

**Aus der Abteilung für Molekulare Innere Medizin der  
Medizinischen Poliklinik  
der Universität Würzburg**

Leiter: Professor Dr. Harald Wajant

**Expression und Regulation von Selenoproteinen in der humanen  
onkozytären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie XTC.UC1**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

**Marianne Menth**

aus Oellingen

Würzburg, Januar 2004

Referent: Prof. Dr. Josef Köhrle

Koreferent: Prof. Dr. Christoph Reiners

Dekan: Prof. Dr. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 2004

Die Promovendin ist Ärztin.

# INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
1.1	Schilddrüsenzellen und ihre Funktion.....	1
1.2	Karzinome der Schilddrüse.....	3
1.2.1	Hürthle-Zell-Karzinome.....	6
1.3	Oxidativer Stress und Antioxidantien.....	8
1.4	Selen.....	10
1.5	Selenoproteine.....	11
1.5.1	Glutathionperoxidasen.....	12
1.5.2	Thioredoxin-Reduktasen.....	14
1.5.3	Deiodasen.....	15
1.5.4	Selenoprotein P.....	17
1.5.5	Hierarchie der Selenverteilung.....	19
1.6	Retinsäure.....	21
1.7	Fragestellung.....	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Geräte.....	24
2.2	Materialien.....	25
2.2.1	Lösungen und Puffer.....	25
2.2.2	XTC.UC1-Zellen.....	25
2.2.3	Computersoftware und Statistik.....	26
2.3	Methoden.....	26
2.3.1	Zellkultur.....	26
2.3.2	Gewinnung der Zellhomogenate:.....	27
2.3.3	Gewinnung der Proteinkonzentrate aus Kulturmedium.....	28
2.3.4	Protein-Bestimmungen.....	28
2.3.5	Aktivitätsbestimmung der Glutathionperoxidasen.....	28
2.3.6	Aktivitätsbestimmung der Thioredoxinreduktasen.....	29
2.3.7	Aktivitätsbestimmung der Deiodase-Isoenzyme.....	30
2.3.8	Western-Blot.....	32
2.3.9	RT-PCR.....	36
3	Ergebnisse.....	40
3.1	Nachweis von Selenoproteinen in XTC-Zellen nach Stimulation mit Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> - bzw. all-trans-Retinsäure.....	40
3.1.1	Glutathionperoxidaseaktivitäten.....	40
3.1.2	Thioredoxinreduktaseaktivitäten.....	46
3.1.3	5'-Deiodase Typ 1-Aktivitäten.....	53
3.1.4	Selenoprotein P.....	59
3.2	Ergebnisse der RT-PCR.....	60
3.2.1	GAPDH und β-Aktin.....	60
3.2.2	Glucose-Transporter Typ 1.....	61
3.2.3	Thyreoglobulin, TSH-Rezeptor und Natrium-Iodid-Symporter.....	62
3.2.4	RA-Rezeptoren.....	63
3.2.5	Deiodasen.....	64

4	Diskussion .....	65
4.1	Selen und die Schilddrüse.....	65
4.2	Expression von Selenoenzymen mit antioxidativer Funktion .....	65
4.2.1	Expression zellulärer Selenoenzyme mit antioxidativer Funktion.....	65
4.2.2	Expression sezernierter Selenoenzyme mit antioxidativer Funktion .....	68
4.3	Einfluss von Passagenzahl und Retinsäure auf die Expression der 5'DI .....	71
4.4	Hierarchie der Selenoenzyme .....	72
4.5	Expression schilddrüsentypischer Marker.....	74
4.6	Expression von Retinsäure-Rezeptoren der RAR-Familie.....	75
5	Zusammenfassung .....	77

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5'DI	5'Deiodase Typ I
5'DII	5'Deiodase Typ II
FTC	follikuläres Schilddrüsenkarzinom
GPx	Glutathionperoxidase
cGPx	cytosolische Glutathionperoxidase
pGPx	plasmatische Glutathionperoxidase
GI-GPx	gastrointestinale Glutathionperoxidase
PH-GPx	Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase
NIS	Natrium-Iodid-Symporter
PTC	papilläres Schilddrüsenkarzinom
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SECIS	Selenocystein Insertion Sequence
SePP	Selenoprotein P
Tg	Thyreoglobulin
TPO	Thyroperoxidase
TrxR	Thioredoxinreduktase
XTC	XTC.UC1 (Hürthle-Karzinom-Zelllinie)



# 1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

## 1.1 SCHILDDRÜSENZELLEN UND IHRE FUNKTION

Die Schilddrüse besteht aus zwei ovalen Gewebelappen, die durch eine Brücke, den Isthmus, verbunden sind und hat eine Masse von etwa 18 bis 25 g. Histologisch ist sie aus Follikeln aufgebaut, die jeweils einen Hohlraum umfassen. Dieser ist von einem einschichtigen Epithel ausgekleidet und mit Kolloid gefüllt, einer glasigen Masse, die zum Großteil aus Thyreoglobulin besteht. Das Epithel wird von den Schilddrüsenzellen, den Thyrozyten, gebildet, die zur Ausübung ihrer Funktion eine polare Struktur aufweisen: An der basalen Plasmamembran sind der Natrium-Iodid-Symporter zur Iodidaufnahme und der TSH-Rezeptor zum Empfang von übergeordneten Hormonsignalen aus der Hypophyse lokalisiert, an der apikalen Membran werden die beiden Schilddrüsenhormone Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3) an Thyreoglobulin (Tg) als Matrix gebildet. Die noch immer in der Polypeptidkette des Tg gebundenen Hormone werden ins Kolloid im Inneren der Follikel abgegeben und gespeichert. In den sogenannten parafollikulären oder C-Zellen, die disseminiert zwischen den Follikeln liegen, wird Calcitonin hergestellt, das den Calciumstoffwechsel beeinflusst [1, 2].

Essenziell für die Synthese der Schilddrüsenhormone ist das Spurenelement Iod. Dieses wird als Iodid-Anion  $I^-$  an der basolateralen Membran über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) aus dem Blut in die Schilddrüsenzelle aufgenommen und etwa 50- bis 100-fach angