kodak, Stuttgart, Deutschland) exponiert, die Belichtungszeit betrug 1 – 20 Minuten.

2.24 Biodistribution in vivo

Tumortragenden Mäusen wurden unter Ethernarkose 370 kBq $Na^{125}I$ in 125 μL PBS in die Schwanzvene injiziert. Eine zusätzliche Spritze wurde zur Erstellung von Standards in einen 100 mL Messkolben entleert, mit H_2O auf 100 mL aufgefüllt, gemischt und je 1 mL (entsprechend 1 % der injizierten Aktivität) in drei Szintillationsgefäße überführt.

Nach 30 Minuten Zirkulationszeit wurden die Tiere unter CO_2-Asphyxie geopfert. Die zu untersuchenden Organe wurden entnommen, gewogen und die Radioaktivität im γ-Szintillationszähler gemessen. Das Energiefenster wurde für ^{125}I auf 15 – 85 keV eingestellt. Durch gleichzeitige Messung und Bildung des Mittelwerts der erstellten drei Standardproben kann die akkumulierte Radioaktivität in einem Organ als Prozent der injizierten Dosis (% ID) angegeben werden:

$$\%ID = \frac{cpm_{\text{Organ}}}{\overline{cpm}_{\text{Standards}} \times 100} \times 100\% \tag{2.8}$$

Die Bestimmung der Radioaktivitätskonzentration in einem Organ erfolgt durch Normalisierung auf das Organgewicht in Gramm und wird in Prozent der injizierten Dosis pro

Gramm Gewebe (% ID/g) angegeben:

$$\%ID/g = \frac{\%ID_{\text{Organ}}}{m_{\text{Organ}}} \tag{2.9}$$

Aufgrund der geringen Größe der murinen Schilddrüse ist in diesem Fall eine genaue Gewichtsbestimmung aufwändig, daher wurde für diese ein mittleres Gewicht von 2,5 mg angenommen. Die Ergebnisse der Aktivitätskonzentration der Schilddrüse sind daher als Näherungswerte zu sehen.

2.25 Szintigraphie in vivo

Die Verteilung einer radioaktiven Substanz im Organismus kann in vivo mittels einer γ-Kamera szintigraphisch dargestellt werden. Tumortragenden Mäusen wurden unter Ethernarkose (siehe Abschnitt 2.10) 7,4 MBq $Na^{99m}TcO_4$ in 125 μL 0,9 % NaCl in die Schwanzvene injiziert. Gleichzeitig wurden zwei Standardproben erstellt, indem 10 % der injizierten Aktivität in 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit H_2O auf 1 mL Volumen aufgefüllt wurden.

Die Tiere wurden anschließend unter Isofluran-Inhalationsnarkose auf einen Detektorkopf der γ-Kamera (Forte, Philips Medical Systems, Hamburg, Deutschland) in Bauchlage positioniert. Die zwei Standardproben wurden direkt neben den Tieren auf dem Detektorkopf platziert, um eine quantitative Bildauswertung zu ermöglichen. Nach 30 Minuten Zirkulationszeit wurde die Bildakquisition gestartet. Die Szintigraphien wurden über 1200 Sekunden auf einer 30 cm × 30 cm großen 256 × 256 Punktmatrix mit 16 Bit pro Pixel aufgezeichnet. Es wurde ein hochauflösender VXHR-Kollimator (vertex high resolution, Philips Medical Systems, Hamburg, Deutschland) verwendet, Inhomogenitäten der Detektionseinheit wurden durch Durchführung einer Homogenitätskorrektur für ^{99m}Tc (flood correction) ausgeglichen.

Die Auswertung der Bilder wurde auf einer Pegasys-Workstation (Philips Medical Systems, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Szintigraphien wurden durch Integration der detektierten Ereignisse (counts) innerhalb frei definierbarer Bildregionen (region of interest, ROI) quantitativ ausgewertet. ROIs wurden über die Standardproben, Tumorknoten, Ganzkörper und Hintergrundaktivität gelegt. Die Aufnahme des Pertechnetats in einen Tumor kann in Prozent der injizierten Dosis (% ID) annäherungsweise ermittelt durch:

$$\%ID = \frac{counts_{\text{Tumor}}}{\overline{counts}_{\text{Standard}} \times 10} \times 100\% \tag{2.10}$$

2.26 Genistein-Stimulation in vivo

Die Modulation der NIS-Aktivität in vivo durch Genistein in Allotransplantaten wurde nicht-invasiv durch Szintigraphien evaluiert, um die Pertechnetataufnahme individueller Tumoren vor und nach Stimulation erfassen zu können.

Mäuse mit subkutanen Allotransplantaten wurden eine Woche mit sojafreiem Futter gehalten, um eine unkontrollierte orale Genisteinzufuhr zu vermeiden. Anschließend wurden prätherapeutische Szintigraphien angefertigt (siehe Abschnitt 2.25).

Den Tieren wurden 300 μL 1 μmol/L Genistein, 1 % DMSO in PBS 24 Stunden, 6 Stunden und 1 Stunde vor Aufnahme der posttherapeutischen Bilder durch intraperitoneale Injektion verabreicht. Kontrolltiere erhielten wirkstofffreie intraperitoneale Injektionen bestehend aus 300 μL 1 % DMSO in PBS zu den gleichen Zeitpunkten. Die posttherapeutischen Bilder wurden anschließend 48 Stunden nach Aufnahme der prätherapeutischen Szintigraphien in gleicher Weise akquiriert.

Durch ROI-Analyse wurde das Tumor zu Hintergrund-Verhältnis (Q) jedes Tumors ermittelt: Es wurden pro Tumor je eine ROI und zusätzlich pro Maus drei unabhängige Hintergrundregionen erstellt. Die Hintergrundregionen wurden dabei so gewählt, dass sie in der Nähe des Tumors lagen, jedoch visuell keine erhöhte Aktivität benachbarter pertechnetatanreichernder Areale wie z.B. Tumor, Blase oder Magen eingeschlossen wurde. Die Aktivitätskonzentration (counts/pixel) der drei Hintergrundregionen pro Maus wurde gemittelt und von der Aktivitätskonzentration der Tumorregionen abgezogen, um Summationseffekte auszugleichen. Anschließend wurde die korrigierte Aktivitätskonzentration der Tumore auf den Mittelwert der Hintergrundaktivitätskonzentrationen bezogen, um das prätherapeutische Tumor zu Hintergrund-Verhältnis (Q_1) zu ermitteln.

Mit den posttherapeutischen Szintigraphien wurde ebenfalls eine ROI-Analyse wie oben beschrieben durchgeführt, um das posttherapeutische Tumor zu Hintergrund-Verhältnis (Q_2) zu berechnen. Hierzu wurden die ROI-Geometrien der prätherapeutischen Szintigraphien direkt kopiert, um Fehlbestimmungen durch Schwankungen der ROI-Flächen zu minimieren.

Für jeden Tumor wurde anschließend die Veränderung des Tumor zu Hintergrund-Verhältnisses vor und nach Genistein- bzw. Kontrollinjektion ($Q' = Q_2/Q_1$) berechnet. Um mögliche systematische Schwankungen des Q' durch z.B. Tumorwachstum im Intervall zwischen den beiden Messungen auszugleichen, wurden die Q' der Genistein-injizierten Tiere auf die Q' der Kontrolltiere normalisiert ($Q'' = Q'_{\text{Genistein}}/Q'_{\text{Kontrolle}}$).

2.27 Statistik

Zur Analyse statistisch signifikanter Unterschiede wurde der t-Test für zwei unabhängige Stichproben herangezogen. Unterschiede mit einer Wahrscheinlichkeit von mehr als 99,9 % ($P < 0{,}001$) wurden als signifikant gewertet.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Endogene Iodidaufnahme in vitro

Murine und humane Tumorzelllinien (siehe Tabelle 3.1) wurden in vitro nach der in Abschnitt 2.11 beschriebenen Methode auf Aufnahme von $^{125}I^-$ untersucht. Die Versuche wurden mit Zellen im nativen Zustand durchgeführt, d.h. den Medien wurden keine bekannten NIS-induzierenden Faktoren supplementiert. Da zur Kultivierung der Zelllinien unterschiedliche Medien verwendet wurden, wurde zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse die Iodidaufnahme bei allen Zelllinien in HBSS-Pufferlösung gemessen.

Die native Iodidaufnahme ist in Abbildung 3.1 in Prozent des pro Well eingesetzten Iodids dargestellt. Zur Ermittlung der Spezifität der Iodidaufnahme wurden Kontrollen unter Zugabe von 150 μmol/L $NaClO_4$ (Natriumperchlorat) durchgeführt, einem kompetitiven Inhibitor des NIS (siehe Abschnitte 1.2.2 und 2.12). Die Ergebnisse unter Zugabe des Inhibitors entsprechen somit der unspezifischen, nicht durch NIS vermittelten Iodidaufnahme, diese sind als weiße Balken in Abbildung 3.1 dargestellt. Dieser unspezifische Messwert kann sich einerseits durch unspezifische Diffusion des Iodids nach intrazellulär

Spezies	Zelllinie	Ursprungsgewebe	Iodidaufnahme
Mus musculus	EMT6	Mamma	+
	CMT93	Rektum	+
	CMT64	Lunge	+
	LLC	Lunge	−
	TD2	Pankreas	−
Homo sapiens	MDA-MB-435S	Mamma	−
	MCF7	Mamma	−
	HEK-293	Niere	−
	SW-480	Kolorektal	−
	PC3	Prostata	−

Tabelle 3.1: Zelllinien, die in vitro auf funktionelle Iodidaufnahme evaluiert wurden.

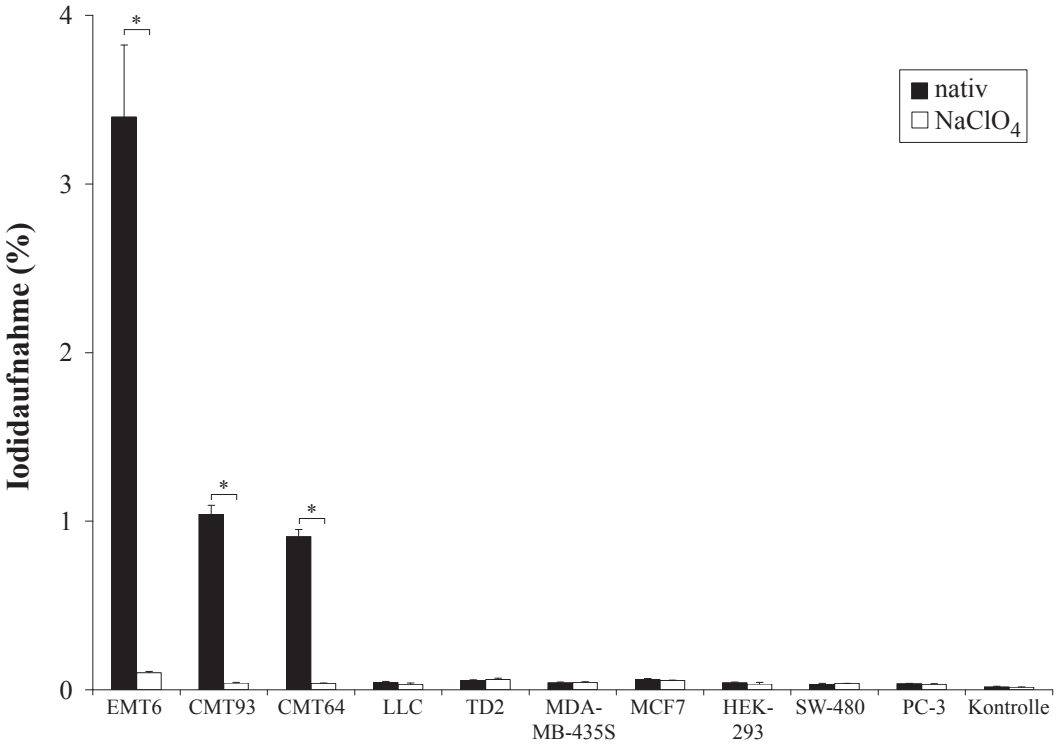

Abbildung 3.1: Iodidaufnahme der extrathyreoidalen Tumorzelllinien in vitro. Die schwarzen Balken stellen den Anteil des unter Nativbedingungen internalisierten Iodids in Prozent dar. Die weißen Balken repräsentieren die Iodaufnahme unter kompetitiver Inhibition des NIS durch 150 μmol/L $NaClO_4$. In die mit „Kontrolle“ bezeichneten Wells wurden keine Zellen ausgesät. Mit * sind signifikante Unterschiede ($P < 0,001$) markiert. Die Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung (n = 3).

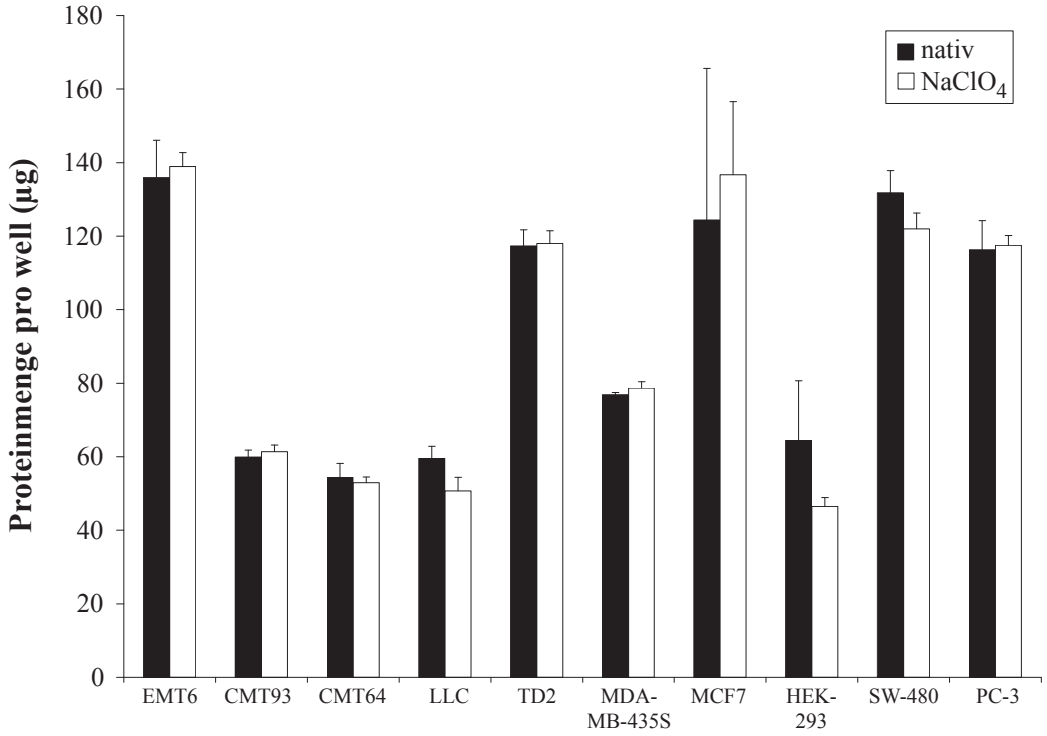

Abbildung 3.2: Proteinmenge pro well in μg nach Extraktion des internalisierten Iodids. Die Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung (n = 3).

ergeben, andererseits kann methodisch bedingt trotz der durchgeführten zwei Waschschritte ein geringer Teil des Iodids an der Zelloberfläche bzw. an der Kunststoffoberfläche der Wells haften bleiben, der letztendlich den Wert der gemessenen Radioaktivität erhöhen kann.

Zwischen den verschiedenen Zelllinien bestehen teils signifikante Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsgeschwindigkeit und der Zellgröße. Da die Zellen ca. 16 Stunden vor der Messung der Iodidaufnahme ausgesät wurden, befanden sich methodisch bedingt zum Zeitpunkt des Assays unterschiedliche Zellzahlen und Proteinmengen in den Wells. Dies kann beim Vergleich verschiedener Zelllinien zu Unterschieden in der quantitativen Iodidaufnahme führen. Um eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Zelllinien zu erreichen, wurde der Proteingehalt der Wells nach Extraktion des internalisierten Iodids bestimmt (siehe Abschnitte 2.11 und 2.13, Abbildung 3.2). Anschließend wurde die prozentuale Iodidaufnahme auf den Proteingehalt normalisiert, die Ergebnisse sind in Abbildung 3.3 als Prozent des aufgenommen Iodids pro μg Protein dargestellt.

Zur Verdeutlichung der spezifischen Iodidaufnahme durch Inhibition des NIS mit Natriumperchlorat wurde der Quotient aus der gesamten und der unspezifischen ($NaClO_4$) Iodidaufnahme berechnet (siehe Abbildung 3.4). Ein Faktor = 1 entspricht somit keiner spezifischen NIS-vermittelten Iodidaufnahme, in der Abbildung durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet.

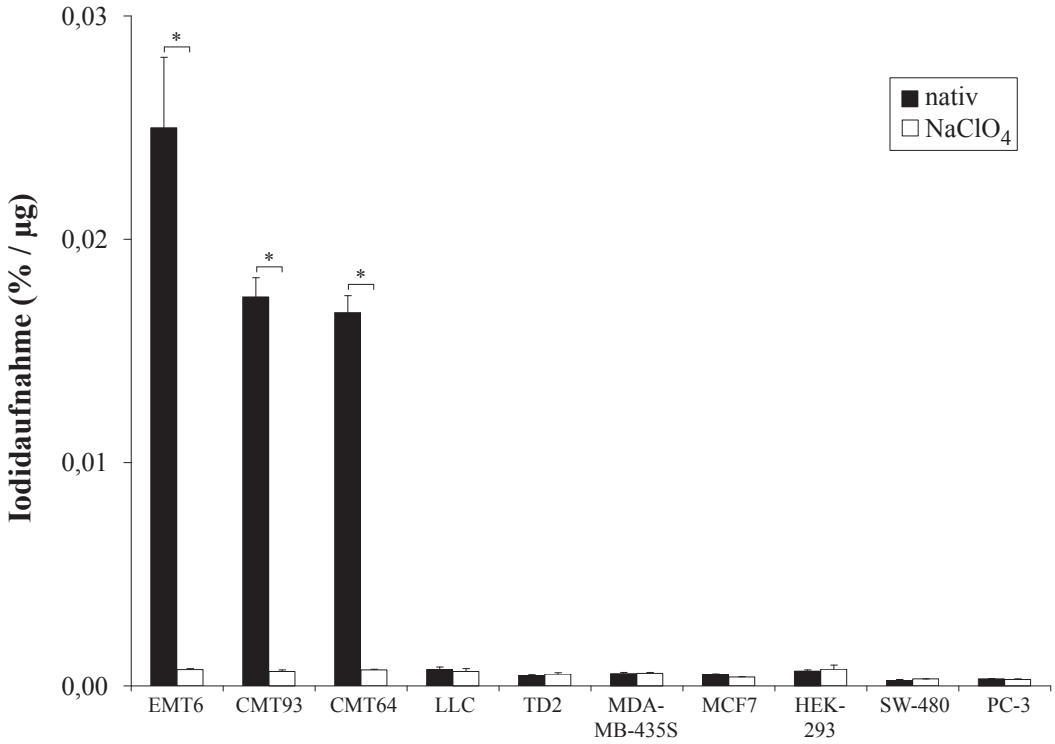

Abbildung 3.3: Iodidaufnahme der extrathyreoidalen Tumorzelllinien in vitro. Die schwarzen Balken stellen den auf die Proteinmenge normalisierten Anteil des unter Nativbedingungen internalisierten Iodids in Prozent pro μg Protein dar. Die weißen Balken repräsentieren die Iodaufnahme unter kompetitiver Inhibition des NIS durch 150 μmol/L $NaClO_4$. Mit * sind signifikante Unterschiede ($P < 0,001$) markiert. Die Fehlerbalken repräsentieren eine Standardabweichung (n = 3).

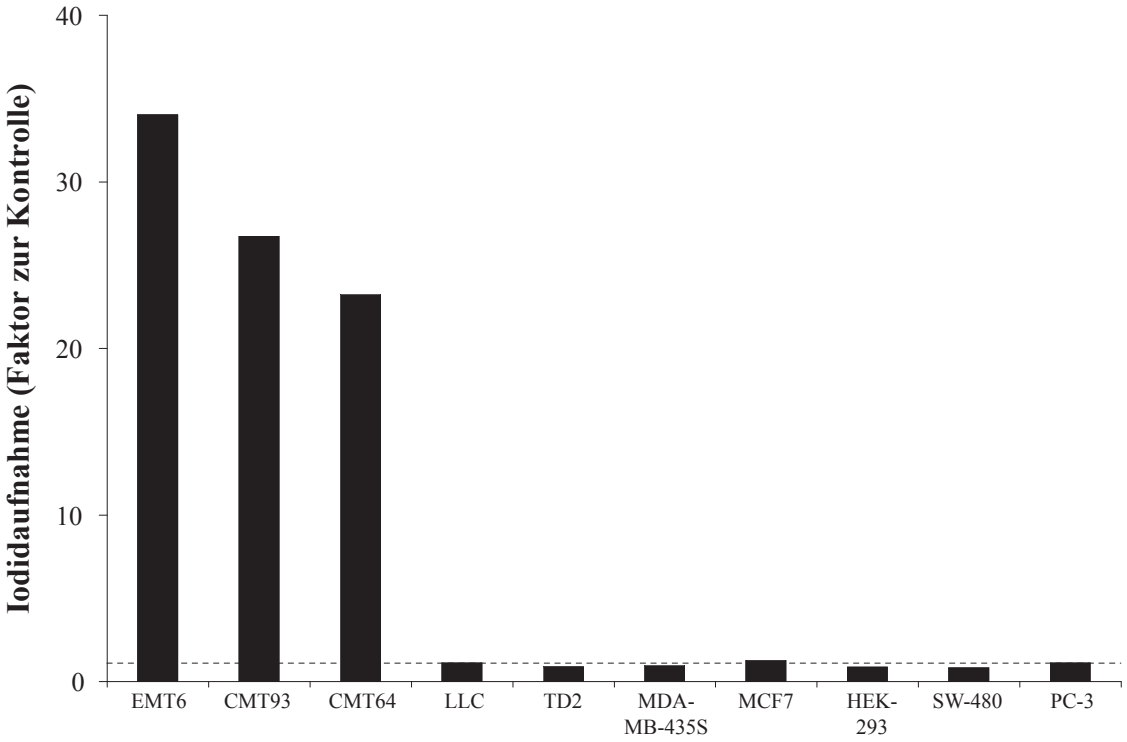

Abbildung 3.4: Iodidaufnahme der extrathyreoidalen Tumorzelllinien in vitro. Die Balken repräsentieren den Faktor zwischen der Iodaufnahme unter Nativbedingungen und unter Inhibition des NIS durch 150 μmol/L $NaClO_4$. Die gestrichelte Linie repräsentiert den Faktor = 1 (entsprechend keiner spezifischen Iodidaufnahme).

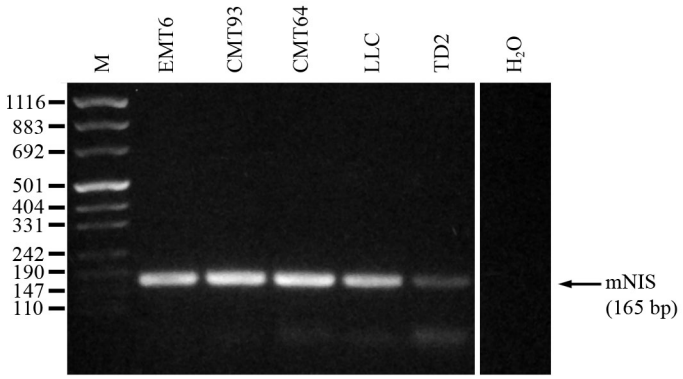

Abbildung 3.5: Agarosegel-Elektrophorese der Produkte der konventionellen PCR mit dem Primerpaar `mNIS-fw` und `-rv`. Das spezifische Amplifikat ist auf der erwarteten Größe bei 165 Basenpaaren zu detektieren. M = Marker pUC Mix 8. H_2O = PCR-Ansatz ohne cDNA.

Zusammenfassend zeigten sich drei Zelllinien, die eine signifikante Iodidaufnahme aufwiesen. Dies waren drei murine Zelllinien, im einzelnen EMT6 (Mammakarzinom), CMT93 (Rektumkarzinom) und CMT64 (Lungenkarzinom). Die Iodidaufnahme ließ sich durch $NaClO_4$ vollständig inhibieren. Die weiteren getesteten Zelllinien sind im nativen Zustand funktionell als NIS-negativ zu werten, da diese lediglich eine schwache, unspezifische Iodidaufnahme zeigten, die sich nicht durch $NaClO_4$ inhibieren ließ und quantitativ derjenigen der NIS-positiven Zelllinien unter $NaClO_4$-Inhibition entsprach.

3.2 Genexpression des NIS in murinen Zelllinien

Zum Nachweis der Genexpression des NIS in den iodidaufnehmenden murinen Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 wurde aus in vitro kultivierten Zellen RNA isoliert (siehe Abschnitt 2.14). Als Negativkontrollen wurden die murinen funktionell NIS-negativen Zelllinien LLC und TD2 herangezogen. Die Menge und Reinheit der isolierten RNA wurde photometrisch bestimmt (siehe Abschnitt 2.16) und je $1-2$ μg RNA zur cDNA-Synthese verwendet (siehe Abschnitt 2.15).

3.2.1 Konventionelle PCR

Aus den cDNA-Proben wurde mittels konventioneller PCR mit dem Primerpaar `mNIS-fw` und `-rv` ein 165 Basenpaare langer Abschnitt der mNIS-cDNA amplifiziert (siehe Abschnitt 2.17). Die PCR wurde mit 45 Zyklen und einer Annealingtemperatur von 55 °C durchgeführt. Als Kontrollen wurden gleichzeitig PCR-Ansätze mit Primerpaar `GAPDH-fw` und `-rv` (ebenfalls 45 Zyklen, 55 °C Annealingtemperatur) ausgewertet. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Abschnitt 2.18), das resultierende Bandenmuster ist in Abbildung 3.5 und 3.6 dargestellt.

In allen getesteten cDNA-Proben war mittels konventioneller PCR das mNIS-Amplifikat

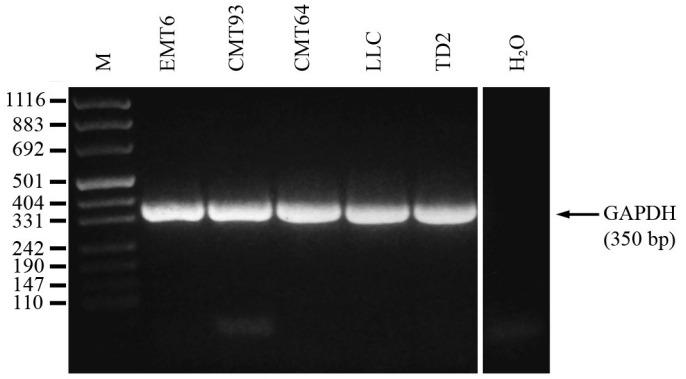

Abbildung 3.6: Agarosegel-Elektrophorese der Produkte der zur Kontrolle durchgeführten konventionellen PCR mit dem Primerpaar `GAPDH-fw` und `-rv`. Das spezifische Amplifikat ist in allen cDNA-enthaltenden Proben auf der erwarteten Größe bei 350 Basenpaaren zu detektieren. M = Marker pUC Mix 8. H_2O = PCR-Ansatz ohne cDNA.

bei 165 bp nachweisbar. Auch die als Negativkontrollen eingesetzten Zelllinien LLC und TD2 wiesen eine entsprechende Bande auf, wobei die Amplifikatmenge bei TD2 jedoch sichtbar geringer ausfiel. In allen cDNA-Proben war die mGAPDH-Positivkontrolle in etwa gleicher Amplifikatmenge nachweisbar. Eine cDNA-Kontamination der verwendeten PCR-Reagenzien wurde durch die negativen H_2O-Kontrollen (PCR-Ansätze ohne cDNA-Probe) ausgeschlossen.

Somit wurde in allen cDNA-Proben ein spezifisches mNIS-Amplifikat der erwarteten Größe nachgewiesen. Allerdings ist die konventionelle PCR in der hier verwendeten Plateauphase lediglich als qualitative Methode zu werten, ein Rückschluss von der Amplifikatmenge auf die Menge der ursprünglichen cDNA ist nicht ohne Weiteres zulässig. Zur genauen Quantifizierung der mNIS-cDNA wurde die real-time PCR verwendet, siehe Abschnitt 3.2.3.

3.2.2 Sequenzierung

Zur eindeutigen Identifikation der mNIS-PCR-Amplifikate (siehe Abschnitt 3.2.1) wurden diese sequenziert (siehe Abschnitt 2.19). Die PCR-Produkte der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 wurden zunächst mittels T4-DNA-Ligase in den Sequenzierungsvektor pCR2.1 eingefügt (siehe Anhang A.4). Die Vektor-DNA wurde anschließend in *E. coli* transformiert, mehrere Klone kultiviert und das amplifizierte Plasmid isoliert. Durch Spaltung des Plasmids mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI wurden die Klone auf das Vorliegen eines Inserts der erwarteten Größe überprüft. Dazu wurden die Spaltprodukte mehrerer Klone auf einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das erwartete Spaltprodukt ist 17 Basenpaare länger als das inserierte PCR-Produkt, entsprechend der Lokalisation der beiden *Eco*RI-Schnittstellen vor und nach der Ligationsstelle (siehe Anhang A.4). Damit ergibt sich für mNIS eine erwartete Spaltproduktlänge von $165 + 17 = 182$ Basenpaaren. Das entsprechende Bandenmuster ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Von jedem Transforma-

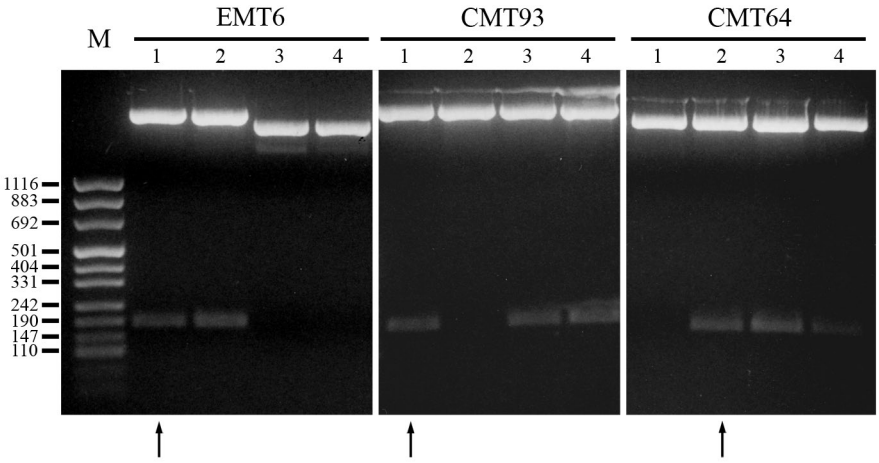

Abbildung 3.7: Agarosegel-Elektrophorese des amplifizierten pCR2.1-Plasmids nach endonukleosidischer Spaltung mit *Eco*RI. Bei inserthaltigen Klonen ist ein Spaltprodukt bei der erwarteten Größe von 182 Basenpaaren nachweisbar. DNA der mit ↑ markierten Klone wurde anschließend extern sequenziert.

tionsansatz wurde ein insertpositiver Klon ausgewählt (in der Abbildung mit einem Pfeil markiert), 3 μg dieser Plasmid-DNA ethanolisch gefällt und extern mit den Primer `M13 uni (-21)` sequenziert.

Durch die Sequenzierung konnte bei den drei Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 an der Ligationsstelle des Vektors ein inserierter Abschnitt nachgewiesen werden, dessen Nukleotidfolge mit dem entsprechendem Genabschnitt der murinen NIS-mRNA (siehe Anhang A.2, Nukleotide 1761 – 1925) übereinstimmt. Somit wurde die Identität der PCR-Amplifikate des Primerpaares `mNIS-fw` und `-rv` als ein Abschnitt der mRNA des murinen NIS in diesen Zelllinien bestätigt.

3.2.3 Real-time PCR

Die Expression des NIS auf mRNA-Ebene wurde mittels real-time PCR (siehe Abschnitt 2.20) quantitativ bestimmt. Es wurden die bereits in der konventionellen PCR (siehe Abschnitt 3.2.1) getesteten cDNA-Proben eingesetzt: EMT6, CMT93 und CMT64 als NIS-positive Zelllinien mit nachgewiesener Iodidaufnahme, sowie LLC und TD2 als Negativkontrollen. Es wurden die Primerpaare `mNIS-fw` und `-rv` zur Amplifikation der mNIS-cDNA, sowie `mb-Actin-fw` und `-rv` zur Amplifikation des endogenen Referenzgens (murines β-Actin) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.8 als relative Expression der mNIS-cDNA dargestellt, die cDNA-Probe der Zelllinie EMT6 wurde als Kalibrator (relative Expression = 1) definiert.

Die drei funktionell iodidaufnehmenden Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 zeigten hierbei eine Überexpression der mNIS-mRNA, wobei die Zelllinie CMT93 die mit Abstand stärkste Expression aufwies. Dies steht quantitativ nicht in Korrelation zu der funktionellen

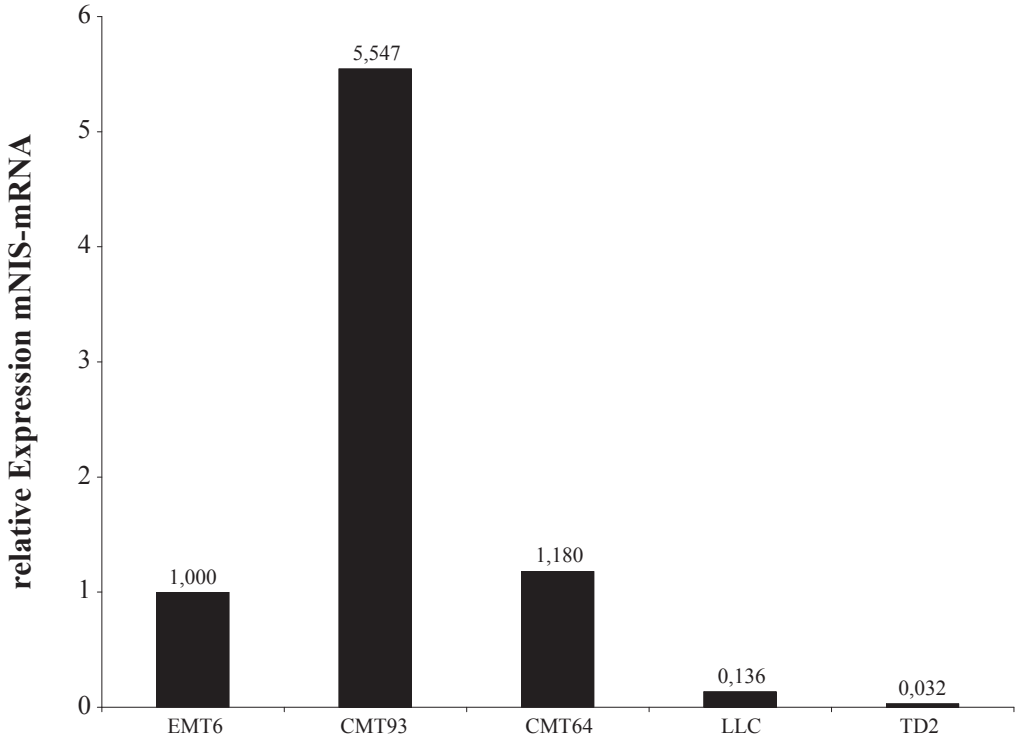

Abbildung 3.8: Ergebnisse der real-time PCR der cDNA-Proben aus in vitro gewonnener mRNA. Die Balken stellen die relative Expression der mNIS-mRNA in Bezug auf cDNA aus der Zelllinie EMT6 als Kalibrator dar. Als endogenes Referenzgen wurde murines β-Actin genutzt. Die iodidaufnehmenden Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 weisen deutlich höhere mRNA-Spiegel auf als die Kontrollzelllinien LLC und TD2.

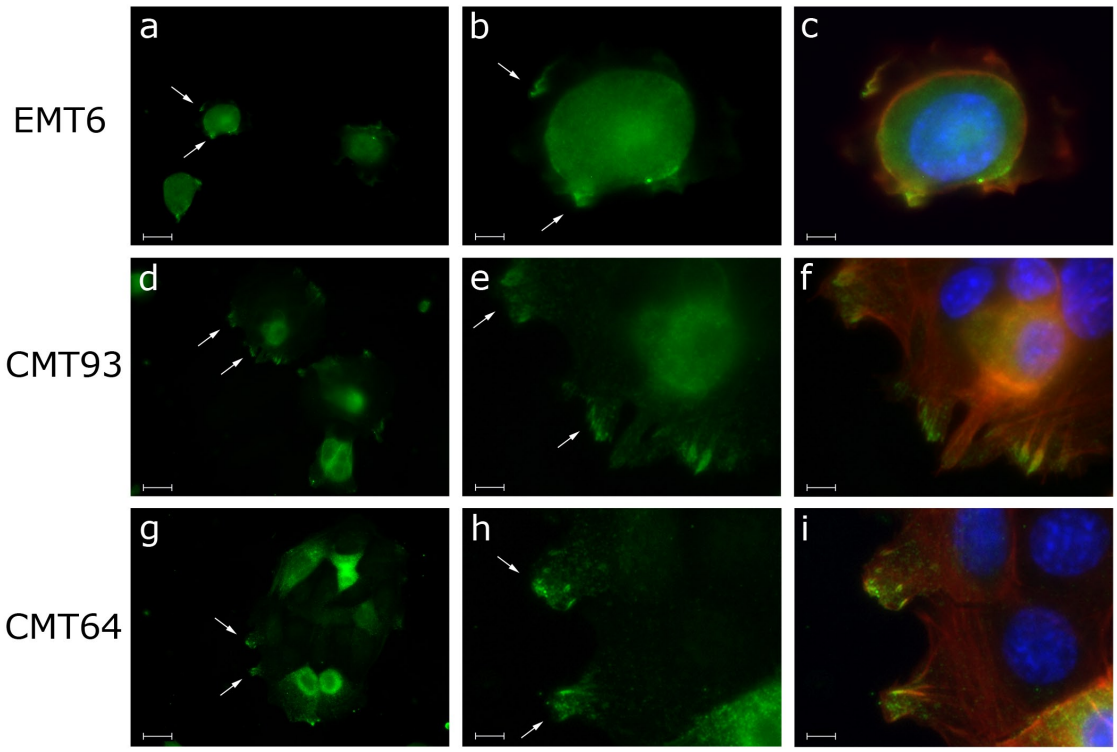

Abbildung 3.9: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64. In der linken Spalte ist NIS-spezifische Färbung (grün, FITC-konjugierter Zweitantikörper) in 400-facher Vergrößerung dargestellt. Die mittlere Spalte stellt eine Ausschnittsvergrößerung in 1600-facher Vergrößerung dar. Die Pfeile markieren Bereiche der Plasmamembran mit NIS-spezifischer Anfärbung. In der rechten Spalte sind den Ausschnittsvergrößerungen zusätzlich die Farbkanäle der Actin-Färbung (Rhodamin-konjugiertes Phalloidin, rot) und DNA (DAPI, blau) zugemischt. Die Skalierungsmarker repräsentieren 20 μm in a,d,g und 5 μm in b,c,e,f,h,i.

Iodidaufnahme (siehe Abschnitt 3.1). Dort wies die Zelllinie EMT6 die stärkste Iodidaufnahme auf, die beiden Zelllinien CMT93 und CMT64 erreichten etwa 75 % dieses Wertes. Wie auch bei der konventionellen PCR ist bei den als Negativkontrollen eingesetzten Zelllinien LLC und TD2 mNIS-cDNA nachweisbar, allerdings ist das Expressionslevel dieser Zelllinien um mehr als das 7-fache geringer.

3.3 Immunfluoreszenz

In vitro konnte bei den drei iodidaufnehmenden Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 mittels Immunfluoreszenz (siehe Abschnitt 2.21) NIS auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 3.9, grüner Kanal). NIS-Protein befindet sich teils an der Plasmamembran (Pfeile), vor allem an Protrusionen der Zellmembran kolokalisierend mit Actin-Strukturen (rot, Phalloidin). Teils fand sich NIS auch intrazellulär, insbesondere perinukleär im Bereich des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates.

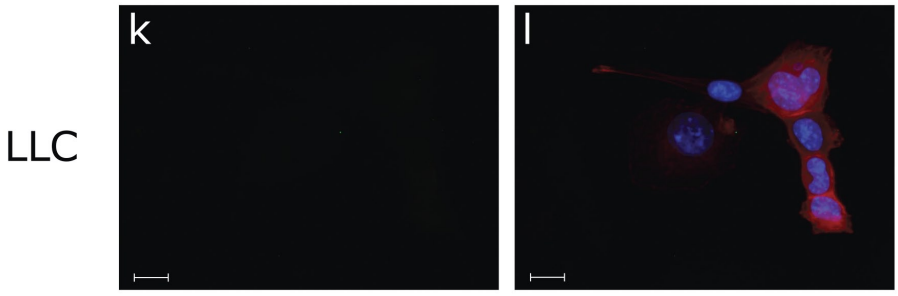

Abbildung 3.10: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinie LLC als Negativkontrolle. In k ist der Farbkanal der NIS-spezifischen Färbung (FITC-konjugierter Zweitantikörper, entsprechend der Abbildung 3.9) in 400-facher Vergrößerung dargestellt. Im Gegensatz zu den NIS-positiven Zelllinien kann hier kein signifikantes Fluoreszenzsignal detektiert werden. In l sind zusätzlich die Farbkanäle der Actin-Färbung (rot) und DNA-Färbung (blau) zugemischt. Die Skalierungsmarker entsprechen in k und l jeweils 20 μm.

Erwartungsgemäß fand sich keine relevante NIS-spezifische Färbung bei der Kontrollzelllinie LLC (Abbildung 3.10), weder an der Plasmamembran, noch intrazellulär.

3.4 Immunoblot

Auf Immunoblots (siehe Abschnitt 2.23) detektierte NIS-Immunglobulin bei Lysaten der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 eine Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 65.000 (α), entsprechend einer glykosylierten Form des NIS-Proteins (siehe Abbildung 3.11). Nach Behandlung der Zelllysate mit PNGase F vor der Elektrophorese zur Hydrolyse der N-gebundenen Zuckerreste (Deglykosylierung, siehe Abschnitt 2.22) verschob sich die durch NIS-Immunglobulin detektierte Bande auf 50.000 (β), entsprechend der erwarteten elektrophoretischen Eigenschaften des deglykosylierten NIS-Proteins [55].

3.5 Modulation der Iodidaufnahme in vitro

Zur Evaluation der funktionellen Regulation des NIS in den iodidaufnehmenden Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 wurden diese mit den in Tabelle 2.2 aufgeführten Faktoren inkubiert und die dadurch induzierte Modulation der Iodidaufnahme bestimmt (siehe Abschnitt 2.12). Die Iodidaufnahme wurde auf die Proteinmenge normalisiert und ist als Faktor der Iodidaufnahme der Kontrollzellen (diese wurden mit PBS bzw. PBS + 0,1 % DMSO behandelt) in Abbildung 3.12 dargestellt.

Als zusätzliche Kontrolle wurde wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben 150 μmol/L $NaClO_4$ zur spezifischen Inhibition des NIS eingesetzt. Dadurch wurde die Iodidaufnahme je nach Zelllinie um einen Faktor von 14 – 43 gehemmt.

Eine Stimulation der Zellen mit 1 mmol/L Dibutyryl-cAMP, einem zellmembrangängigen Analogon des cAMP, führte bei allen drei Zelllinien zu einer signifikanten ($P < 0,001$)

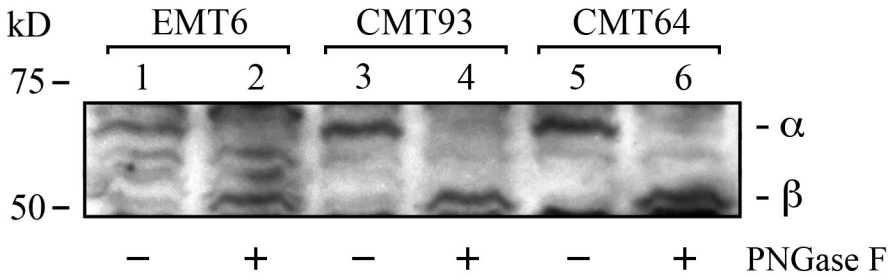

Abbildung 3.11: Immunoblot mit in vitro erstellten Zelllysaten mit dem mNIS-Antikörper `NIS S-16`. In den Spuren 1 und 2 befindet sich EMT6-Lysat, in 3 und 4 CMT93 und in 5 und 6 CMT64. Die Spuren 1, 3 und 5 sind native Lysate, die Proben der Spuren 2, 4 und 6 wurden zusätzlich mit PNGase F deglykosyliert. In den nativen Lysaten detektierte `NIS S-16` eine Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 65.000 (α), entsprechend glykosyliertem NIS. Die Bande verschob sich durch Behandlung mit PNGase F auf ca. 50.000 (β), entsprechend deglykosyliertem NIS [55].

Senkung der Iodidaufnahme auf 30 – 65 % der Kontrollen.

Durch Behandlung der Zellen mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Genistein (10 μmol/L) konnte in EMT6 und CMT93 die Iodidaufnahme signifikant ($P < 0,001$) um 50 – 70 % erhöht werden. Dieser Effekt konnte in der Zelllinie CMT64 nicht nachvollzogen werden, hier ergab sich keine signifikante Änderung der Iodidaufnahme im Vergleich zur den unbehandelten Kontrollen.

Ein gegenläufiger Effekt zeigte sich bei Inhibition der Tyrosinphosphatasen durch Inkubation mit 10 μmol/L Natriumorthovanadat. Die Iodidaufnahme nahm in allen drei Zelllinien signifikant ($P < 0,001$) auf ca. 50 – 70 % des Kontrollwertes ab.

Da sich die Wirkung von Genistein durch eine Hemmung von Tyrosinkinasen auszeichnet, und eine gegenläufige Wirkung auf die Iodidaufnahme durch Inhibition der Tyrosinphosphatasen beobachtet werden konnte, wurden zur Eingrenzung der in Frage kommenden Tyrosinkinasen einige weitere spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren evaluiert. Eine Behandlung der Zellen mit PP2, einem Hemmstoff der Familie der src-Kinasen, zeigte keine signifikante Beeinflussung der Iodidaufnahme. Weiterhin wurden Inhibitoren der EGF-Rezeptoruntereinheiten HER1 (Tyrphostin AG1478) und HER2 (Tyrphostin AG825) evaluiert. Die Behandlung der Zellen mit Tyrphostin AG1478 führte bei der Zelllinie EMT6 zu einer geringen, aber signifikanten Steigerung der Iodidaufnahme um ca. 30 %, wohingegen sich jedoch bei den anderen Zelllinien keine signifikanten Änderungen gegenüber den Kontrollen zeigten. Durch Inkubation der Zellen mit Tyrphostin AG825 konnte in keiner der getesteten Zelllinie eine signifikante Modulation der Iodidaufnahme beobachtet werden.

Eine Behandlung mit 1 μmol/L Wortmannin, einem Inhibitor der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), beeinflusste die Iodidaufnahme in den getesteten Zelllinien nicht. Ebenso ergab sich keine signifikante Modulation der Iodidaufnahme durch Inhibition der Proteinkinase C (PKC) mittels 0,1 μmol/L GF109203X.

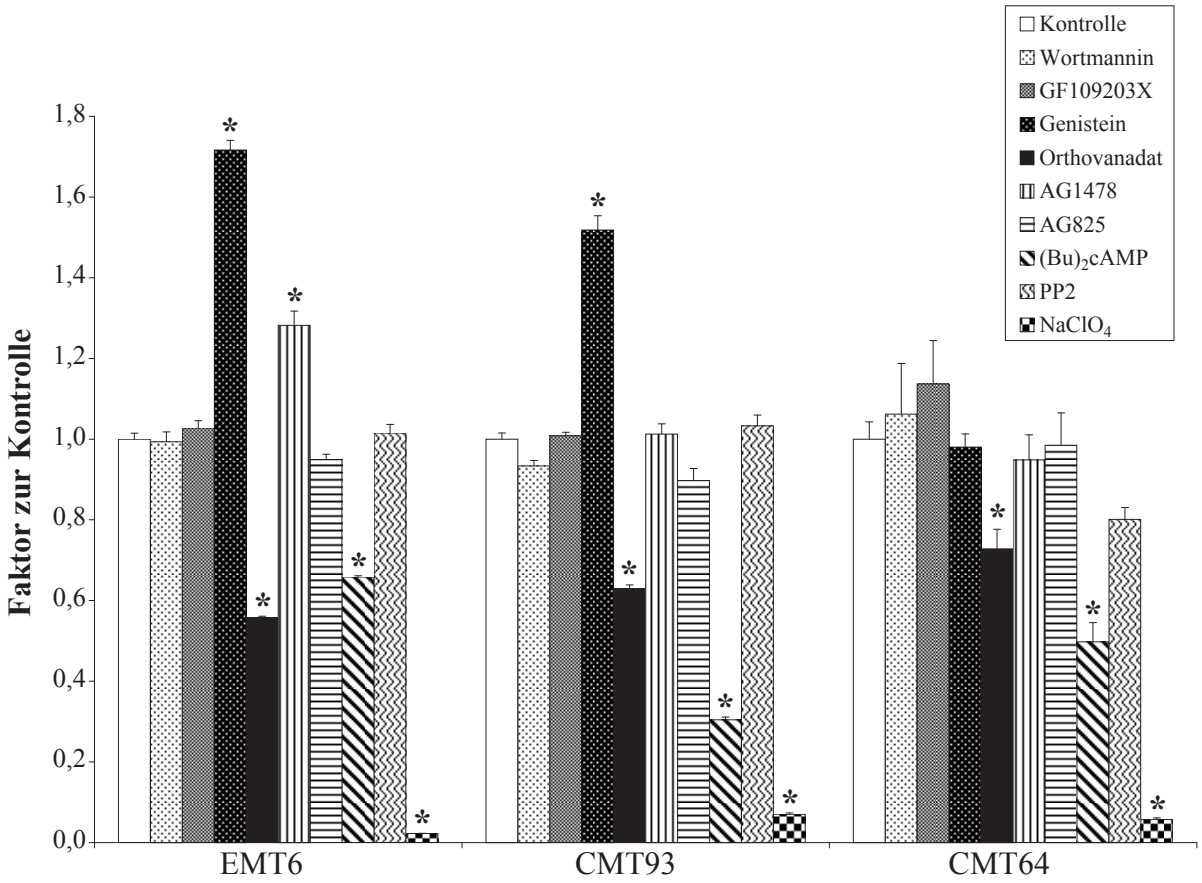

Abbildung 3.12: Veränderungen der Iodidaufnahme in vitro durch Modulation zellulärer Signalwege. Die Balken stellen den Faktor der Iodidaufnahme im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen dar. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollen ($P < 0,001$) sind mit * markiert. EMT6 und CMT93: n = 6; CMT64: n = 12.

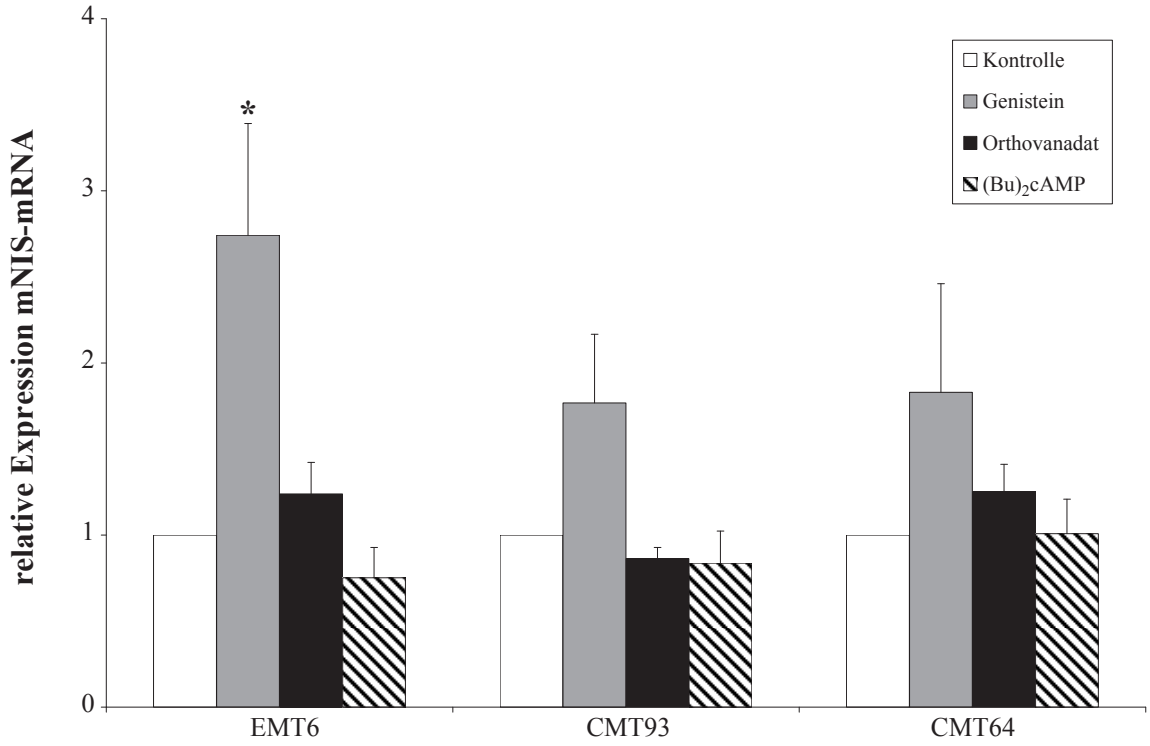

Abbildung 3.13: Ergebnisse der real-time PCR nach Modulation zellulärer Signalwege mit den Faktoren, die funktionell zu einer Veränderung der Iodidaufnahme führten. Die Balken stellen die relative Expression der mNIS-mRNA im Bezug auf die unbehandelten Kontrollzellen als Kalibrator dar. Als endogenes Referenzgen diente murines β-Actin. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollen sind mit * markiert ($P < 0,1$). Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (n = 3).

3.6 Modulation der Genexpression des NIS in vitro

Die Faktoren, die eine signifikante Änderung der Iodidaufnahme bei den Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 induzierten (Genistein, Natriumorthovanadat und Dibutyryl-cAMP, siehe Abschnitt 3.5) wurden mittels real-time PCR auf ihre Wirkung hinsichtlich der Genexpression des NIS untersucht. Dazu wurden die Zellen analog zu den funktionellen Iodidaufnahme-Versuchen mit den entsprechenden Faktoren inkubiert, RNA isoliert und in cDNA transkribiert (siehe Abschnitte 2.14 und 2.15). Kontrollzellen wurden mit PBS bzw. PBS + 0,1 % DMSO behandelt, diese dienten in der anschließenden real-time PCR als Kalibratorproben. Die real-time PCR wurde mit den Primerpaaren `mNIS-fw` und `-rv` für das Zielgen, sowie `mb-Actin-fw` und `-rv` für das Referenzgen durchgeführt (siehe Abschnitt 2.20).

Die relative Expression wurde in drei unabhängigen Versuchen gemessen, das arithmetische Mittel ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Genistein führte bei der Zelllinie EMT6 zu einer signifikanten ($P < 0,1$) Erhöhung der mNIS-mRNA-Transkription um den Fak-

Organ	EMT6	CMT93	CMT64
Blut	2,87	5,73	4,73
Tumor†	22,32	9,30	13,95
Herz	0,61	1,26	1,10
Lunge	1,36	3,01	2,46
Milz	1,57	3,10	2,07
Leber	0,86	1,73	1,34
Niere†	2,05	3,42	3,52
Magen	7,06	10,00	8,07
Schilddrüse‡	∼1000	∼600	∼900

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Biodistribution von intravenös appliziertem $^{125}I^-$ im Tiermodell in Allotransplantate der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64. Die Aktivitätsverteilung wurde 30 Minuten nach i.v. Injektion gemessen. Alle Werte sind in % ID/g angegeben. n = 1, (†n = 2). ‡Methodisch bedingt sind für die Schilddrüse Näherungswerte angegeben.

tor 2,7 im Vergleich zur Kontrolle. Bei den Zelllinien CMT93 und CMT64 war in dieser Hinsicht zwar eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante ($P > 0,1$) Erhöhung der mNIS-mRNA-Expression um den Faktor 1,8 zu beobachten. Die Hemmung der Tyrosinphosphatasen durch Natriumorthovanadat führte jedoch zu keinen signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression. Ebenso hatte die Behandlung der Zellen mit Dibutyryl-cAMP keinen signifikanten Einfluss auf die mNIS-mRNA-Expression.

3.7 Iodidaufnahme in vivo

Die endogene NIS-Aktivität der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 wurde in vivo in Allotransplantaten (siehe Abschnitt 2.9.1) evaluiert. Tumortragenden Tieren wurde $^{125}I^-$ intravenös appliziert und nach 30 Minuten Zirkulationszeit die Aktivitätskonzentration in den Organen ex vivo bestimmt (siehe Abschnitt 2.24). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 und in Abbildung 3.14 in Prozent der injizierten Aktivität pro Gramm Gewebe (% ID/g) angegeben. Um Gewebeanreicherungen zu verdeutlichen sind diese Werte auf die Aktivitätskonzentration im Blut bezogen als Verhältnis Organ : Blut in Tabelle 3.3 und in Abbildung 3.15 dargestellt.

Bei allen Versuchstieren zeigten sich Iodidanreicherungen in der Schilddrüse und in der Magenschleimhaut. Diese Organe können aufgrund der bekannten funktionell aktiven Expression des NIS als Positivkontrollen verwendet werden. Es ist zu beachten, dass die Ergebnisse der Biodistribution für die Schilddrüse Näherungswerte sind (siehe Abschnitt 2.24).

In den Allotransplantaten war eine deutliche Iodidanreicherung zu messen. Tumoren der Zelllinie EMT6 zeigten mit 22,3 % ID/g und einem Tumor : Blut-Verhältnis von 7,8 : 1 die stärkste Iodidanreicherung in vivo. An zweiter Stelle folgten CMT64-Tumoren mit 14,0 % ID/g und einem Tumor : Blut-Verhältnis von 2,9 : 1. Tumoren der Zelllinie CMT93

Organ	EMT6	CMT93	CMT64
Tumor†	7,8	1,6	2,9
Herz	0,2	0,2	0,2
Lunge	0,5	0,5	0,5
Milz	0,5	0,5	0,4
Leber	0,3	0,3	0,3
Niere†	0,7	0,6	0,7
Magen	2,5	1,7	1,7
Schilddrüse‡	∼350	∼100	∼200

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Biodistribution von intravenös appliziertem $^{125}I^-$ im Tiermodell in Allotransplantate der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64. Die Aktivitätsverteilung wurde 30 Minuten nach i.v. Injektion gemessen. Die Werte stellen das Organ : Blut-Verhältnis dar. n = 1, (†n = 2). ‡Methodisch bedingt sind für die Schilddrüse Näherungswerte angegeben.

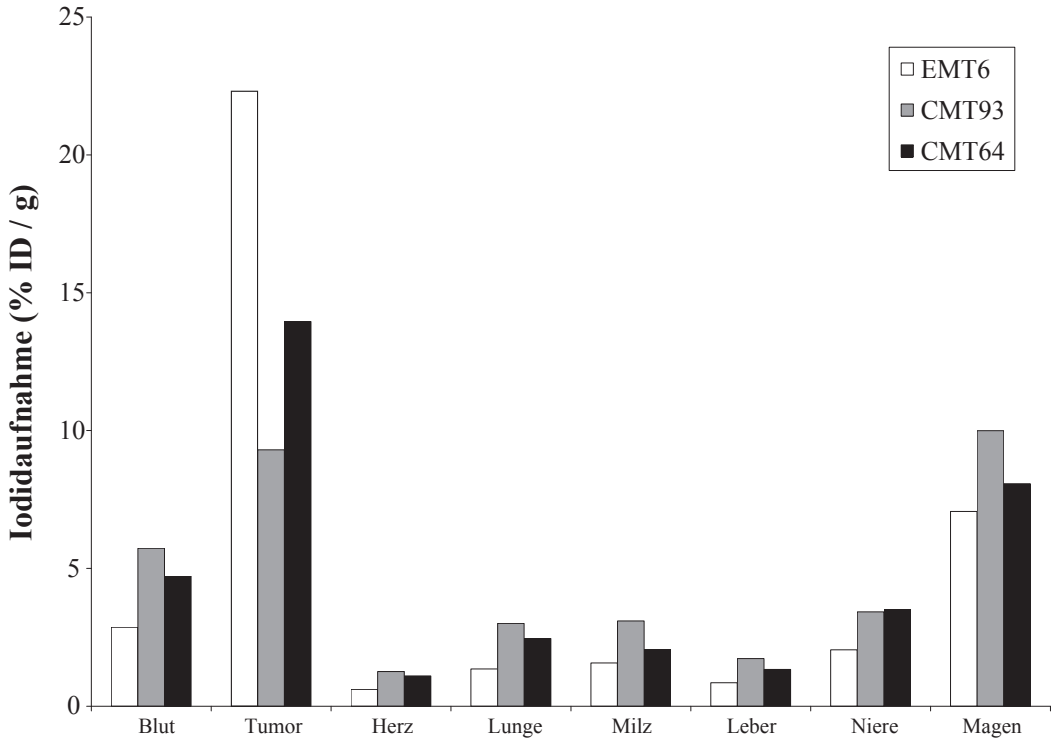

Abbildung 3.14: Biodistribution von intravenös injiziertem $^{125}I^-$ in Allotransplantate der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64. Die Aktivitätsverteilung wurde 30 Minuten nach i.v. Injektion gemessen. Die Balken stellen die Aktivitätskonzentration in den Organen in % ID/g dar. Tumor und Niere: n = 2, ansonsten n = 1.

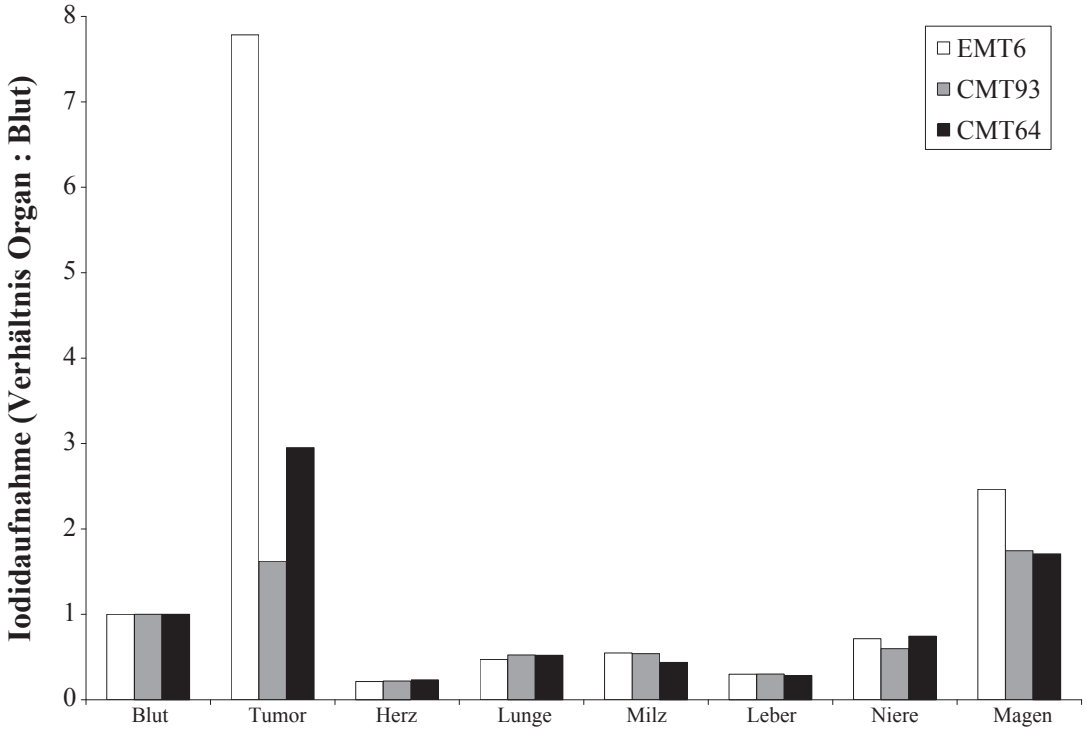

Abbildung 3.15: Biodistribution von intravenös injiziertem $^{125}I^-$ in Allotransplantate der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64. Die Aktivitätsverteilung wurde 30 Minuten nach i.v. Injektion gemessen. Die Balken stellen das Organ : Blut-Verhältnis dar. Mit einem Verhältnis > 1 lässt sich in den Tumoren eine aktive Iodaufnahme nachweisen. Tumor und Niere: n = 2, ansonsten n = 1.

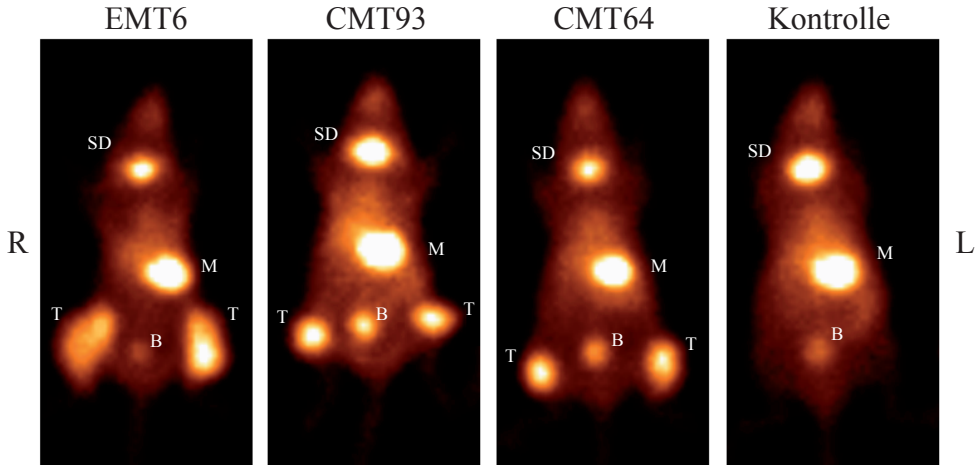

Abbildung 3.16: Szintigraphische Abbildung der funktionellen Aktivität des NIS in subkutanen Allotransplantaten der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64. Die Aufnahmen erfolgten 30 Minuten nach intravenöser Injektion von 7,4 MBq $^{99m}TcO_4^-$ pro Maus. Neben den deutlichen Anreicherungen im Bereich der Tumore (T) stellen sich ebenfalls die Schilddrüse (SD), der Magen (M) und in Folge der renalen Tracerexkretion die Harnblase (B) dar.

zeigten mit 9,3 % ID/g und einem Tumor : Blut-Verhältnis von 1,6 : 1 die im Vergleich zwar schwächste, aber eine immer noch deutliche Iodidanreicherung.

Alle anderen untersuchten Organe (Niere, Leber, Milz, Herz und Lunge) wiesen wie erwartet mit einem Organ : Blut-Verhältnis von $< 1{,}0$ keine wertbaren Iodidanreicherungen auf.

Die funktionelle Aktivität des NIS in Allotransplantaten der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 wurde durch szintigraphische Aufnahmen mit einer γ-Kamera in vivo visualisiert. Die Szintigraphien wurden wie in Abschnitt 2.25 beschrieben mit 7,4 MBq $^{99m}TcO_4^-$ pro Maus durchgeführt, die Zirkulationszeit des Radionuklids vor Beginn der Akquisition betrug 30 Minuten. In Abbildung 3.16 ist die Akkumulation des Radionuklids in den Tumoren im Bereich der Oberschenkel deutlich zu sehen. Auf der rechten Seite ist zum Vergleich eine Negativkontrolle abgebildet, hier ist im Bereich der Oberschenkel nur eine schwache Hintergrundaktivität sichtbar. Die deutliche Pertechnetatakkumulation in der Schilddrüse und im Magen ist durch die bekannte physiologische NIS-Expression in diesen Organen bedingt. Die Harnblase stellt sich in Folge der renalen Exkretion des Tracers dar.

3.8 Modulation der Aktivität des NIS in vivo

Die in vitro beobachtete Steigerung der Iodidaufnahme durch Behandlung der Zellen mit Genistein wurde in vivo überprüft: Nach der in Abschnitt 2.26 beschriebenen Methode wurde die Modulation der NIS-Aktivität in Allotransplantaten durch Behandlung tumortragender Tiere mittels intraperitonealer Applikation von Genistein evaluiert.

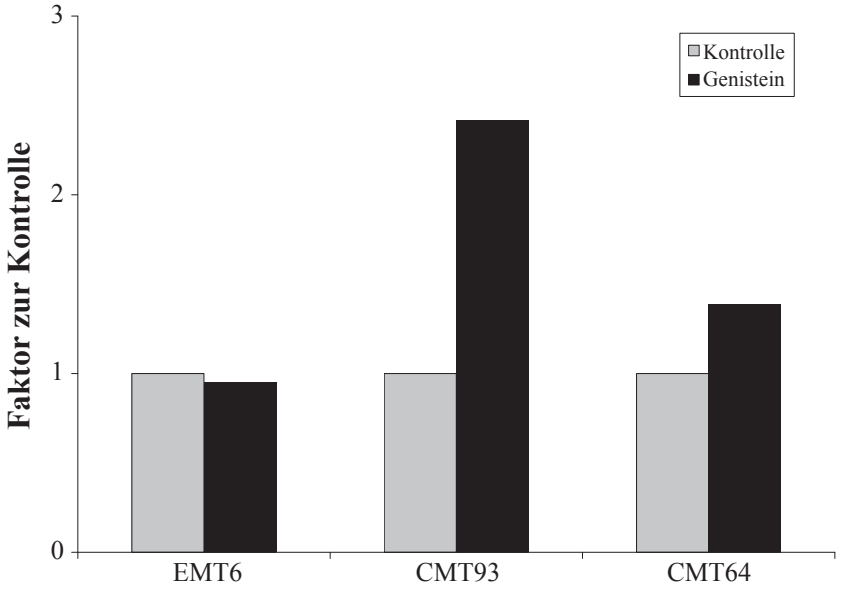

Abbildung 3.17: Modulation der NIS-Aktivität in vivo durch intraperitoneale Genistein-Applikation in allotransplantierten Tumoren der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen. EMT6: n = 4; CMT93 und CMT64: n = 2.

Die Veränderung des Tumor zu Hintergrund-Verhältnisses nach $^{99m}TcO_4^-$-Injektion in Bezug auf die Kontrolltiere ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Bei Tumoren der Zelllinie CMT93 konnte gegenüber den Kontrollen eine Steigerung der Traceraufnahme um das 2,4-fache erreicht werden. Tumore der Zelllinie CMT64 sprachen etwas schwächer an und zeigten eine Steigerung um ca. 40 %. Die Genisteinbehandlung zeigte bei der Zelllinie EMT6 jedoch keinen Effekt.

Die Tumoren der Kontrolltiere zeigten nur vergleichsweise geringe Schwankungen des Tumor zu Hintergrund-Verhältnisses vor und nach Kontrollinjektion um maximal 18 %, somit liegt die bei den Tumoren der Zelllinien CMT93 und CMT64 beobachtete Steigerung der Pertechnetataufnahme deutlich über den methodisch bedingten Schwankungen der Pertechnetataufnahme der Kontrolltiere.

3.9 NIS-Expression in murinen Modellen des kolorektalen Karzinoms

Da die murine Rektumkarzinomzelllinie CMT93 aktiv Iodid aufnimmt und im Vergleich zu Kontrollzelllinien einen deutlich erhöhten Spiegel an mNIS-mRNA aufweist, stellt sich die Frage, ob auch in weiteren murinen Modellen des kolorektalen Karzinoms NIS exprimiert wird. Hierzu wurde eine cDNA-Bank aus transgenen murinen intestinalen Tumoren auf Überexpression der mNIS-mRNA evaluiert. Die cDNA wurde aus intestinalen Gewebeproben muriner Tiermodelle gewonnen, die durch β-Catenin-, KRAS- oder APC-Mutationen

Gewebetyp	n gesamt	n stark positiv	n schwach positiv	n negativ	% positiv
NG	28	0	0	28	0 %
Tumor	42	3	3	36	14,3 %

Tabelle 3.4: Genexpression des mNIS in murinen transgenen intestinalen Tumoren. NG = Normalgewebe.

Mutation	Gewebetyp	n gesamt	n stark positiv	n schwach positiv	n negativ	% positiv
Wildtyp	NG	4	0	0	4	0 %
β-Catenin	NG	5	0	0	5	0 %
	Tumor	2	1	0	1	50 %
KRAS	NG	6	0	0	6	0 %
	Tumor	14	1	0	13	7,1 %
APC	NG	5	0	0	5	0 %
	Tumor	11	0	2	9	18,2 %
KRAS/β-Catenin	NG	6	0	0	6	0 %
	Tumor	7	0	0	7	0 %
KRAS/APC	NG	2	0	0	2	0 %
	Tumor	8	1	1	6	25 %

Tabelle 3.5: Genexpression des mNIS in murinen transgenen intestinalen Tumoren, aufgeschlüsselt nach Mutationstyp. NG = Normalgewebe.

spontane Darmtumore entwickeln (siehe Abschnitt 2.9.2). Die Expression der mNIS-mRNA dieser Tumore wurde quantitativ mittels real-time PCR (siehe Abschnitt 2.20) mit den Primerpaaren `mNIS-fw` und `-rv` sowie `mb-Actin-fw` und `-rv` als endogene Referenz ermittelt. Als Positivkontrolle und Kalibrator wurde cDNA aus muriner Magenschleimhaut verwendet. cDNA aus Leberparenchym wurde als Negativkontrolle eingesetzt.

Die relative Expression der mNIS-mRNA ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Proben wurden als schwach positiv gewertet, wenn die relative Expression mehr als das 10-fache der relativen Expression des Mittelwerts aller cDNA-Proben aus intestinalem Normalgewebe (NG) betrug. Diese sind in der Abbildung mit + gekennzeichnet. Als stark positiv wurden Proben gewertet, wenn die relative Expression mehr als das 100-fache der Normalgewebsproben erreichte. Diese sind mit ++ markiert. Tabelle 3.4 fasst diese Daten zusammen, eine Aufschlüsselung nach den Mutationen ist in Tabelle 3.5 dargestellt.

Insgesamt konnte bei 14,3 % aller Tumoren eine Überexpression des NIS nachgewiesen werden. Positive Proben konnten bei β-Catenin-, KRAS-, APC-Mutationen und KRAS/APC-Doppelmutationen, nicht aber bei KRAS/β-Catenin-Doppelmutationen nachgewiesen werden.

In keiner der getesteten intestinalen Normalgewebsproben war eine Überexpression des NIS auf mRNA-Ebene nachweisbar.

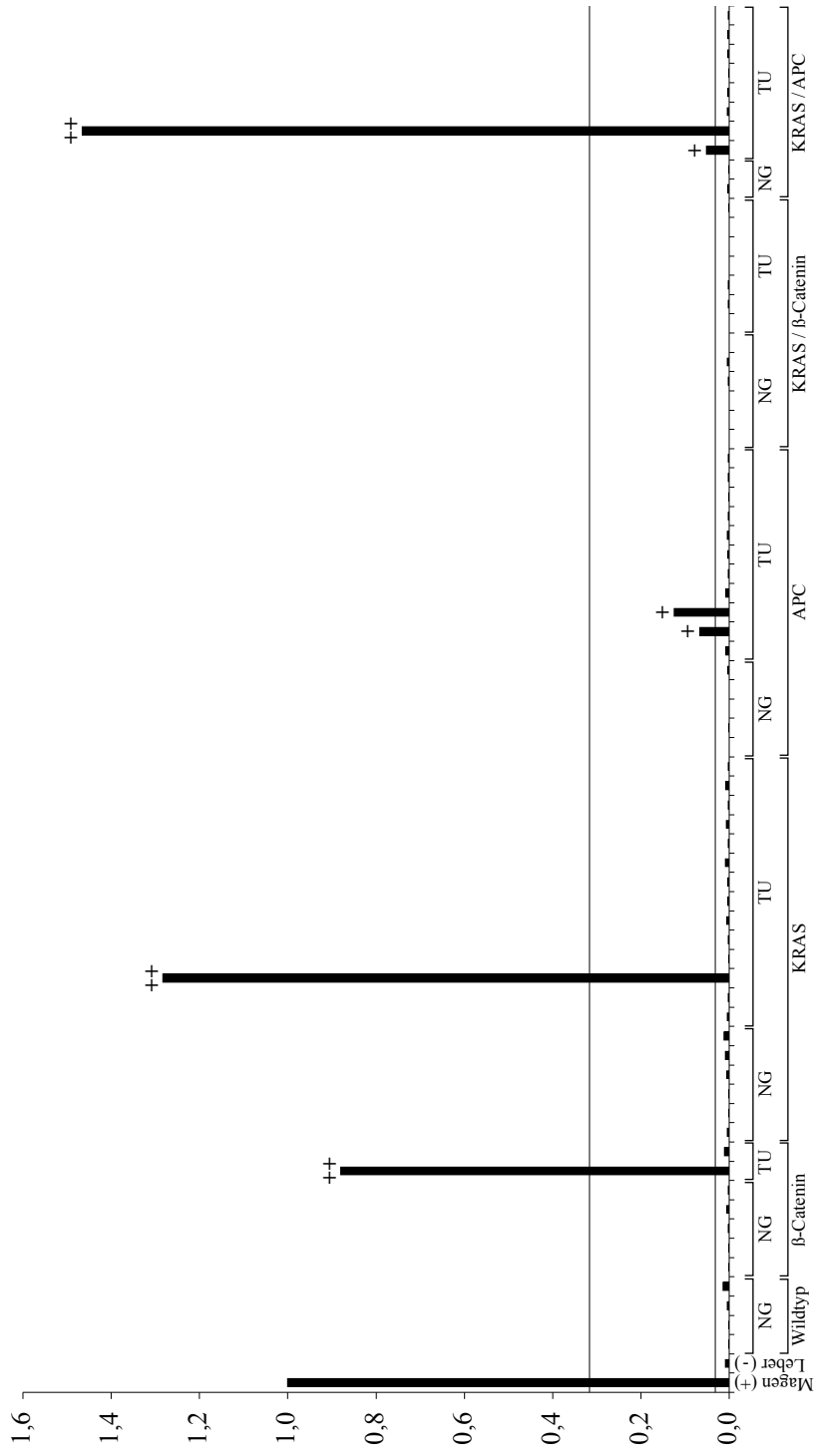

Abbildung 3.18: Genexpression des mNIS in transgenen murinen intestinalen Tumoren. Die Balken stellen die relative Expression des mNIS in Bezug auf die Magenschleimhaut als Kalibrator dar. Als endogene Referenz wurde murines β-Actin verwendet. Schwach positive Proben sind mit + markiert, stark positive Proben mit ++. Als Negativkontrolle wurde cDNA aus Leberparenchym eingesetzt. NG = Normalgewebe, TU = Tumor.

Zelllinie	Ursprungsgewebe	hNIS-mRNA
HEK-293	Niere	–
HELA	Adenokarzinom Zervix	–
Jurkat	T-Zell Lymphom	–
HT-29	kolorektales Adenokarzinom	–
SKOV3	ovarielles Adenokarzinom	–
CaCO2	kolorektales Adenokarzinom	–

Tabelle 3.6: Humane Zelllinien, die in vitro mittels real-time PCR auf Überexpression des hNIS evaluiert wurden.

3.10 NIS-Expression in humanen Zelllinien

Bei den Iodidaufnahme-Versuchen in vitro (siehe Abschnitt 3.1) waren alle evaluierten humane Zelllinien funktionell NIS-negativ. Mittels real-time PCR wurden daher einige weitere humane Tumorzelllinien (siehe Tabelle 3.6) auf Überexpression des humanen NIS (hNIS) untersucht. Hierzu wurde analog zu Abschnitt 3.2.3 in vitro mRNA isoliert und in cDNA transkribiert. Anschließend wurde die relative Expression des hNIS mit den Primerpaaren `hNIS-fw` und `-rv` für das Zielgen, sowie `hHPRT-fw` und `-rv` für das endogene Referenzgen (humane Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) durchgeführt. Es wurden 40 Zyklen mit einer Elongationstemperatur von 60 °C durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden cDNA-Proben aus humaner Magenschleimhaut und einem humanen Magenkarzinom eingesetzt, die ein Geschenk der Forschergruppe von Dr. Klaus-Peter Janssen, Chirurgische Klinik, Technische Universität München waren. Eine der cDNA-Proben der Magenschleimhaut diente als Kalibrator. Die funktionelle Aktivität des NIS der Zelllinie HEK-293 ist, wie bereits in Abschnitt 3.1 beschrieben, mit einer Iodidaufnahme von $7 \times 10^{-4}\,\% \,/\, \mu\mathrm{g}$ und keiner signifikanten Hemmbarkeit durch $NaClO_4$ (Faktor 1,1, nicht signifikant, $P > 0,1$) als negativ zu werten und wurde somit als Negativkontrolle verwendet.

Die Ergebnisse sind als relative Expression in Abbildung 3.19 dargestellt. In den Positivkontrollen der normalen Magenschleimhaut waren deutlich erhöhte hNIS-mRNA-Spiegel nachweisbar. Die cDNA-Probe des humanen Magenkarzinoms erreichte etwa 12 % der relativen Expression der Magenschleimhaut.

In den cDNA-Proben aus humanen Tumorzelllinien war die relative Expression des hNIS um mehr als das 196-fache geringer als in der Magenschleimhaut. Im cDNA-Präparat der Zelllinie HT-29 war (abgesehen von der H_2O-Leerkontrolle) als einzige Probe kein spezifisches hNIS-Amplifikat nach 40 Zyklen detektierbar. Die hNIS-mRNA-Expression der anderen getesteten humanen Zelllinien lag in vergleichbarer Höhe zu HEK-293, somit sind alle getesteten humanen Zelllinien als NIS-negativ zu werten.

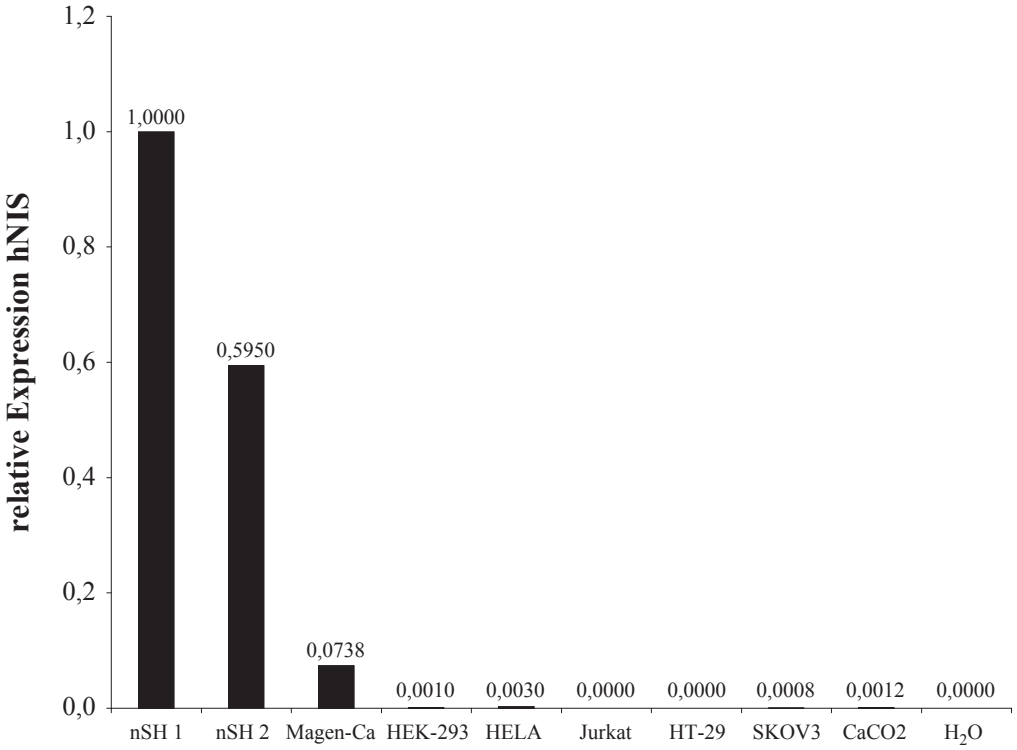

Abbildung 3.19: Genexpression des hNIS in cDNA-Proben aus humanen Zelllinien. Die Balken stellen die relative Expression der hNIS-mRNA in Bezug auf Magenschleimhaut (nSH) dar. Als endogene Referenz wurde hHPRT verwendet. Als Positivkontrollen wurde cDNA aus humaner Magenschleimhaut (nSH1 und 2) und aus einem humanem Magenkarzinom verwendet. Die Zelllinie HEK-293, die funktionell keine Iodidaufnahme zeigt, wurde als Negativkontrolle verwendet.

3.11 NIS-Expression in humanen kolorektalen Karzinomen

Zur Untersuchung der Expression des NIS in humanen kolorektalen Karzinomen wurde von Dr. Doll, Chirurgische Klinik, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München eine cDNA-Bank aus humanen Gewebeproben zur Verfügung gestellt. Daraus wurden fünf cDNA-Proben aus humanem kolorektalem Normalgewebe und je fünf Proben aus humanen kolorektalen Karzinomen der klinischen Stadien UICC I – IV mittels real-time PCR quantitativ auf hNIS-mRNA-Expression untersucht. Die PCR wurde wie in Kapitel 2.20 beschrieben mit den Primerpaaren `hNIS-fw` und `-rv` für das Zielgen, sowie `hHPRT-fw` und `-rv` für das Referenzgen durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden zwei cDNA-Proben aus humaner Magenschleimhaut verwendet, davon wurde eine als Kalibrator definiert, sowie eine cDNA-Probe eines humanen Magenkarzinoms.

Die Ergebnisse sind als relative Expression in Abbildung 3.20 dargestellt. Die Positivkontrollen aus humaner Magenschleimhaut wiesen die stärkste hNIS-Expression auf. In der H_2O-Leerkontrolle wurde kein spezifisches Amplifikat nachgewiesen. In 4 der 5 Normalgewebeproben konnte ein hNIS-Amplifikat nachgewiesen werden, die relative Expression war jedoch um den Faktor 1.500 – 3.000 geringer als in den Positivkontrollen. In 11 der 20 Tumorgewebsproben konnte ein spezifisches NIS-Amplifikat nachgewiesen werden, jedoch war die relative Expression um den Faktor 800 – 20.000 geringer als in den Positivkontrollen und lag somit etwa in vergleichbarer Höhe zu den Proben aus kolorektalem Normalgewebe. Somit sind alle Proben aus humanem kolorektalem Normalgewebe und kolorektalen Karzinomen als NIS-negativ zu werten.

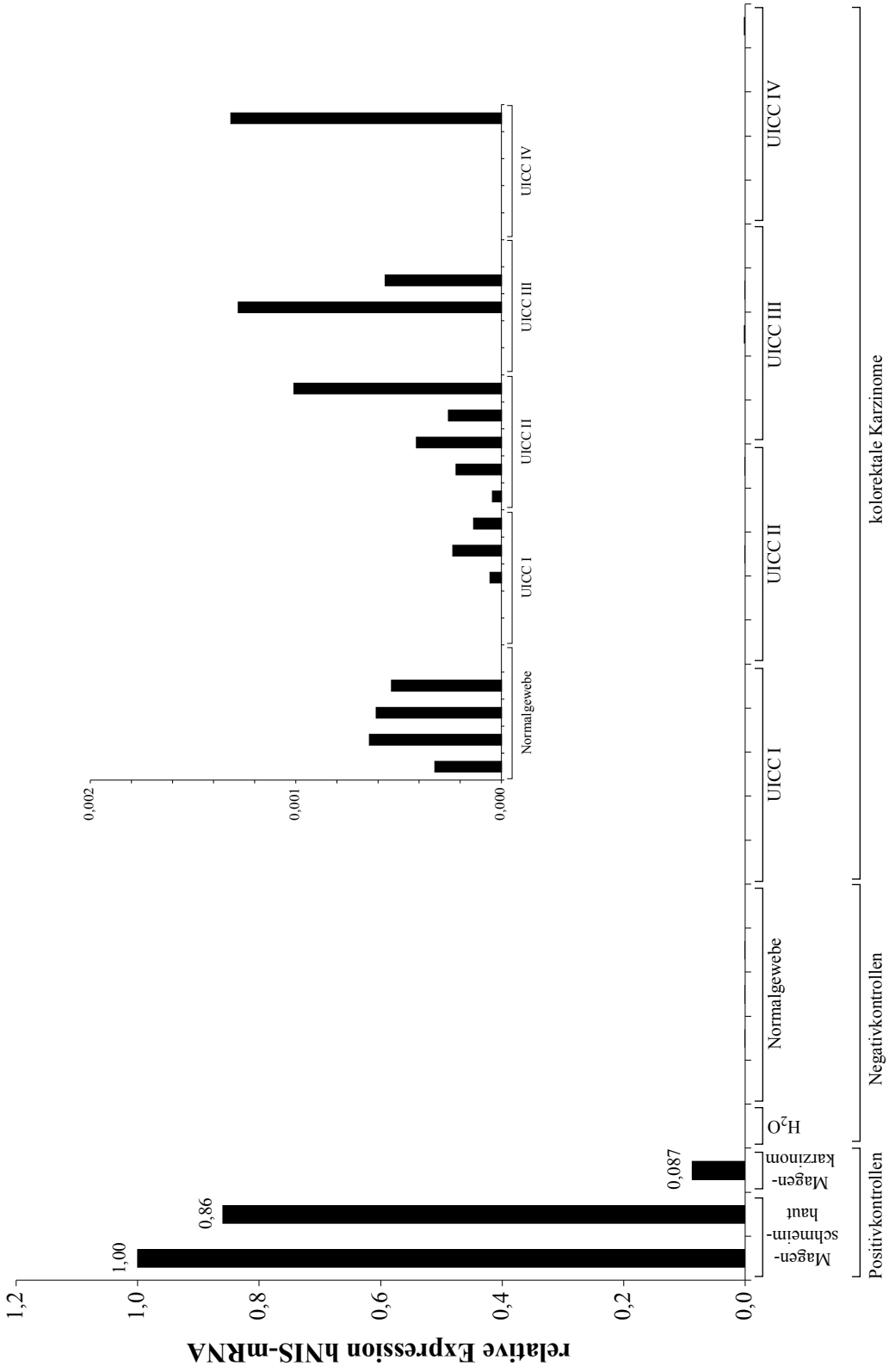

Abbildung 3.20: Genexpression des hNIS in cDNA-Proben aus humanen kolorektalen Gewebeproben und kolorektalen Karzinomen. Die Balken stellen die relative Expression des hNIS in Bezug auf humane Magenschleimhaut dar. Als endogene Referenz wurde hHPRT verwendet. Als Positivkontrollen wurden zwei cDNA-Proben aus humaner Magenschleimhaut und aus einem humanem Magenkarzinom eingesetzt. Als Inset sind die cDNA-Proben aus den kolorektalen Geweben in vergrößerter Skalierung dargestellt.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Expression des NIS in murinen extrathyreoidalen Tumorzelllinien

Bei den funktionellen Iodidaufnahme-Versuchen in vitro wurden insgesamt drei murine Zelllinien mit signifikanter Iodidaufnahme identifiziert: EMT6 (Mammakarzinom), CMT93 (kolorektales Karzinom) und CMT64 (Lungenkarzinom). Für die Vermittlung der Iodidaufnahme in diese Zelllinien durch den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) sprechen die Hemmbarkeit des Iodidtransports durch den kompetitiven Inhibitor Natriumperchlorat und die deutlich erhöhte Expression der NIS-mRNA in diesen Zelllinien im Vergleich zu den Kontrollen.

In den Ursprungsorganen dieser drei Zelllinien (Brustdrüse, Dickdarm und Lunge) wurde teilweise die Expression des NIS bereits im physiologischen Zustand nachgewiesen, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben. Weiterhin gibt es Hinweise auf eine aktive Iodid- bzw. Pertechnetataufnahme in Tumoren dieser Organe. Dennoch ist in extrathyreoidalen Tumoren eine aktive, NIS-vermittelte Iodidaufnahme bisher lediglich beim Mammakarzinom genauer bekannt. Eine endogene, funktionell aktive NIS-Expression in kolorektalen Tumoren oder in Lungenkarzinomen ist auf molekularer Ebene bisher in der Literatur nicht beschrieben.

4.1.1 NIS-Expression in der Brustdrüse (EMT6)

Die Zelllinie EMT6 wurde im Jahr 1971 aus einem murinem Mammakarzinom isoliert [47].

Die exokrinen Zellen der Brustdrüse sind grundsätzlich zur Expression des NIS und daraus resultierender Iodidanreicherung befähigt. Brustdrüsengewebe zeigt physiologischerweise während der Laktation die Fähigkeit zur Iodidaufnahme. Bei Ratten wurde während der Laktation auf Proteinebene die gesteigerte Expression des NIS sowie eine verstärkte Pertechnetatanreicherung in der Brustdrüse nachgewiesen [55]. Die in Brustdrüsenzellen exprimierte Form des NIS unterscheidet sich von der thyreoidalen Form durch ein unterschiedliches Glykosylierungsmuster. Es ist jedoch davon auszugehen, dass sich das Protein

in der Primärstruktur in diesen Organen nicht unterscheidet, bei humanen Gewebeproben wurde durch vollständige Sequenzierung der cDNA des NIS die komplette Übereinstimmung dieser Sequenz in Schilddrüse, Brustdrüse, Magenschleimhaut und Parotis nachgewiesen [51].

Auch in malignem Brustdrüsengewebe kann häufig eine Überexpression des NIS nachgewiesen werden. In Gewebeproben aus humanen Mammakarzinomen wurde in immunhistologischen Färbungen in über 80 % der Proben eine signifikant gesteigerte Expression des hNIS gezeigt, wohingegen in keiner der Proben aus normalem (nicht laktierendem) Brustdrüsengewebe ein spezifisches Signal nachgewiesen werden konnte [55]. Mitunter kann eine signifikante Aufnahme von Iodid bzw. Pertechnetat auch bei Patienten mit benignen oder malignen Neoplasien des Brustdrüsengewebes nachgewiesen werden; eine szintigraphisch sichtbare ^{99m}Tc-Pertechnetataufnahme in Adenome und Karzinome der Brustdrüse konnte bereits mit erhöhten Spiegeln NIS-kodierender mRNA korreliert werden [37]. In vitro konnte in Mammakarzinomzelllinien eine Hochregulation des NIS und daraus folgender gesteigerter Iodidaufnahme durch Behandlung mit Prolaktin, 8-Bromo-cAMP, Choleratoxin, hCG, Prostaglandin E_2, Insulin, Insulin-like growth factor (IGF-I und -II), all-*trans* Retinolsäure, 9-*cis* Retinolsäure, RAR- und RXR-Liganden induziert werden [25]. Die in diesen Arbeiten verwendeten Zelllinien sind die humanen Mammakarzinomzelllinien MCF-7, T46D und BT474. Diese Zelllinien zeigen jedoch im nativen (d.h. unstimulierten) Zustand keine nachweisbare Iodidaufnahme. Dies stimmt mit dem Ergebnis der Iodidaufnahme der Zelllinie MCF-7 in dieser Arbeit überein, die unter Nativbedingungen keine spezifische Iodidaufnahme zeigte (siehe Abschnitt 3.1).

Eine relevante Iodidaufnahme in die murine Mammakarzinomzelllinie EMT6 wurde in der Fachliteratur bisher nicht beschrieben. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen iodidaufnehmenden Mammakarzinomzelllinien zeigt die Zelllinie EMT6 bereits im nativen Zustand eine deutliche Iodidaufnahme, wohingegen MCF-7, T46D und BT474 nur nach Stimulation mit den oben genannten Faktoren Iodid aufnehmen.

4.1.2 NIS-Expression in Kolon und Rektum (CMT93)

Im Gegensatz zum Mammakarziom ist beim kolorektalen Karzinom, dem die iodidaufnehmende Zelllinie CMT93 entstammt, nur wenig über die Expression des NIS bekannt.

Es gibt Hinweise auf eine physiologische Expression des NIS in der kolorektalen Schleimhaut sowohl auf molekularbiologischer als auch auf funktioneller Ebene. NIS-Expression wurde bereits immunhistochemisch in den epithelialen Zellen des Kolons [27, 52] und in ca. 10 % der epithelialen Zellen des Rektums in der basolateralen Membran nachgewiesen [59]. In der Kolonschleimhaut konnte mittels RT-PCR eine Expression NIS-kodierender mRNA nachgewiesen werden [50].

Funktionell kann in der nuklearmedizinischen Routine regelmäßig bei Szintigraphien mit Iodid oder Pertechnetat eine Anreicherung im Darm nachgewiesen werden, dies wird in der Regel mit der Sekretion des Tracers in das Magenlumen mit anschließendem luminalen Transport in den Darm erklärt [35]. Für eine aktive Sekretion des Tracers in das Lumen des Kolons sprechen jedoch folgende Punkte:

1. Die Anreicherung im Dickdarm kann teils zu rasch nach Applikation von Iodid oder Pertechnetat nachgewiesen werden, um allein durch den luminalen Transit aus dem Magen erklärt zu werden [28, 54].

2. Teils stellt sich speziell die Dickdarmschleimhaut auf Szintigraphien verstärkt dar, was auf eine aktive Aufnahme des Tracers in die Schleimhaut hinweist [41].

3. Berechnungen mit Kompartmentmodellen beim Menschen ergaben Hinweise auf eine Iodidsekretion in das Darmlumen [18].

4. Eine aktive Sekretion von Pertechnetat in das Dickdarmlumen konnte bereits in Ratten durch funktionelle Trennung verschiedener Darmabschnitte mittels Ligation, anschließender intravenöser Applikation von ^{99m}Tc-Pertechnetat und Detektion der Aktivität ex vivo im Lumen der voneinander funktionell getrennten Darmabschnitte nachgewiesen werden [54].

Des weiteren sind Fallberichte über Pertechnetatanreicherungen in Adenokarzinomen des Kolons [15] und villösen Adenomen der Rektumschleimhaut [6] veröffentlicht worden. In Gewebestanzproben wurde immunhistochemisch in einer Untersuchung mittels Microarrays in 63 % der humanen Kolonkarzinome eine signifikante Expression des NIS beschrieben [62].

Eine endogene funktionell aktive Expression des NIS in Zelllinien des kolorektalen Karzinoms wie in der Zelllinie CMT93 ist bisher in der Literatur jedoch nicht beschrieben worden.

4.1.3 NIS-Expression in Bronchialgewebe (CMT64)

Analog zu den kolorektalen Karzinomen ist auch über die NIS-Expression und Iodidaufnahme in Gewebe bronchialem Ursprungs, dem die Zelllinie CMT64 entstammt, nur wenig bekannt.

Auf RNA-Ebene wurde eine Expression des NIS in Lungengewebe bereits beschrieben [27, 51]. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, dass die Zelllinie LLC (murines Lungenkarzinom) unter den getesteten funktionell NIS-negativen Zelllinien die höchste relative Expression der NIS-mRNA aufwies (siehe Abschnitt 3.2.3). In der bereits in Abschnitt 4.1.2 zitierten Studie [62] wurden immunhistochemisch in Microarrays in 66 % der untersuchten humanen Lungenkarzinome eine signifikante Expression des NIS auf Proteinebene beschrieben.

Klinisch wurden in Fallberichten Iodid- und Pertechnetataufnahmen in maligne und benigne Neoplasien des Bronchialgewebes veröffentlicht: in Plattenepithelkarzinome [36], Adenokarzinome [6, 13, 42], entdifferenzierte Karzinome [1, 6] und bronchogene Zysten [29]. Eine spezifische, NIS-vermittelte Iodidaufnahme in diese Läsionen ist jedoch auf molekularbiologischer Ebene bisher nicht nachgewiesen worden.

In der Literatur wurden bisher keine Zelllinien bronchialem Ursprungs beschrieben, die wie die Zelllinie CMT64 endogen die Fähigkeit zur Iodidaufnahme besitzen.

4.2 Funktionelle Regulation der NIS-Aktivität

Zellbiologisch kann die Regulation der Iodidaufnahme durch NIS prinzipiell durch verschiedene Mechanismen gesteuert werden: Über die transkriptionelle Regulation (z.B. Aktivation von Promotoren, mRNA-Stabilität), translationale Regulation der Proteinbiosynthese und Regulation durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Glykosylierung), Kontrolle der subzellulären Lokalisation (z.B. Transport an die Zellmembranoberfläche), direkte Regulation der Proteinaktivität durch z.B. Phosphorylierung sowie Stabilität und Abbau des Proteins. In dieser Arbeit wurde die Regulation auf transkriptioneller Ebene mittels real-time RT-PCR und auf funktioneller Ebene untersucht.

Hinweise auf eine posttranskriptionelle Regulation des NIS ergeben sich unter anderem aus der Beobachtung, dass keine strenge Korrelation zwischen der Syntheseaktivität der NIS-kodierenden mRNA und der funktionellen Iodidaufnahme-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Es ist anzunehmen, dass eine gewisse Grundaktivität der Transkription vorhanden sein muss, damit für eine funktionelle Iodidaufnahme ausreichend Protein exprimiert wird. Dieser Schwellenwert ist zwischen den Expressionsaktivitäten der Zelllinien EMT6 und LLC anzunehmen (siehe Abschnitt 3.2.3, Abbildung 3.8). Dennoch existiert bei den NIS-positiven Zelllinien keine Korrelation zwischen der relativen NIS-mRNA-Expression und der Aktivität der Iodidaufnahme: Die Zelllinie CMT93 wies die höchste relative Expression auf mRNA-Ebene auf (siehe Abschnitt 3.2.3), wohingegen die Zelllinie EMT6 die stärkste Iodidaufnahme zeigte (siehe Abschnitt 3.1).

Auch geht die Modulation der Iodidaufnahme nicht zwangsläufig mit einer gleichartigen Veränderung der relativen NIS-mRNA-Expression einher: Zwar konnte Genistein in vitro in den Zelllinien EMT6 und CMT93 eine signifikante Steigerung der funktionellen NIS-Aktivität induzieren und führte zu einer tendenziellen Erhöhung der NIS-mRNA-Expression in den drei Zelllinien (signifikant: EMT6, nicht signifikant: CMT93 und CMT64). Jedoch ging die deutliche Hemmung der Iodidaufnahme-Aktivität durch Natriumorthovanadat und Dibutyryl-cAMP in keinem der Fälle mit einer signifikanten Veränderung der mRNA-Expression einher (siehe Abschnitte 3.5 und 3.6).

Eine Regulation der NIS-Aktivität durch subzelluläre Translokation auf die Zelloberfläche bzw. Internalisierung des Proteins durch TSH-Stimulation bzw. -Deprivation wurde bereits in Thyreozyten nachgewiesen [45]. Dies verdeutlicht, dass von einem alleinigen Expressionsnachweis des NIS auf mRNA- oder Proteinebene nicht auf eine funktionelle Aktivität des Proteins geschlossen werden kann.

Bei physiologischer Expression des NIS in der laktierenden Mamma und den Speicheldrüsen ist die Lokalisation des NIS auf die basolaterale Zellmembran beschränkt, wohingegen in Mammakarzinomen NIS sowohl intrazellulär als auch membranständig nachgewiesen wurde [55]. Dies lässt die Hypothese zu, dass in NIS-exprimierenden maligne entarteten Zellen durch nicht physiologisch regulierte posttranslationale Mechanismen die Aktivität des NIS durch teils intrazelluläre Lokalisation attenuiert wird. Durch Aktivierung entsprechender Regulationsmechanismen, die eine Translokation des Proteins auf die Zelloberfläche vermitteln, könnte die Aktivität des endogen exprimierten NIS in diesen Zellen gesteigert werden.

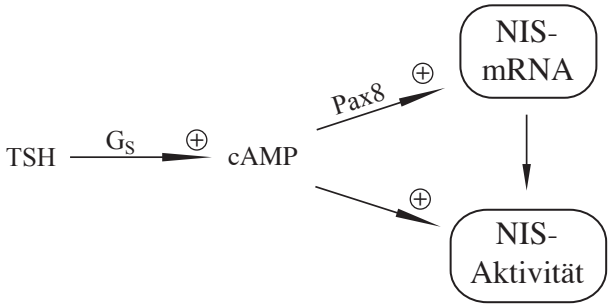

Abbildung 4.1: Die Regulation der Iodidaufnahme in Thyreozyten geschieht in erster Linie über die Aktivierung des TSH-Rezeptors mit konsekutiver Steigerung des cAMP als second messenger. cAMP steigert über den schilddrüsenspezifischen Transkriptionsfaktor Pax8 die Expression der NIS-mRNA und aktiviert NIS über posttranslationale Regulationsmechanismen.

4.2.1 cAMP

Die Aufnahme von Iodid in Thyreozyten ist stark von der Stimulation durch das Glykoprotein TSH abhängig. Durch Bindung an den G_S-Protein-gekoppelten TSH-Rezeptor dissoziiert dessen α_S-Untereinheit und aktiviert konsekutiv die Adenylylcyclase, wodurch verstärkt ATP in cAMP umgesetzt wird. cAMP vermittelt daraufhin als second messenger die hauptsächlichen Wirkungen des TSH in den Schilddrüsenzellen, unter anderem die Aktivierung der Genexpression des NIS und die subzelluläre Translokation des Proteins an die Zelloberfläche [45], schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt. Eine Erhöhung der NIS-Transkription und dessen funktioneller Aktivität durch Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels wurde bereits auf molekularer Ebene in Thyreozyten nachgewiesen [10, 23, 25, 38, 63]. Jedoch wird die Aufnahme von Iodid in extrathyreoidale Gewebe nach dem aktuellen Wissensstand nicht durch TSH reguliert [10]. Es gibt daher Grund zu der Annahme, dass in der Schilddrüse und in extrathyreoidalen Geweben unterschiedliche zelluläre Signalwege zur Expression und Aktivierung des NIS führen.

Die cAMP-abhängige Transkription der NIS-mRNA wird unter anderem über einen Enhancer in der 5'-flankierenden Region des NIS-Gens, den NUE (NIS upstream enhancer) reguliert [38]. Dieses cAMP-responsive Element ist ebenfalls von der Bindung des schilddrüsenspezifischen Transkriptionsfaktors Pax8 abhängig. In Geweben, die Pax8 nicht exprimieren, verursacht der NUE keine verstärkte Transkription des NIS-Gens, selbst wenn dieser durch Erhöhung der cAMP-Konzentration stimuliert wird.

Ausgehend von dieser Hypothese wurde die Transkription und funktionelle Aktivität des NIS in den drei extrathyreoidalen Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 in Abhängigkeit von der Stimulation durch cAMP untersucht. Durch Inkubation der Zellen mit Dibutyryl-cAMP, einem zellmembranpermeablen cAMP-Analogon, wurden cAMP-abhängige Signalwege aktiviert. Auf mRNA-Ebene zeigte daraufhin keine der drei Zelllinien eine Änderung der Transkriptionsaktivität des NIS (siehe Abschnitt 3.6). Dies steht in Einklang mit der o.g. Hypothese bei anzunehmender Abwesenheit des schilddrüsenspezifischen

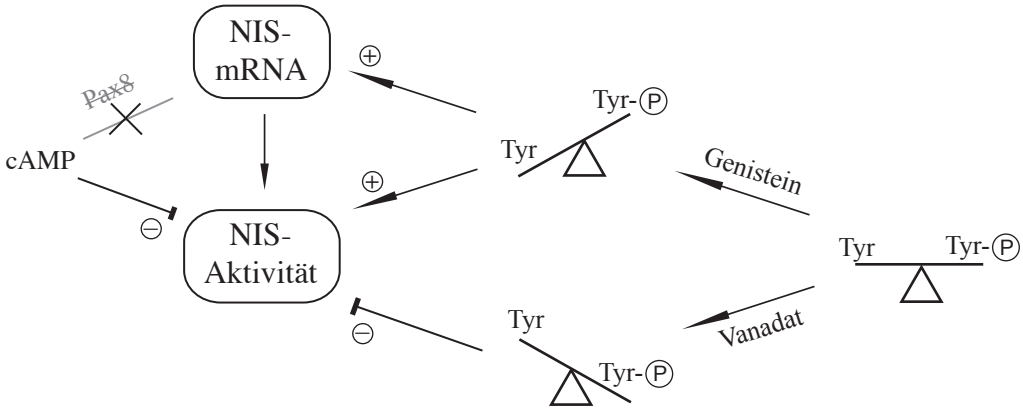

Abbildung 4.2: Die Regulation der Iodaufnahme in den extrathyreoidalen Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 unterscheidet sich von der Schilddrüse: cAMP hat bei Abwesenheit des schilddrüsenspezifischen Transkriptionsfaktors Pax8 keinen Einfluss auf die NIS-mRNA-Expression, auf posttranslationaler Ebene inhibiert es die Aktivität des NIS. Durch niedrige Tyrosinphosphorylierungsspiegel (Genistein) wird die Genexpression und Aktivität des NIS stimuliert, umgekehrt kommt es bei hohen Tyrosinphosphorylierungsspiegeln (Vanadat) zu einer posttranslationalen Inhibition der NIS-Aktivität.

Transkriptionsfaktors Pax8 in den extrathyreoidalen Zelllinien, siehe Abbildung 4.2. Auf funktioneller Ebene zeigte sich sogar eine signifikante Senkung der Iodidaufnahme, je nach Zelllinie auf 30 – 60 % der Kontrollen (siehe Abschnitt 3.5). Auch durch andere Arbeitsgruppen wurde bereits eine Inhibition der Iodidaufnahme in murines Brustdrüsengewebe [46] und humane Mammakarzinomzellen (MCF-7) [9] durch cAMP-Stimulation beschrieben.

Dies weist bei gleichbleibender Genexpression des NIS auf eine Inaktivierung auf Proteinebene durch cAMP-Stimulation hin. Als mögliche Mechanismen sind unter anderem posttranslationale Modifikation (z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung) und subzelluläre Translokation zu diskutieren. Diese Mechanismen wurden bereits in Thyreozyten als regulative Mechanismen des NIS beschrieben [45], hier allerdings — im Gegensatz zu den extrathyreoidalen Zelllinien — in positiver Abhängigkeit von cAMP. NIS enthält unter anderem eine potentielle Phosphorylierungssequenz der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, dies kann einen möglichen direkten posttranslationalen Regulationsmechanismus darstellen.

Jedoch ist hier zu erwähnen, dass von einigen Autoren auch gegensätzliche Beobachtungen publiziert wurden: Knostman et al. beobachteten einen mehr als 10-fachen Anstieg der Expression des NIS auf mRNA-Ebene in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 bei Erhöhung der intrazellulären cAMP-Spiegel durch den Phosphodiesteraseinhibitor IBMX und Choleratoxin, einem Aktivator der Adenylylcyclase [22]. Die Inkubation der Zellen mit 8-Br-cAMP resultierte in einem weniger starken Anstieg der Genexpression des NIS um den Faktor 5. Dennoch konnte durch cAMP-Stimulation keine Änderung der funktionellen Iodidaufnahme beobachtet werden, möglicherweise bedingt durch eine gleichzeitige

posttranslationale Inhibition des NIS durch cAMP-Erhöhung, wie in diesem Abschnitt beschrieben.

4.2.2 Tyrosinphosphorylierung

Viele membranverankerte Transportproteine werden durch Tyrosinphosphorylierung reguliert, indem sie durch subzelluläre Translokation zwischen Zelloberfläche und Membranvesikeln aktiviert bzw. inaktiviert werden, eine Regulation des NIS durch subzelluläre Translokation ist in der Literatur bereits beschrieben [45].

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ergeben Hinweise auf eine Regulation des NIS durch Tyrosinphosphorylierung, siehe Abbildung 4.2. Eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung durch Inhibition der Tyrosinphosphatasen mittels Natriumorthovanadat führte in EMT6, CMT93 und CMT64 zu einer signifikanten Senkung der Iodidaufnahme auf 50 – 70 % der Kontrollen (siehe Abschnitt 3.5). Der Hypothese entsprechend müsste eine Verminderung der Tyrosinphosphorylierung durch Hemmung der Tyrosinkinasen mittels Genistein eine gegenläufige Auswirkung auf die Aktivität der Iodidaufnahme zeigen. Es konnte gezeigt werden, dass sich erwartungsgemäß die Iodidaufnahme der Zelllinien EMT6 und CMT93 durch Inkubation mit Genistein signifikant um 50 – 70 % erhöhen ließ (siehe Abschnitt 3.5). Lediglich bei der Zelllinie CMT64 konnte kein signifikanter Unterschied zur Nativkontrolle beobachtet werden. Möglicherweise sind in dieser Zelllinie in vitro die entsprechenden Tyrosinkinasen bereits inaktiv, sodass durch eine Inhibition kein weiterer Effekt mehr erzielt werden kann.

Durch spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren wurde daraufhin versucht, den Signalweg enger einzugrenzen.

Die Familie der EGF-Rezeptoren (epidermal growth factor receptor) gehört zu den Rezeptor-Tyrosinkinasen, die in maligne entarteten Zellen häufig überexprimiert wird. Es existieren die Subklassen HER1 – HER4, wobei HER1 und HER2 am häufigsten exprimiert werden [43].

- Bei Inhibition von HER1 mittels Tyrphostin AG1478 ergab sich bei der Zelllinie EMT6 eine geringe, aber dennoch signifikante Erhöhung der Iodidaufnahme um etwa 30 %. Durch Behandlung dieser Zelllinie mit Genistein wurde jedoch eine stärkere Induktion der Iodidaufnahme hervorgerufen (siehe Abschnitt 3.5). Somit kann die Hemmung des EGF-Rezeptors in EMT6 einen Teilmechanismus der Genisteinwirkung in dieser Zelllinie erklären, jedoch muss von einem weiteren Wirkmechanismus des Genistein ausgegangen werden.

- Bei der Zelllinie CMT93 konnte durch HER1-Inhibition keine signifikante Veränderung der Iodidaufnahme beobachtet werden, somit zeigt sich auch bei dieser Zelllinie eine Diskrepanz zur Wirkung des Genisteins.

- Bei CMT64 konnte weder mit AG1478, noch mit Genistein eine Verstärkung der Iodidaufnahme induziert werden.

Es kann diskutiert werden, dass HER1 in der Zelllinie EMT6 im Vergleich zu CMT93 und CMT64 überexprimiert wird, sodass sich eine Inhibition dieser Tyrosinkinase nur in EMT6 auf die funktionelle Aktivität des NIS auswirkt. Dies wäre mit der häufig vorhandenen Überexpression des EGFR in Mammakarzinomen gut vereinbar. In EMT6 und CMT93 scheinen jedoch weitere Tyrosinkinasen neben HER1 an der Aktivitätssteigerung des NIS durch Genistein beteiligt zu sein. In CMT64 sind diese Mechanismen im nativen Zustand möglicherweise bereits inaktiv, sodass sich eine weitere Hemmung durch Genistein oder AG1478 nicht funktionell auf die Iodidaufnahme auswirkt.

Die Inhibition der EGF-Rezeptoruntereinheit HER2 mittels Tyrphostin AG825 führte in keiner Zelllinie zu einer signifikanten Beeinflussung der Aktivität des NIS. Ebenso ergab eine Hemmung der Familie der src-Kinasen mittels PP2 keine signifikante Änderung der Iodidaufnahme. Eine Regulation der NIS-Aktivität über diese Tyrosinkinasen erscheint daher unwahrscheinlich.

4.2.3 PPARγ

Eine Erhöhung der Iodidaufnahme und NIS-mRNA-Expression durch Troglitazon, einem Liganden des nukleären Rezeptors PPARγ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), wurde bereits in vitro in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 unter Stimulation mit 9-*cis*-Retinolsäure beschrieben [53]. Jedoch ist nicht bewiesen, dass dieser Effekt tatsächlich durch PPARγ-Aktivierung vermittelt wurde, da durch weitere PPARγ-Liganden nur ein schwacher (Rosiglitazon) bzw. kein signifikanter Effekt (Pioglitazon) auf die Iodidaufnahme bzw. NIS-mRNA-Expression erzielt werden konnte.

2004 wurde Genistein als ein potentieller Ligand des PPARα identifiziert [21], zwei Jahre später folgte der Nachweis einer PPARγ-Aktivierung durch Genistein [48]. Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, inwiefern der unter Abschnitt 4.2.2 diskutierte Effekt des Genistein auf die Iodidaufnahme in den Zelllinien EMT6 und CMT93 tatsächlich auf eine Tyrosinkinaseinhibition zurückzuführen ist. Letztendlich lässt sich diese Frage derzeit nicht endgültig klären, jedoch ist der gegenläufige regulative Effekt durch Hemmung der Kinasen und Phosphatasen ein deutlicher Hinweis auf eine Modulation der Iodidaufnahme durch Tyrosinphosphorylierung. Ebenfalls kann ein synergistischer Effekt der Tyrosinkinaseinhibition und gleichzeitiger PPARγ-Aktivierung durch Genistein diskutiert werden. Für Letzteres spricht die in dieser Arbeit beobachtete (jedoch nicht signifikante) Erhöhung der mRNA-Expression des NIS durch Inkubation der Zellen mit Genistein (siehe Abschnitt 3.6), die wie oben beschrieben ebenfalls durch eine Behandlung von MCF-7 mit Troglitazon hervorgerufen werden konnte [53].

4.2.4 Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase

Durch Transfektion der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 mit der konstitutiv aktiven Form der katalytischen Untereinheit p110 der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K) konnte durch eine andere Arbeitsgruppe eine Iodidaufnahme induziert werden [22]. Ebenso konnte durch Expression des Onkogens v-Ha-ras, welches in der Signalkaskade oberhalb der

PI3K liegt, eine tendenzielle, jedoch nicht signifikant erhöhte Iodidaufnahme beobachtet werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Modulation der NIS-Aktivität in MCF-7 durch die PI3K.

Falls die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Iodidaufnahme in den Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 durch Aktivation der gleichen intrazellulären Signalwege induziert wurde, müsste sich folglich die Iodidaufnahme durch Behandlung der Zellen mit Wortmannin, einem spezifischen Inhibitor der PI3K, signifikant hemmen lassen. Diese Hypothese konnte sich in den Iodidaufnahme-Versuchen jedoch nicht bestätigen lassen, in allen drei Zelllinien ließ sich keine signifikante Änderung der Iodidaufnahme beobachten (siehe Abschnitt 3.5). Dies lässt den Schluss zu, dass die erhöhte Aktivität des NIS in diesen Zelllinien nicht durch eine PI3K-Aktivierung hervorgerufen wird. Andererseits lässt sich eine Beteiligung dieses Signalwegs an der Regulation der Iodidaufnahme nicht ausschließen, da sich durch Aktivierung der PI3K möglicherweise eine weitere Erhöhung der Iodidaufnahme induzieren lässt. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch experimentell nicht evaluiert.

4.2.5 Proteinkinase C

NIS enthält unter anderem potentielle Phosphorylierungssequenzen der Serin- und Threoninkinasen Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA) und Casein-Kinase-2 (CK-2) [45]. Unter TSH-Stimulation bzw. Deprivation wurden bereits unterschiedliche Phosphorylierungsmuster des NIS in Thyreozyten (FRTL-5) beschrieben [45]. Dies macht die Ser-/Thr-Phosphorylierung des NIS zu einem möglichen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus der Iodidaufnahme in Thyreozyten bzw. extrathyreoidale Tumorzellen. In der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 konnte durch Behandlung mit dem PKC-Aktivator 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-azetat (TPA) ein ca. 2,5-facher Anstieg der Iodidaufnahme in MCF-7-Zellen induziert werden [3].

Daraufhin wurde untersucht, ob die erhöhte NIS-Aktivität in EMT6, CMT93 oder CMT64 durch Aktivierung des Signalwegs der PKC verursacht wird. Durch Inkubation mit GF109203X (Gö 6850), einem potenten Inhibitor der PKC, konnte allerdings keine signifikante Beeinflussung der funktionellen Iodidaufnahme in den drei Zelllinien beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.5). Somit ist die endogene funktionelle Expression des NIS in diesen Zelllinien nicht auf eine erhöhte Aktivität der PKC zurückzuführen. Allerdings ist — wie auch bei der PI3K (Abschnitt 4.2.4) — durch dieses Ergebnis eine mögliche Beeinflussung der Iodidaufnahme durch eine Aktivierung der PKC nicht ausgeschlossen.

4.3 NIS-Expression in extrathyreoidalen Tumoren in vivo

4.3.1 Iodidaufnahme in extrathyreoidalen Allotransplantaten

Die Iodid- und Pertechnetataufnahme-Aktivität der Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 blieb auch bei Wachstum dieser Zellen in vivo erhalten. Biodistributionsstudien mit ^{125}Iodid

(siehe Abschnitt 3.7) zeigten die stärkste Anreicherung des Radionuklids in Tumoren der Zelllinie EMT6. Die im Vergleich schwächste, aber dennoch deutliche Anreicherung zeigte CMT93. Die Aufnahmeaktivität der Tumoren der Zelllinie CMT64 lag zwischen EMT6 und CMT93.

Dies stimmt quantitativ nur teilweise mit dem Iodidaufnahme-Verhalten in vitro überein. In Zellkultur wies EMT6 ebenfalls die stärkste Iodidakkumulation auf, jedoch unterschieden sich CMT93 und CMT64 in vitro nicht signifikant im Aufnahmeverhalten.

Die Ursachen dieser Unterschiede zwischen Zellkultur und Tierversuch können vielfältig diskutiert werden, beispielsweise durch unterschiedliche Tumorzusammensetzung (z.B. Einwanderung von Fibroblasten), unterschiedliche Vaskularisierung der Tumore mit Differenzen im Anflutungsverhalten des Radionuklids, sowie ein unterschiedliches Mikromilieu der Zellen in vivo (u.a. Zytokine, Wachstumsfaktoren).

4.3.2 Steigerung der NIS-Aktivität durch Genistein in vivo

Die Steigerung der NIS-Aktivität durch Genistein konnte in vivo reproduziert werden. Es zeigte sich bei Vergleich der drei Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 in vivo jedoch ein anderes Muster als in vitro. EMT6 zeigt in vitro eine starke Induktion der Iodidaufnahme durch Genistein (siehe Abschnitt 3.5), wohingegen sich in vivo kein messbarer Effekt nachweisen ließ (siehe Abschnitt 3.8). Umgekehrt verhielt es sich bei CMT64, diese Zelllinie sprach in vivo gut an, wohingegen sich in vitro kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen zeigte.

Dies kann durch ein unterschiedliches Mikromilieu der Tumorzellen in vitro und in vivo bedingt sein, sodass in vivo eine andere Grundaktivität der aktivitätsmodulierenden Signalwege vorliegt und somit eine Inhibition derselben zu quantitativ unterschiedlichen Effekten führt. Dies spiegelt sich entsprechend in den Unterschieden der nativen Iodidaufnahme (ohne Genisteinbehandlung) in vitro und in vivo wieder, wie bereits in Abschnitt 4.3.1 erwähnt. Folgende Hypothese ist denkbar:

- Die NIS-modulierende (hemmende) Tyrosinkinase ist bei der Zelllinie EMT6 in vivo bereits inaktiv, sodass die native Iodidaufnahme dieser Zelllinie in vivo entsprechend hoch ist. Eine weitere Inhibition der Tyrosinphosphorylierung kann auf funktioneller Ebene zu keiner weiteren Steigerung der Iodidaufnahme führen.

- Bei CMT93 ist die entsprechende Tyrosinkinase in vivo stark aktiv, daher zeigt diese Zelllinie im Vergleich zu EMT6 in vivo unter Nativbedingungen eine quantitativ deutlich schwächere Iodaufnahme als in vitro. Entsprechend führt eine Inhibition der Tyrosinphosphorylierung in vivo zu einer deutlichen Induktion der Iodidaufnahme.

- Bei CMT64 ist die Tyrosinkinase in vivo mäßig stark aktiviert, quantitativ zwischen EMT6 und CMT93. Entsprechend liegt die native Iodidaufnahme in vivo zwischen EMT6 und CMT64. Bei Tyrosinkinaseinhibition zeigt sich dementsprechend eine mäßige Induktion der Iodidaufnahme, quantitativ zwischen CMT93 und EMT6 gelegen.

Allerdings muss ein direkter quantitativer Vergleich der Ergebnisse in vitro und in vivo vorsichtig diskutiert werden. Zum einen wurden verschiedene Substrate des NIS eingesetzt (Iodid vs. Pertechnetat), zum anderen unterscheiden sich die Methoden der Quantifizierung in vitro und in vivo erheblich. In vitro wurde die aufgenommene Aktivität der Proben direkt im γ-Szintillationszähler gemessen. In vivo wurde die Aktivität durch nicht-invasive Messung mit der γ-Kamera ermittelt, um die Aufnahmeaktivität desselben Tumors vor und nach Stimulation mit Genistein direkt vergleichen zu können. Die dabei erforderlichen Methoden (ROI-Integration, Hintergrund-Subtraktion, etc.) erhöhen zwangsläufig die Messungenauigkeit im Vergleich zur direkten Messung im γ-Szintillationszähler.

4.3.3 Expression in murinen transgenen intestinalen Tumoren

Ca. 14 % der murinen transgenen Tumorgewebsproben zeigte eine deutliche Überexpression des NIS auf mRNA-Ebene (siehe Abschnitt 3.9). Daraus kann gefolgert werden, dass diese Tumore prinzipiell eine funktionelle Iodid- bzw. Pertechnetat-Aufnahme zeigen können, insofern NIS nicht durch potentielle posttranslationale Regulationsmechanismen (siehe Abschnitt 4.2) funktionell inhibiert wird. Ebenfalls kann diskutiert werden, ob durch Tyrosinkinaseinhibition mittels Genistein in diesen Tumoren eine Iodidaufnahme induziert werden kann.

NIS-positive Proben konnten sowohl bei Tumoren mit KRAS-, als auch APC- und β-Catenin-Mutationen detektiert werden. Eine endogene Expression des NIS in diesen Tumormodellen ist daher nicht per se auf eine der drei zugrunde liegenden Mutation zurückzuführen.

Die NIS-exprimierenden Tumore wurden mittels quantitativer PCR den Kategorien stark positiv und schwach positiv zugeordnet. Bei Aufschlüsselung dieser Kategorien nach der zugrunde liegenden Mutation zeigt sich jedoch eine tendenzielle Richtung: Bei Tumoren mit APC-Mutation fanden sich nur schwach positive Proben, bei KRAS oder β-Catenin-Mutationen waren alle NIS-exprimierenden Tumoren als stark positiv einzustufen. Bei Mäusen mit KRAS/APC-Doppelmutation waren sowohl stark als auch schwach positive Proben zu finden.

- Die transgenen Tiere mit APC-Mutation tragen die knock-in Mutation $Apc^{+/1638N}$, bei der heterozygot in einem Allel des Tumor-Suppressor-Gens APC ein Stop-Codon eingefügt wurde. Erst durch spontane Mutation des zweiten Allels kommt es zum vollständigen Funktionsverlust des APC-Proteins mit daraus folgender Aktivierung des Wnt-Signalwegs.

  Die genetische Grundlage der Tumorigenese ist bei diesem Modell genau definiert und es kann diskutiert werden, dass dieser Mechanismus bei einem Teil der Tumoren zu einer schwachen NIS-Expression führt.

- Die Tiere mit $KRAS^{V12G}$-Mutation exprimieren unter dem Villin-Promoter spezifisch in intestinalem Gewebe onkogenes KRAS, das durch eine Mutation des Valin an Position 12 zu Glyzin konstitutiv aktiv ist. Da eine alleinige KRAS-Aktivation

noch nicht zur Tumorentwicklung führt, ist bei diesem Modell eine zufällige weitere spontane Mutation eines anderen Gens an der Tumorigenese beteiligt.

Ebenso verhält es sich bei den Tieren mit der β-Catenin-Mutation $A33^{DN-Bcat}$. Diese weisen eine Deletion am Aminoterminus des β-Catenin auf, die den physiologischen Abbau dieses Proteins verhindert. Konsekutiv führt dies zu einem Anstieg des intrazellulären β-Catenin-Spiegels. Wie bei der $KRAS^{V12G}$-Mutation ist auch dieser Mechanismus alleine nicht tumorigen, auch hier wird eine unabhängige zufällige zweite Mutation zur Tumorentstehung benötigt.

Die genetische Grundlage der Tumorentstehung in diesen beiden Modellen ist daher im Vergleich zu dem APC-Modell weniger genau definiert. Es kann diskutiert werden, dass durch die zusätzlichen, nicht genau definierten Mutationen die Grundlage für eine stärkere NIS-mRNA-Expression geschaffen wird.

Die Zahl der NIS-positiven Tumorgewebsproben ist jedoch zu gering, um statistisch signifikante Aussagen treffen zu können. Weitere Versuche sind erforderlich, um zum einen die beobachtete Tendenz zu überprüfen und im Anschluss die Mutationen, die zu starker bzw. schwacher NIS-Überexpression in diesen Tumoren führen zu identifizieren. Durch die Aufdeckung der entsprechenden Signalwege könnte eine Grundlage geschaffen werden, um durch gezielte Modulation zellulärer Signalwege auch in humanen Tumoren eine Überexpression des NIS zu induzieren.

4.4 NIS-Expression in humanen Zelllinien und kolorektalen Karzinomen

Zusammenfassend konnten keine humanen NIS-positiven Zelllinien identifiziert werden, weder auf funktioneller, noch auf mRNA-Ebene (siehe Abschnitte 3.1 und 3.10). Somit bleiben unter den humanen extrathyreoidalen Tumorzelllinien die Mammakarzinomzellen MCF-7, T46D und BT474 (siehe Abschnitt 4.1.1) die einzigen Zelllinien mit molekularbiologisch nachgewiesenem Potenzial zur endogenen Expression des NIS. Diese Zelllinien weisen jedoch im Gegensatz zu den in dieser Arbeit identifizierten murinen Zelllinien EMT6, CMT93 und CMT64 eine aktive Iodidaufnahme nur nach Stimulation mit z.B. Retinolsäure auf, unter Nativbedingungen nehmen diese Zellen kein Iodid auf.

Ähnlich verhält es sich bei den getesteten humanen kolorektalen Karzinomen. Auch hier konnte im Gegensatz zu den murinen transgenen Tumormodellen in keiner der humanen Proben eine Überexpression des NIS auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Da insgesamt 20 humane kolorektale Karzinome getestet wurden, bleibt die statistische Aussagekraft jedoch eingeschränkt, selbst bei einer großzügig angenommenen Prävalenz von 10 % NIS-überexprimierender Tumore beträgt die Wahrscheinlichkeit eines falsch-negativen Tests ca. 12 % (siehe Abbildung 4.3). Somit kann die Möglichkeit der NIS-Expression in dieser Tumorentität beim Menschen letztendlich nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen und weiteren Tumorentitäten sind erforderlich.

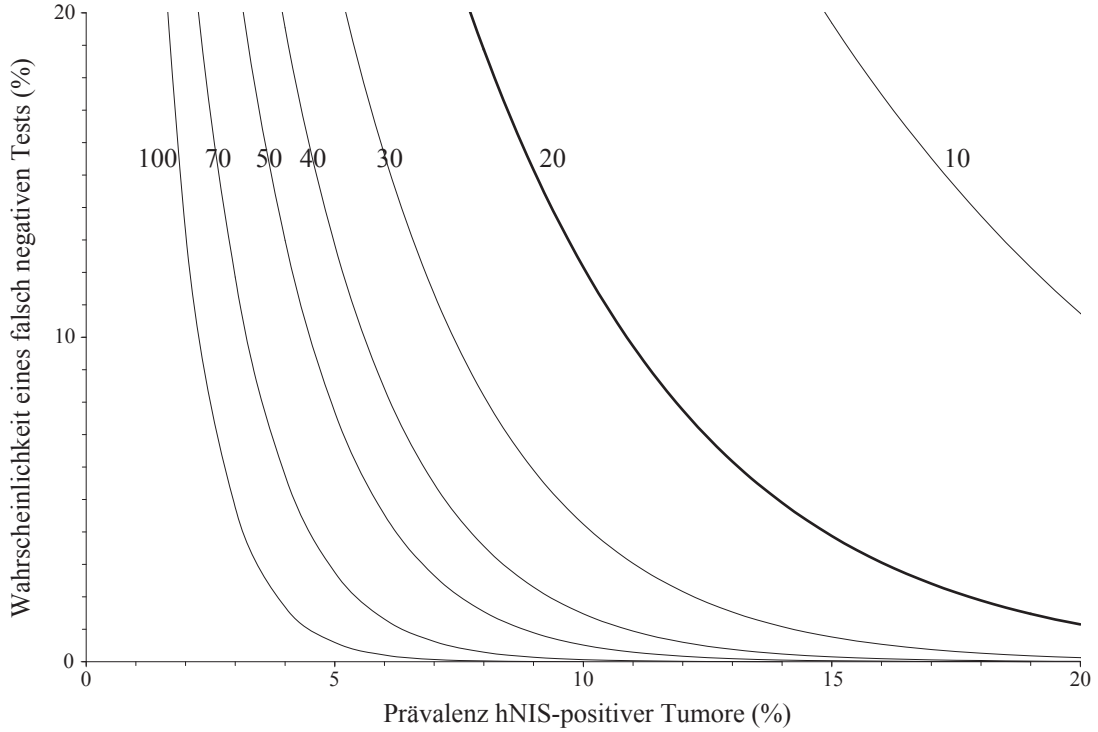

Abbildung 4.3: Wahrscheinlichkeit eines falsch-negativen Testergebnisses in Abhängigkeit der Prävalenz NIS-positiver Tumore und der getesteten Probenzahl. Bei einer beispielhaft angenommenen Prävalenz von 10 % NIS-positiver Tumore und einer getesteten Probenzahl von n = 20 (hervorgehobene Linie) beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass sich unter den getesteten Proben kein NIS-positiver Tumor befindet, ca. 12 %.

Liu et al. [32] konnten in einem präklinischen Modell hepatozellulärer Karzinome (HCC) bei Ratten funktionelle NIS-Expression nachweisen und durch Gabe von $^{131}I^-$ einen signifikanten therapeutischen Effekt erzielen. In humanen Lebertumoren konnte bei HCCs NIS-Expression immunhistochemisch jedoch nur in wenigen Fällen detektiert werden. Allerdings konnte in humanen cholangiozellulären Karzinomen (CCC) häufig auf mRNA- und auf Proteinebene eine Überexpression des NIS nachgewiesen werden, jedoch wurde eine funktionelle Iodidaufnahme in diese Tumore bisher nicht bestätigt. Auf Grundlage der genannten Publikation und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann diskutiert werden, dass Unterschiede in der Regulation der Expression und der Aktivität des NIS zwischen den beschriebenen präklinischen Tumormodellen (Maus und Ratte) und humanen Tumoren existieren. Eine Übertragbarkeit der Ergebnisse der präklinischen Modelle auf humane Zelllinien und Tumore muss daher vorsichtig diskutiert werden.

Beim Menschen bleibt somit das Mammakarzinom die einzige extrathyreoidale Tumorentität, bei der auf molekularer Ebene eine Iodidaufnahme durch endogene NIS-Expression nachgewiesen wurde.

4.5 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Regulationsmechanismen der Iodid- bzw. Pertechnetataufnahme in extrathyreoidalen Tumoren durch den Natrium-Iodid-Symporter zu evaluieren, um diese der nuklearmedizinischen Diagnostik und Therapie zugänglich zu machen. Der erfolgte molekularbiologische Nachweis des Potenzials einer endogenen, funktionell aktiven Expression des NIS in präklinischen Modellen des Mammakarzinoms, kolorektaler Karzinome und des Lungenkarzinoms stellt den ersten Schritt dieser Strategie dar. Weitere Studien sind jedoch erforderlich, um diese Ergebnisse auf die humane Situation zu übertragen.

Bei einer möglichen klinischen Anwendung könnten zukünftig Patienten mit extrathyreoidalen Tumoren identifiziert werden, deren Tumore bereits eine erhöhte endogene NIS-Expression aufweisen, die möglicherweise jedoch funktionell nicht aktiv ist. Durch entsprechende Modulation zellulärer Signalwege könnte einerseits auf posttranslationaler Ebene die Aktivität des bereits exprimierten NIS-Proteins erhöht werden. Andererseits wäre es denkbar, eine Erhöhung der NIS-Expression auf mRNA-Ebene zu induzieren und die quantitative NIS-Funktionalität weiter zu steigern. Somit könnten durch Applikation von Iodid oder Pertechnetat diese extrathyreoidalen Tumore szintigraphisch diagnostiziert werden.

In einem weiteren Schritt wäre auch eine Therapie NIS-positiver extrathyreoidaler Tumore durch Applikation entsprechender therapeutisch wirksamer Isotope, in erster Linie ^{131}I, denkbar. Hierbei ist jedoch zu bedenken, dass die Effektivität einer solchen Radionuklidtherapie extrathyreoidaler Tumore in der Theorie nicht mit der Radioiodtherapie des differenzierten Schilddrüsenkarzinoms vergleichbar sein wird. In der Schilddrüse wird durch die thyreoidale Peroxidase (TPO) aufgenommenes Iodid oxidiert und im Rahmen der Schilddrüsenhormonsynthese kovalent an Proteine (Thyreoglobulin) gebunden. Da bei potentiellen NIS-positiven extrathyreoidalen Tumoren nicht von einer gleichzeitigen endogenen Expression der TPO auszugehen ist, wird durch die fehlende Organifikation die effektive Halbwertszeit des Radionuklids deutlich kürzer als die des Iodids im Schilddrüsengewebe sein. Da die Energiedosis im Gewebe direkt proportional von der effektiven Halbwertszeit abhängig ist (siehe Abschnitt 1.1.3), wird die Effektivität einer solchen Therapie nicht die der Radioiodtherapie bei Schilddrüsenerkrankungen erreichen. Dennoch kann dieser Mechanismus eine zukünftige Therapieoption onkologischer Erkrankungen darstellen.

Anhang A

mRNA und DNA Sequenzen

A.1 Rattus norvegicus (rNIS) mRNA

GeneBank Accession Number NM_052983.2, 2862 base pairs

```
   1 gcggtgactc gcgctgcgac tctcccactg accgagagtc cccgacgtcc tccgcatcct
  61 ctcctcaccg agtcacctgt ctccatggag ggtgcggagg ccggggcccg ggccaccttc
 121 ggcgcctggg actacggcgt gttcgcgacc atgctgctgg tgtccacggg catcgggcta
 181 tgggtcggcc tggcccgcgg tggccaacgc agtgccgacg acttctttac cgggggccgg
 241 cagttggcag ccgttcctgt ggggctgtcg ctggccgcca gtttcatgtc ggctgtgcag
 301 gtgctcgggg tccccgccga ggcagcgcgc tacgggctca agttcctgtg gatgtgcgcg
 361 ggtcagttgc tcaactcgct gctcacagcg tttctcttct tgccgatctt ctaccgcctg
 421 ggccttacca gcacctacca gtacctagag ctgcgcttca gccgagcggt ccggctctgc
 481 gggacgctgc agtacttggt ggccacgatg ctgtatacag gcatcgtgat ctacgcgcct
 541 gcgctcatcc tgaaccaagt gaccgggttg gacatctggg catcgctcct gtccacagga
 601 atcatctgca ccttgtacac taccgtgggt ggtatgaagg ccgtggtctg gacagatgtg
 661 ttccaggttg tggtaatgct cgttggcttc tgggtgatcc tggcccgagg cgtcattctc
 721 ctgggggggtc cccggaacat gctcagcctc gctcagaacc attcccggat caacctgatg
 781 gactttgacc ctgatcctcg gagccggtac accttctgga ctttcatagt gggtggcaca
 841 ctggtgtggc tctccatgta cggtgtgaac caagcccagg tacagcgcta tgtggcctgc
 901 cacacagagg gaaaggccaa actggccctg cttgtcaacc agctgggcct cttcctgatt
 961 gtggccagtg cagcttgctg tggcattgtc atgttcgtct actacaagga ctgtgacccc
1021 ctcctcacag gccgtatctc agcccccgac cagtacatgc cgctgcttgt gttggacatt
1081 tttgaggatc tgcccggagt ccccgggctc ttcctggcct gtgcctacag tggcaccctc
1141 agcactgcat ccaccagcat caacgccatg gcagctgtga ctgtggaaga cctcatcaag
1201 ccgaggatgc ctggcctggc acctcggaag ttggttttca tctctaaagg gctctcattc
1261 atctacggct ctgcctgcct cactgtggct gctctgtcct cactgctggg aggtggtgtc
1321 ctccagggtt ccttcactgt gatgggtgtc atcagtgggc ctctactagg cgccttcacg
1381 cttgggatgc tgctcccagc ctgcaacacg ccaggcgttc tctccgggtt ggcagcaggc
1441 ttggctgtat ccctgtgggt ggccgtaggg gccacactgt atccccctgg agagcagacc
```

```
1501 atgggggtgc tgcccacctc ggctgcaggc tgcaccaacg attcggtcct cctgggccca
1561 cctggagcca ccaacgcttc caacgggatc cccagttctg gaatggacac gggccgccct
1621 gccctcgctg ataccttta cgccatctcc tatctctatt acggggctct gggcacgctg
1681 accaccatgc tttgcggtgc tctcatcagc taccttactg gtcccaccaa gcgcagctcc
1741 ctgggtcccg gattgctgtg gtgggacctt gctcgacaga cagcgtctgt ggccccaaag
1801 gaagacactg ccaccctgga ggagagcctg gtgaagggac cggaagacat ccctgctgtg
1861 accaagaagc cccctggcct caagccaggc gccgagaccc acccccctgta tctggggcac
1921 gatgtggaga ccaacctctg agggtggggt ccaagaaggc caatcacagg cctcgggcca
1981 gcagcctcct ctctggatgg ttggacctga gcatatatag aagcttggct gatacatgcc
2041 ctgcccagaa gtccctgtgt cttacccgca ccaaagagag agagagagcg agagagagag
2101 agagagagac agagagagag agagagagag agagacagag agagagagag agagagagag
2161 agagagagag aggagttggt tctccatcca caaaggaaac cgtctggaac cttcatgccc
2221 ttgtagattt cagtaggcag cggagaacac tcagcttctc cagactgagg ttttctcatt
2281 tatcaggcag agaaaccgag ggctgtcacc ccaacaccgg ggaggagaca gtagaagggt
2341 catagataca aagaaaacta aggcagaggg agaaatgaat tgtctacaga gcacagagct
2401 ccaaggattg tgaagctacc ttgaggtgcc aagggacgga ttctcagagc cttcacaaga
2461 cacaaacgga cgagttgcct cctccagttc agatggtttg cagactatca gagaacatgt
2521 ttctcctgtg atcagctacc tagcctctgc caacgtgttc cagcttccag gaggccacac
2581 agaccccacc ccccatgctc tcacccttta cccctgtgct tttcacacac taggcaactg
2641 ctccaccaca ggacctcaca cctagacctc cgtttttgac acagggcctt aaggtagtct
2701 ggctgccatc tgactatctc tcagcacgtt cacgtgtata atatttcatt ctttttcatt
2761 gccaagttgt cttgtaagga gagaccacaa tgtgtcatcc atgcccagct tttgtgtcta
2821 acaaataaaa tcgctgaagg tgttcaaaaa aaaaaaaaaa aa
```

A.2 Mus musculus (mNIS) mRNA

GeneBank Accession Number NM_053248.2, 2943 base pairs

```
   1 ggtcgacggc ccagcaggaa ctcgcgctgc gacgacgctc gctctgagag tccccgacgt
  61 cctccgcatc ctctccgttc cgagttacct gtctccatgg agggcgcgga ggcaggggcc
 121 cgggccacct tcggcccctg ggactacggc gtgttcgcga ccatgctgct ggtgtccacg
 181 ggcatcggtc tgtgggtcgg cctggcccgc ggcggccagc gcagcgccga cgacttcttc
 241 accgggggcc ggcagctggc ggcagtgcct gtggggctgt cgctggccgc tagcttcatg
 301 tcggctgtgc aggtgctcgg ggtccccgcg gaggcagcgc gctacggtct caagtttctg
 361 tggatgtgcg tgggccagtt gctcaattcg ctgctcacag ccttgctctt cttgccgatc
 421 ttctaccgcc tgggccttac cagcacctac cagtacctag aactgcgctt cagccgagcg
 481 gtccggctct gcgggacgct gcagtacttg gtggccacga tgctgtatac tggcatcgtg
 541 atctacgcac ctgcgctcat cctgaaccaa gtgaccgggt tggacatctg ggcatcgctc
 601 ctgtccacag gaatcatctg caccttgtac acgaccgtgg gtggtatgaa ggccgtggtc
 661 tggacagatg tgttccaggt tgtggtaatg ctcgtcggct tctgggtgat cctggctcga
 721 ggtgtcatgc tcatgggggg cccctggaac gtgctcagtc tcgctcaaaa ccattcccgg
 781 atcaacctga tggactttga ccctgaccct cggagccgct acaccttctg gacatttgta
```

```
 841 gtaggtggct ccctggtgtg gctctccatg tatggtgtga accaagccca ggtgcagcgt
 901 tatgtggcct gtcacacgga gagaaaggcc aagcttgccc tgcttgtcaa ccagcttggc
 961 ctcttcctga ttgtggctag tgcagcttgc tgtggaattg tcatgtttgt ctactacaag
1021 gactgcgacc ccctcctcac aggccgcatc gcagcccccg atcagtacat gccattgctc
1081 gtgttggaca tttttgagga tctgcccgga gtccccgggc tcttcctggc ctgtgcctac
1141 agtggcaccc tcagcaccgc gtccaccagt atcaacgcta tggcagctgt aactgtggaa
1201 gacctcatca agcccaggat gcctagcctg gcaccccgga agctggtttt catctctaaa
1261 gggctctcat tcatctatgg ctcaacctgc ctcactgtgg ctgctctgtc ctcgctgctg
1321 ggaggtgggg tcctccaggg ctctttcacc gtgatgggtg tcatcagtgg gcctctcctt
1381 ggcgctttca ccctcgggat gctgctccca gcctgcaaca cgccaggcgt cctctccggg
1441 ctgacagcag gcttagctgt atccctgtgg gtggccgtgg gggccacgct gtacccgcct
1501 ggagagcaga ccatgggggt gctgcccacc tcggctgcgg gatgcaccaa tgcctctgtc
1561 ctcccgagcc cacccggagc tgccaacact tccagaggga tccccagttc tggaatggac
1621 tcgggccgcc cagcctttgc cgacaccttt tatgctgtct cctatctcta ctacggggct
1681 ctgggtactt tgaccactat gctttgtggt gctctcatca gctacctaac tggccccacc
1741 aagcgcagct ccctgggccc cggattactg tggtgggacc tcgctcggca gacagcatct
1801 gtggccccaa aggaggacac caccaccctg gaggacagcc tggttaaggg accggaagac
1861 atccctgctg cgaccaagaa gccccctggc ttcaggccag aagccgagac ccacccccctg
1921 tatctggggc acgatgctga gaccaacctc tgagggcgag gcccgagaaa gccaatcaca
1981 ggcctcgggc cagcagcctc ctctctgaat ggttggacca tcacctgtac agaagcttgg
2041 ctgatagagg ccctgcccgc cctgaagtcc ctgtgtccca cctgtgcccc ccaaaagagg
2101 gttggttctc tatccaccaa ggaaaacatc tggaaccgca gtgaccttgt agattgcagt
2161 aggcaactga gaacactcag cttctccaga ccgtgaggtt ttcccattta acaagcagag
2221 aagctgaggg cggtcacccc aacgctggga aggtagaggc aagagattca ggaggtcaag
2281 atcatccaca gctacaggct gagaccctgc ccacccccaa atatataaaa gtaatctggg
2341 tgagccgcgt ggcttcgcga cagagggctt gcccagcaca cagaagaccc aaggcagagg
2401 gagaaatggg atgtccacag aacacagagc cccaaggatt gtgaagcttc cgcgaagtgc
2461 caagggacag attctcagag ccctcacaag acacggatgg acgagttgcc tcctcaaagg
2521 gactgacggt ttgcagacta tcagagaaca tgttccttct gtgatcagcc acctaggctc
2581 cgctaatgcg ttccagcttc caggagaccc tgcagacccc acctcccatg ctctctgccc
2641 tttacccctg tgctttgtac acactaggca cctgctctac cactgaacct cacacctaca
2701 cctccatttt tattttattt ttgacacagt gtcttaaggt agtctggctg atgtctggct
2761 atcactcagc gctttttttg tatatcaata tttcattctt tttcattgcc aagtggtctt
2821 gtaaagacat accacagtgt gtcatccatt cccagtgggt ggatgggtga atagctgcat
2881 tgttttcagc ttttgtgtac accaataaaa ttgctgtagg tgttcagaaa aaaaaaaaaa
2941 aaa
```

A.3 Homo sapiens (hNIS) mRNA

GeneBank Accession Number NM_000453.2, 3594 base pairs

```
   1 gctgtcagcg ctgagcacag cgcccaggga gagggacaga cagccggctg catgggacag
```

```
  61 cggaacccag agtgagaggg gaggtggcag gacagacaga cagcaggggc ggacgcagag
 121 acagacagcg gggacaggga ggccgacacg gacatcgaca gcccatagat tcctaaccca
 181 gggagccccg gcccctctcg ccgcttccca ccccagacgg agcggggaca ggctgccgag
 241 catcctccca cccgccctcc ccgtcctgcc tcctcggccc ctgccagctt cccccgcttg
 301 agcacgcagg gcgtccgagg acgcgctggg cctccgcacc cgccctcatg gaggccgtgg
 361 agaccgggga acggcccacc ttcggagcct gggactacgg ggtctttgcc ctcatgctcc
 421 tggtgtccac tggcatcggg ctgtgggtcg ggctggctcg gggcgggcag cgcagcgctg
 481 aggacttctt caccgggggc cggcgcctgg cggccctgcc cgtgggcctg tcgctgtctg
 541 ccagcttcat gtcggccgtg caggtgctgg gcgtgccgtc ggaggcctat cgctatggcc
 601 tcaagttcct ctggatgtgc ctgggccagc ttctgaactc ggtcctcacc gccctgctct
 661 tcatgcccgt cttctaccgc ctgggcctca ccagcaccta cgagtacctg gagatgcgct
 721 tcagccgcgc agtgcggctc tgcgggactt tgcagtacat tgtagccacg atgctgtaca
 781 ccggcatcgt aatctacgca ccggccctca tcctgaacca agtgaccggg ctggacatct
 841 gggcgtcgct cctgtccacc ggaattatct gcaccttcta cacggctgtg ggcggcatga
 901 aggctgtggt ctggactgat gtgttccagg tcgtggtgat gctaagtggc ttctgggttg
 961 tcctggcacg cggtgtcatg cttgtgggcg ggccccgcca ggtgctcacg ctggcccaga
1021 accactcccg gatcaacctc atggacttta accctgaccc gaggagccgc tatacattct
1081 ggacttttgt ggtgggtggc acgttggtgt ggctctccat gtatggcgtg aaccaggcgc
1141 aggtgcagcg ctacgtggct tgccgcacag agaagcaggc caagctggcc ctgctcatca
1201 accaggtcgg cctgttcctg atcgtgtcca gcgctgcctg ctgtggcatc gtcatgtttg
1261 tgttctacac tgactgcgac cctctcctcc tggggcgcat ctctgcccca gaccagtaca
1321 tgcctctgct ggtgctggac atcttcgaag atctgcctgg agtccccggg cttttcctgg
1381 cctgtgctta cagtggcacc ctcagcacag catccaccag catcaatgct atggctgcag
1441 tcactgtaga agacctcatc aaacctcggc tgcggagcct ggcacccagg aaactcgtga
1501 ttatctccaa ggggctctca ctcatctacg gatcggcctg tctcaccgtg gcagccctgt
1561 cctcactgct cggaggaggt gtccttcagg gctccttcac cgtcatggga gtcatcagcg
1621 gccccctgct gggagccttc atcttgggaa tgttcctgcc ggcctgcaac acaccgggcg
1681 tcctcgcggg actaggcgcg ggcttggcgc tgtcgctgtg ggtggccttg ggcgccacgc
1741 tgtacccacc cagcgagcag accatgaggg tcctgccatc gtcggctgcc cgctgcgtgg
1801 ctctctcagt caacgcctct ggcctcctgg acccggctct cctccctgct aacgactcca
1861 gcagggcccc cagctcagga atggacgcca gccgacccgc cttagctgac agcttctatg
1921 ccatctccta tctctattac ggtgccctgg gcacgctgac cactgtgctg tgcggagccc
1981 tcatcagctg cctgacaggc cccaccaagc gcagcaccct ggccccggga ttgttgtggt
2041 gggacctcgc acggcagaca gcatcagtgg cccccaagga agaagtggcc atcctggatg
2101 acaacttggt caagggtcct gaagaactcc ccactggaaa caagaagccc cctggcttcc
2161 tgcccaccaa tgaggatcgt ctgtttttct tggggcagaa ggagctggag ggggctggct
2221 cttggacccc ctgtgttgga catgatggtg gtcgagacca gcaggagaca aacctctgag
2281 gacagggcca gccgcgggac tgacaccctg ggatggaacc tcaggatggg ccaaacccag
2341 acaacgggcc catggccttg ggctctgatt ggctggattg ccttgtatgc aaatgagttc
2401 aggactacaa taccctaccc tatggggagg ccctgcctcc gggaggtcat tttttaaatc
2461 cagccccttg cttcaaccgt ccccagtatt agacgctgca gccctgacgg ctccccccaa
2521 ataaggctgg gtttttctct ctctcttttt ttttttttt ttttttgag acagggtcat
2581 gctctgtcac ccaggctgga gtgcagtggt gtgatctcgg ctcactgcaa cctctgcctc
```

```
2641 ccaggctcaa gtgattctcc tgcctcagcc tcttgagtag ctgggattgt aggtgcccac
2701 caccatgccc agccaacttt ttgtattttt agtagagaca gggtttcacc atgttggtca
2761 ggctggtctc gaactcctga cctcaagtga tccacctgcc tcggcctccc aaagtgctgg
2821 gttacaggcg taagctacca tgcccagcct accgtttttc tcaatctata atagaaagcc
2881 accacgccca ggtaattttt gtaattttgt atttttgtag agacggggtt ttgccatgtt
2941 ggccaggctg gtctcaaact cctgatctca ggtgatcctc ctgccttggc ctcccaaagg
3001 gctgggatta caggggtgag ccaccgcgcc ccacctcttt cttattttct tcctgggatt
3061 ggggagggga tgattcagac cccacatggc ctccaacctt ggcccacaca cctgccatgg
3121 ctcccatcat cctgagcatg ctagcgtccc ctcctcacct gacaatggag gctctcgaat
3181 tgggttgtgt ccccccaaaa tttatgtcta cccagaacct cagaacatga gcttacttgg
3241 aaatagggtc tttgcaggtg taactggtta aattaaaaga ggtattactg gaggaggatg
3301 gatgaatcca gtgactggtt cctcatatga agtagagaag agatgcagag aaacacatgg
3361 ggaagatgcc acgtgaagac agaggcagtg gttggatcaa tgcatctacg agtcggagaa
3421 cccaaggatt gccagcaaca accagaaatc aggagggggg catgagatgc attatttctt
3481 agagccttta gagggaacat ggccctactg acaccttgat gtcagacttc tggctgctag
3541 aactgtcaga gaataaattt ctgttgtttg atgccaaaaa aaaaaaaaaa aaaa
```

A.4 Vektorkarte pCR2.1

Siehe Abbildung A.1, übernommen aus der Produktbeschreibung pCR2.1, Invitrogen, Frankfurt, Deutschland.

*Lac*Zα fragment	bases 1 – 547
M13 reverse priming site	bases 205 – 221
Multiple cloning site	bases 234 – 357
T7 promoter / priming site	bases 364 – 383
M13 Forward (-20) priming site	bases 391 – 406
f1 origin	bases 548 – 985
Kanamycin resistance ORF	bases 1319 – 2113
Ampicillin resistance ORF	bases 2131 – 2991
pUC origin	bases 3136 – 3809
	3931 nucleotides

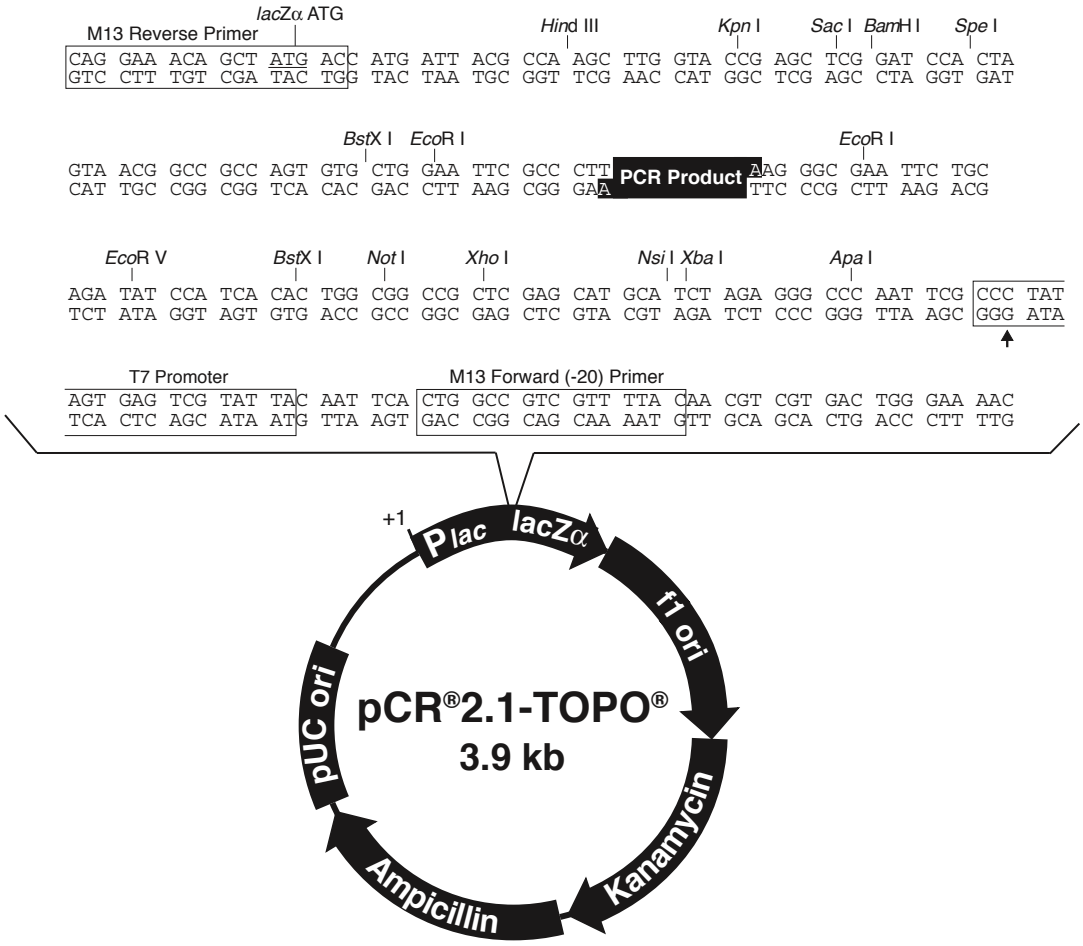

Abbildung A.1: Vektorkarte pCR2.1.

Anhang B

NIS Protein Sequenzen

B.1 Rattus norvegicus (rNIS)

GeneBank Accession Number NM_052983, 618 amino acids

```
001 - 050 MEGAEAGARA TFGAWDYGVF ATMLLVSTGI GLWVGLARGG QRSADDFFTG
051 - 100 GRQLAAVPVG LSLAASFMSA VQVLGVPAEA ARYGLKFLWM CAGQLLNSLL
101 - 150 TAFLFLPIFY RLGLTSTYQY LELRFSRAVR LCGTLQYLVA TMLYTGIVIY
151 - 200 APALILNQVT GLDIWASLLS TGIICTLYTT VGGMKAVVWT DVFQVVVMLV
201 - 250 GFWVILARGV ILLGGPRNML SLAQNHSRIN LMDFDPDPRS RYTFWTFIVG
251 - 300 GTLVWLSMYG VNQAQVQRYV ACHTEGKAKL ALLVNQLGLF LIVASAACCG
301 - 350 IVMFVYYKDC DPLLTGRISA PDQYMPLLVL DIFEDLPGVP GLFLACAYSG
351 - 400 TLSTASTSIN AMAAVTVEDL IKPRMPGLAP RKLVFISKGL SFIYGSACLT
401 - 450 VAALSSLLGG GVLQGSFTVM GVISGPLLGA FTLGMLLPAC NTPGVLSGLA
451 - 500 AGLAVSLWVA VGATLYPPGE QTMGVLPTSA AGCTNDSVLL GPPGATNASN
501 - 550 GIPSSGMDTG RPALADTFYA ISYLYYGALG TLTTMLCGAL ISYLTGPTKR
551 - 600 SSLGPGLLWW DLARQTASVA PKEDTATLEE SLVKGPEDIP AVTKKPPGLK
601 - 618 PGAETHPLYL GHDVETNL
```

B.2 Mus musculus (mNIS)

GeneBank Accession Number NM_053248, 618 amino acids

```
001 - 050 MEGAEAGARA TFGPWDYGVF ATMLLVSTGI GLWVGLARGG QRSADDFFTG
051 - 100 GRQLAAVPVG LSLAASFMSA VQVLGVPAEA ARYGLKFLWM CVGQLLNSLL
101 - 150 TALLFLPIFY RLGLTSTYQY LELRFSRAVR LCGTLQYLVA TMLYTGIVIY
151 - 200 APALILNQVT GLDIWASLLS TGIICTLYTT VGGMKAVVWT DVFQVVVMLV
201 - 250 GFWVILARGV MLMGGPWNVL SLAQNHSRIN LMDFDPDPRS RYTFWTFVVG
251 - 300 GSLVWLSMYG VNQAQVQRYV ACHTERKAKL ALLVNQLGLF LIVASAACCG
301 - 350 IVMFVYYKDC DPLLTGRIAA PDQYMPLLVL DIFEDLPGVP GLFLACAYSG
```

```
351 - 400 TLSTASTSIN AMAAVTVEDL IKPRMPSLAP RKLVFISKGL SFIYGSTCLT
401 - 450 VAALSSLLGG GVLQGSFTVM GVISGPLLGA FTLGMLLPAC NTPGVLSGLT
451 - 500 AGLAVSLWVA VGATLYPPGE QTMGVLPTSA AGCTNASVLP SPPGAANTSR
501 - 550 GIPSSGMDSG RPAFADTFYA VSYLYYGALG TLTTMLCGAL ISYLTGPTKR
551 - 600 SSLGPGLLWW DLARQTASVA PKEDTTTLED SLVKGPEDIP AATKKPPGFR
601 - 618 PEAETHPLYL GHDAETNL
```

B.3 Homo sapiens (hNIS)

GeneBank Accession Number NM_000453, 643 amino acids

```
001 - 050 MEAVETGERP TFGAWDYGVF ALMLLVSTGI GLWVGLARGG QRSAEDFFTG
051 - 100 GRRLAALPVG LSLSASFMSA VQVLGVPSEA YRYGLKFLWM CLGQLLNSVL
101 - 150 TALLFMPVFY RLGLTSTYEY LEMRFSRAVR LCGTLQYIVA TMLYTGIVIY
151 - 200 APALILNQVT GLDIWASLLS TGIICTFYTA VGGMKAVVWT DVFQVVVMLS
201 - 250 GFWVVLARGV MLVGGPRQVL TLAQNHSRIN LMDFNPDPRS RYTFWTFVVG
251 - 300 GTLVWLSMYG VNQAQVQRYV ACRTEKQAKL ALLINQVGLF LIVSSAACCG
301 - 350 IVMFVFYTDC DPLLLGRISA PDQYMPLLVL DIFEDLPGVP GLFLACAYSG
351 - 400 TLSTASTSIN AMAAVTVEDL IKPRLRSLAP RKLVIISKGL SLIYGSACLT
401 - 450 VAALSSLLGG GVLQGSFTVM GVISGPLLGA FILGMFLPAC NTPGVLAGLG
451 - 500 AGLALSLWVA LGATLYPPSE QTMRVLPSSA ARCVALSVNA SGLLDPALLP
501 - 550 ANDSSRAPSS GMDASRPALA DSFYAISYLY YGALGTLTTV LCGALISCLT
551 - 600 GPTKRSTLAP GLLWWDLARQ TASVAPKEEV AILDDNLVKG PEELPTGNKK
601 - 643 PPGFLPTNED RLFFLGQKEL EGAGSWTPCV GHDGGRDQQE TNL
```

B.4 Protein alignment: rNIS - mNIS

Identity 588 / 618 = 95.1 %

```
rNIS     1 MEGAEAGARATFGAWDYGVFATMLLVSTGIGLWVGLARGGQRSADDFFTGGRQLAAVPVG
mNIS     1 MEGAEAGARATFGPWDYGVFATMLLVSTGIGLWVGLARGGQRSADDFFTGGRQLAAVPVG
           ************* ********************************************

rNIS    61 LSLAASFMSAVQVLGVPAEAARYGLKFLWMCAGQLLNSLLTAFLFLPIFYRLGLTSTYQY
mNIS    61 LSLAASFMSAVQVLGVPAEAARYGLKFLWMCVGQLLNSLLTALLFLPIFYRLGLTSTYQY
           ******************************* ********** *****************

rNIS   121 LELRFSRAVRLCGTLQYLVATMLYTGIVIYAPALILNQVTGLDIWASLLSTGIICTLYTT
mNIS   121 LELRFSRAVRLCGTLQYLVATMLYTGIVIYAPALILNQVTGLDIWASLLSTGIICTLYTT
           ************************************************************
```

```
rNIS  181 VGGMKAVVWTDVFQVVVMLVGFWVILARGVILLGGPRNMLSLAQNHSRINLMDFDPDPRS
mNIS  181 VGGMKAVVWTDVFQVVVMLVGFWVILARGVMLMGGPWNVLSLAQNHSRINLMDFDPDPRS
          ****************************** * *** * ********************

rNIS  241 RYTFWTFIVGGTLVWLSMYGVNQAQVQRYVACHTEGKAKLALLVNQLGLFLIVASAACCG
mNIS  241 RYTFWTFVVGGSLVWLSMYGVNQAQVQRYVACHTERKAKLALLVNQLGLFLIVASAACCG
          ******* *** ********************** ************************

rNIS  301 IVMFVYYKDCDPLLTGRISAPDQYMPLLVLDIFEDLPGVPGLFLACAYSGTLSTASTSIN
mNIS  301 IVMFVYYKDCDPLLTGRIAAPDQYMPLLVLDIFEDLPGVPGLFLACAYSGTLSTASTSIN
          ****************** ****************************************

rNIS  361 AMAAVTVEDLIKPRMPGLAPRKLVFISKGLSFIYGSACLTVAALSSLLGGGVLQGSFTVM
mNIS  361 AMAAVTVEDLIKPRMPSLAPRKLVFISKGLSFIYGSTCLTVAALSSLLGGGVLQGSFTVM
          ***************** ******************* ************************

rNIS  421 GVISGPLLGAFTLGMLLPACNTPGVLSGLAAGLAVSLWVAVGATLYPPGEQTMGVLPTSA
mNIS  421 GVISGPLLGAFTLGMLLPACNTPGVLSGLTAGLAVSLWVAVGATLYPPGEQTMGVLPTSA
          ***************************** ******************************

rNIS  481 AGCTNDSVLLGPPGATNASNGIPSSGMDTGRPALADTFYAISYLYYGALGTLTTMLCGAL
mNIS  481 AGCTNASVLPSPPGAANTSRGIPSSGMDSGRPAFADTFYAVSYLYYGALGTLTTMLCGAL
          ***** ***  **** * * ******** **** ****** ********************

rNIS  541 ISYLTGPTKRSSLGPGLLWWDLARQTASVAPKEDTATLEESLVKGPEDIPAVTKKPPGLK
mNIS  541 ISYLTGPTKRSSLGPGLLWWDLARQTASVAPKEDTTTLEDSLVKGPEDIPAATKKPPGFR
          ********************************** *** *********** ******

rNIS  601 PGAETHPLYLGHDVETNL
mNIS  601 PEAETHPLYLGHDAETNL
          * *********** ****
```

B.5 Protein alignment: rNIS - hNIS

```
Identity 523/643 = 81.3 %

rNIS    1 MEGAEAGARATFGAWDYGVFATMLLVSTGIGLWVGLARGGQRSADDFFTGGRQLAAVPVG
hNIS    1 MEAVETGERPTFGAWDYGVFALMLLVSTGIGLWVGLARGGQRSAEDFFTGGRRLAALPVG
          **  * * * *********** ********************** ******* *** ***
```

```
rNIS   61 LSLAASFMSAVQVLGVPAEAARYGLKFLWMCAGQLLNSLLTAFLFLPIFYRLGLTSTYQY
hNIS   61 LSLSASFMSAVQVLGVPSEAYRYGLKFLWMCLGQLLNSVLTALLFMPVFYRLGLTSTYEY
          *** ************* ** ********** ****** *** ** * ********** *

rNIS  121 LELRFSRAVRLCGTLQYLVATMLYTGIVIYAPALILNQVTGLDIWASLLSTGIICTLYTT
hNIS  121 LEMRFSRAVRLCGTLQYIVATMLYTGIVIYAPALILNQVTGLDIWASLLSTGIICTFYTA
          ** ************** ************************************* **

rNIS  181 VGGMKAVVWTDVFQVVVMLVGFWVILARGVILLGGPRNMLSLAQNHSRINLMDFDPDPRS
hNIS  181 VGGMKAVVWTDVFQVVVMLSGFWVVLARGVMLVGGPRQVLTLAQNHSRINLMDFNPDPRS
          ******************* **** ***** * ****  * ************* *****

rNIS  241 RYTFWTFIVGGTLVWLSMYGVNQAQVQRYVACHTEGKAKLALLVNQLGLFLIVASAACCG
hNIS  241 RYTFWTFVVGGTLVWLSMYGVNQAQVQRYVACRTEKQAKLALLINQVGLFLIVSSAACCG
          ******* ************************ **  ****** ** ****** ******

rNIS  301 IVMFVYYKDCDPLLTGRISAPDQYMPLLVLDIFEDLPGVPGLFLACAYSGTLSTASTSIN
hNIS  301 IVMFVFYTDCDPLLLGRISAPDQYMPLLVLDIFEDLPGVPGLFLACAYSGTLSTASTSIN
          ***** * ****** ******************************************

rNIS  361 AMAAVTVEDLIKPRMPGLAPRKLVFISKGLSFIYGSACLTVAALSSLLGGGVLQGSFTVM
hNIS  361 AMAAVTVEDLIKPRLRSLAPRKLVIISKGLSLIYGSACLTVAALSSLLGGGVLQGSFTVM
          **************   ******* ****** ****************************

rNIS  421 GVISGPLLGAFTLGMLLPACNTPGVLSGLAAGLAVSLWVAVGATLYPPGEQTMGVLPTSA
hNIS  421 GVISGPLLGAFILGMFLPACNTPGVLAGLGAGLALSLWVALGATLYPPSEQTMRVLPSSA
          *********** *** ********** ** **** ***** ******* **** *** **

rNIS  481 AGCT----NDSVLLGPPGA-TNASNGIPSSGMDTGRPALADTFYAISYLYYGALGTLTTM
hNIS  481 ARCVALSVNASGLLDPALLPANDSSRAPSSGMDASRPALADSFYAISYLYYGALGTLTTV
          * *     * * ** *     * *   ******  ****** ****************

rNIS  536 LCGALISYLTGPTKRSSLGPGLLWWDLARQTASVAPKEDTATLEESLVKGPEDIPAVTKK
hNIS  541 LCGALISCLTGPTKRSTLAPGLLWWDLARQTASVAPKEEVAILDDNLVKGPEELPTGNKK
          ******* ******** * ******************  * *   ******  *   **

rNIS  596 PPGLKPGAETHPLYLG---------------HDA-----ETNL
hNIS  601 PPGFLPTNEDRLFFLGQKELEGAGSWTPCVGHDGGRDQQETNL
          ***  *  *     **               **      ****
```

Literaturverzeichnis

[1] J. Acosta, R. Chitkara, F. Khan, V. Azueta und L. Silver, *Clin Nucl Med* **7** (1982), 368.

[2] T. Akiyama, J. Ishida, S. Nakagawa, H. Ogawara, S. Watanabe, N. Itoh, M. Shibuya und Y. Fukami, *J Biol Chem* **262** (1987), 5592.

[3] F. Arturi, E. Ferretti, I. Presta, T. Mattei, A. Scipioni, D. Scarpelli, R. Bruno, L. Lacroix, E. Tosi, A. Gulino, D. Russo und S. Filetti, *J Clin Endocrinol Metab* **90** (2005), 2321.

[4] W.H. Beierwaltes, *Semin Nucl Med* **9** (1979), 151.

[5] E. Bell und F. Grünwald: *Radiojodtherapie*. Springer, 1999.

[6] T.T. Bolliger, R.L. Witcofski, J.E. Whitley und C.D. Maynard, *J Nucl Med* **6** (1965), 687.

[7] G. Dai, O. Levy und N. Carrasco, *Nature* **379** (1996), 458.

[8] P. Deetjen und E.J. Speckmann: *Physiologie*. Urban und Fischer, 1999.

[9] O. Dohan, A. De la Vieja und N. Carrasco, *Mol Endocrinol* **20** (2006), 1121.

[10] O. Dohan, A. De la Vieja, V. Paroder, C. Riedel, M. Artani, M. Reed, C.S. Ginter und N. Carrasco, *Endocr Rev* **24** (2003), 48.

[11] S. Eskandari, D.D. Loo, G. Dai, O. Levy, E.M. Wright und N. Carrasco, *J Biol Chem* **272** (1997), 27230.

[12] E.R. Fearon und B. Vogelstein, *Cell* **61** (1990), 759.

[13] M. Fernandez-Ulloa, H.R. Maxon, S. Mehta und L.J. Sholiton, *JAMA* **236** (1976), 857.

[14] R. Fodde, W. Edelmann, K. Yang, C. van Leeuwen, C. Carlson, B. Renault, C. Breukel, E. Alt, M. Lipkin und P.M. Khan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **91** (1994), 8969.

[15] R.C. Gardner, P.A. Kantrowitz und H.L. Chandler, *Clin Nucl Med* **9** (1984), 577.

[16] I.R. Gibbons, M.P. Cosson, J.A. Evans, B.H. Gibbons, B. Houck, K.H. Martinson, W.S. Sale und W.J. Tang, *Proc Natl Acad Sci U S A* **75** (1978), 2220.

[17] J.H. Hanke, J.P. Gardner, R.L. Dow, P.S. Changelian, W.H. Brissette, E.J. Weringer, B.A. Pollok und P.A. Connelly, *J Biol Chem* **271** (1996), 695.

[18] M.T. Hays, *Thyroid* **3** (1993), 31.

[19] K.P. Janssen, P. Alberici, H. Fsihi, C. Gaspar, C. Breukel, P. Franken, C. Rosty, M. Abal, F. El Marjou, R. Smits, D. Louvard, R. Fodde und S. Robine, *Gastroenterology* **131** (2006), 1096.

[20] K.P. Janssen, F. el Marjou, D. Pinto, X. Sastre, D. Rouillard, C. Fouquet, T. Soussi, D. Louvard und S. Robine, *Gastroenterology* **123** (2002), 492.

[21] S. Kim, H.J. Shin, S.Y. Kim, J.H. Kim, Y.S. Lee, D.H. Kim und M.O. Lee, *Mol Cell Endocrinol* **220** (2004), 51.

[22] K.A.B. Knostman, J.Y. Cho, K.Y. Ryu, X. Lin, J.A. McCubrey, T. Hla, C.H. Liu, E. Di Carlo, R. Keri, M. Zhang, D.Y. Hwang, W.C. Kisseberth, C.C. Capen und S.M. Jhiang, *J Clin Endocrinol Metab* **89** (2004), 5196.

[23] T. Kogai, T. Endo, T. Saito, A. Miyazaki, A. Kawaguchi und T. Onaya, *Endocrinology* **138** (1997), 2227.

[24] T. Kogai, Y. Kanamoto, L.H. Che, K. Taki, F. Moatamed, J.J. Schultz und G.A. Brent, *Cancer Res* **64** (2004), 415.

[25] T. Kogai, K. Taki und G.A. Brent, *Endocr Relat Cancer* **13** (2006), 797.

[26] T. Kreutzig: *Kurzlehrbuch Biochemie*. 10. Auflage. Urban und Fischer, 2000.

[27] L. Lacroix, C. Mian, B. Caillou, M. Talbot, S. Filetti, M. Schlumberger und J.M. Bidart, *Eur J Endocrinol* **144** (2001), 297.

[28] K. Lathrop und P. Harper, *J Nucl Med* **9** (1968), 332.

[29] M. Lejeune, C. Heron, F. Tenenbaum, P.O. Sarfati, A. Louvel, J.P. Luton und B. Richard, *Presse Med* **29** (2000), 1345.

[30] A. Levitzki und A. Gazit, *Science* **267** (1995), 1782.

[31] O. Levy, A. De la Vieja, C.S. Ginter, C. Riedel, G. Dai und N. Carrasco, *J Biol Chem* **273** (1998), 22657.

[32] B. Liu, J. Herve, P. Bioulac-Sage, Y. Valogne, J. Roux, F. Yilmaz, R. Boisgard, C. Guettier, P. Cales, B. Tavitian, D. Samuel, J. Clerc, C. Brechot und J. Faivre, *Gastroenterology* **132** (2007), 1495.

[33] D. Marine und H. Feiss, *J Pharmacol Exp Ther* **7** (1915), 557.

[34] L.D. Marinelli, E.H. Quinby und G.J. Hine, *Am J Roentgenol* **59** (1948), 260.

[35] I.R. McDougall, *Clin Nucl Med* **20** (1995), 869.

[36] T. Misaki, R. Takeuchi, S. Miyamoto, K. Kasagi, Y. Matsui und J. Konishi, *J Nucl Med* **35** (1994), 474.

[37] D.H. Moon, S.J. Lee, K.Y. Park, K.K. Park, S.H. Ahn, M.S. Pai, H. Chang, H.K. Lee und I.M. Ahn, *Nucl Med Biol* **28** (2001), 829.

[38] M. Ohno, M. Zannini, O. Levy, N. Carrasco und R. di Lauro, *Mol Cell Biol* **19** (1999), 2051.

[39] G.A. Orner, W.M. Dashwood, C.A. Blum, G.D. Diaz, Q. Li, M. Al-Fageeh, N. Tebbutt, J.K. Heath, M. Ernst und R.H. Dashwood, *Mutat Res* **506-507** (2002), 121.

[40] N. Osherov, A. Gazit, C. Gilon und A. Levitzki, *J Biol Chem* **268** (1993), 11134.

[41] D.D. Patton und R.T. Crenshaw, *J Nucl Med* **8** (1967), 394.

[42] D.D. Patton und D.B. Hertsgaard, *J Nucl Med* **17** (1976), 116.

[43] R. Perez-Soler, *Oncologist* **9** (2004), 58.

[44] G. Powis, R. Bonjouklian, M.M. Berggren, A. Gallegos, R. Abraham, C. Ashendel, L. Zalkow, W.F. Matter, J. Dodge und G. Grindey, *Cancer Res* **54** (1994), 2419.

[45] C. Riedel, O. Levy und N. Carrasco, *J Biol Chem* **276** (2001), 21458.

[46] J.A. Rillema und C. Marting, *Proc Soc Exp Biol Med* **219** (1998), 37.

[47] S.C. Rockwell, R.F. Kallman und L.F. Fajardo, *J Natl Cancer Inst* **49** (1972), 735.

[48] P. Shen, M.H. Liu, T.Y. Ng, Y.H. Chan und E.L. Yong, *J Nutr* **136** (2006), 899.

[49] P.A. Smanik, Q. Liu, T.L. Furminger, K. Ryu, S. Xing, E.L. Mazzaferri und S.M. Jhiang, *Biochem Biophys Res Commun* **226** (1996), 339.

[50] P.A. Smanik, K.Y. Ryu, K.S. Theil, E.L. Mazzaferri und S.M. Jhiang, *Endocrinology* **138** (1997), 3555.

[51] C. Spitzweg, W. Joba, W. Eisenmenger und A.E. Heufelder, *J Clin Endocrinol Metab* **83** (1998), 1746.

[52] C. Spitzweg, W. Joba, K. Schriever, J.R. Goellner, J.C. Morris und A.E. Heufelder, *J Clin Endocrinol Metab* **84** (1999), 4178.

[53] S. Tanosaki, T. Ikezoe, A. Heaney, J.W. Said, K. Dan, M. Akashi und H.P. Koeffler, *Breast Cancer Res Treat* **79** (2003), 335.

[54] A.T.J. Taylor, N. Alazraki und J.E. Henry, *J Nucl Med* **17** (1976), 470.

[55] U.H. Tazebay, I.L. Wapnir, O. Levy, O. Dohan, L.S. Zuckier, Q.H. Zhao, H.F. Deng, P.S. Amenta, S. Fineberg, R.G. Pestell und N. Carrasco, *Nat Med* **6** (2000), 871.

[56] D. Toullec, P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier und F. Loriolle, *J Biol Chem* **266** (1991), 15771.

[57] D.D. Vadysirisack, E.S.W. Chen, Z. Zhang, M.D. Tsai, G.D. Chang und S.M. Jhiang, *J Biol Chem* **282** (2007), 36820.

[58] J. Van Sande, C. Massart, R. Beauwens, A. Schoutens, S. Costagliola, J.E. Dumont und J. Wolff, *Endocrinology* **144** (2003), 247.

[59] L. Vayre, J.C. Sabourin, B. Caillou, M. Ducreux, M. Schlumberger und J.M. Bidart, *Eur J Endocrinol* **141** (1999), 382.

[60] S. Venturi und M. Venturi, *Eur J Endocrinol* **140** (1999), 371.

[61] I.L. Wapnir, M. Goris, A. Yudd, O. Dohan, D. Adelman, K. Nowels und N. Carrasco, *Clin Cancer Res* **10** (2004), 4294.

[62] I.L. Wapnir, M. van de Rijn, K. Nowels, P.S. Amenta, K. Walton, K. Montgomery, R.S. Greco, O. Dohan und N. Carrasco, *J Clin Endocrinol Metab* **88** (2003), 1880.

[63] S.J. Weiss, N.J. Philp, F.S. Ambesi-Impiombato und E.F. Grollman, *Endocrinology* **114** (1984), 1099.

[64] S.J. Weiss, N.J. Philp und E.F. Grollman, *Endocrinology* **114** (1984), 1090.

[65] S.Y. Wu, J. Kollin, E. Coodley, T. Lockyer, K.P. Lyons, E. Moran, L.N. Parker und A.C. Yu, *J Nucl Med* **25** (1984), 1204.

[66] H. Zipper, H. Brunner, J. Bernhagen und F. Vitzthum, *Nucleic Acids Res* **32** (2004), e103.

Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die fachliche und persönliche Unterstützung vieler weiterer Personen nicht möglich gewesen.

- Zu aller erst möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, bei meinen Eltern **Gisela und Wolfgang** für die *lang*jährige Unterstützung während der Doktorarbeit und des Medizinstudiums. Herzlicher Dank geht auch an meinen Bruder **Andreas** und seiner Frau **Andrea** für das Korrekturlesen der Arbeit.

- Meinem Doktorvater **Dr. Markus Essler** möchte ich besonderen Dank aussprechen für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe forschen zu können. Neben dieser Arbeit sind während dieser Zeit auch weitere Veröffentlichungen entstanden. Insbesondere habe ich sehr viel über die Molekularbiologie gelernt und damit eine Grundlage für weitere wissenschaftliche Arbeiten erhalten. Ich hoffe, dass wir auch in Zukunft bei weiteren Projekten zusammenarbeiten können. Auch habe ich meiner Zeit im Forschungslabor zu verdanken, dass ich letztendlich die Nuklearmedizin als Fachgebiet für meine weitere ärztliche Tätigkeit entdeckt habe.

- Ich konnte vieles von **Philipp Aubele, Enken Drecoll, Jan Müller, Caroline Schultheiss und Mario Vallon**, den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe lernen, wir hatten viele interessante Diskussionen und die Zeit mit euch hat mir viel Spaß gemacht. Ich freue mich schon auf unseren nächsten gemeinsamen Ausflug.

- Der technischen Assistentin unserer Arbeitsgruppe **Birgit Blechert** möchte ich besonderen Dank aussprechen für die vielen, vielen Stunden die wir im Labor verbracht haben mit Mäusen, Biodistributionen und Zellkultur. Ohne Dich wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

- Herrn **Prof. Markus Schwaiger**, Direktor der Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum Rechts der Isar in München, möchte ich meinen Dank aussprechen, dass ich in seiner Klinik die Versuche dieser Arbeit durchführen konnte. Mein Dank geht auch an die Leiterin des RIA-Labors, Frau **Prof. Reingard Senekowitsch-Schmidtke**, für viele Tipps und lehrreiche Diskussionen und ich hoffe auch nach dieser Arbeit auf eine gute Zusammenarbeit.

- Ohne **Dr. Klaus-Peter Janssen** aus der Forschergruppe der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar wären große Teile dieser Arbeit nicht möglich gewesen,

vor allem möchte ich mich für die cDNA der transgenen Mausmodelle bedanken. Insbesondere möchte ich mich auch bei **Franziska Rohde** bedanken für die Anleitung bei der Durchführung und Auswertung der real-time PCR.

- Herzlicher Dank geht an **Dr. Dietrich Doll** aus der Chirurgie am Klinikum rechts der Isar, dass ich Proben der cDNA-Bank der humanen kolorektalen Karzinome auswerten konnte, und an **Prof. Aurel Perren** aus der Pathologie für die Erstellung und freundliche Überlassung der mikroskopischen Aufnahme der Schilddrüsenhistologie.

- Bei **Dr. Christof Seidl** aus der Arbeitsgruppe von Prof. Senekowitsch-Schmidtke möchte ich mich für viele Tipps und Hilfestellungen bei molekularbiologischen Fragestellungen und Techniken bedanken, sowie bei **Birgit Pfost** für Anleitung und Hilfestellung bei der Mäusehaltung und Narkose.

Lebenslauf

Florian Christoph Gärtner, geboren am 17.10.1978 in München, ledig

1985 – 1989	Grundschule, Petershausen
1989 – 1998	Ignaz-Taschner-Gymnasium, Dachau
Juni 1998	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1998 – 1999	Zivildienst, Malteser Hilfsdienst, Dachau
09/99 – 08/00	Studium der Humanmedizin, Fachsemester 1 – 2, TU München
09/00 – 08/01	Studium der Humanmedizin, Fachsemester 3 – 4, LMU München
09/01 – 08/04	Studium der Humanmedizin, Fachsemester 5 – 10, TU München
09/04 – 10/05	Praktisches Jahr: Nuklearmedizin, Innere Medizin, Chirurgie
November 2005	Ärztliche Prüfung Erteilung der Approbation
seit April 2006	Promotionsstudium Medizin, LMU München Thema: Untersuchungen über die endogene Expression und Regulation des Natrium-Iodid-Symporters (NIS) in extrathyreoidalen Tumoren in vitro und in vivo
seit April 2007	Assistenzarzt, Klinikum rechts der Isar, TU München In Weiterbildung zum Facharzt für Nuklearmedizin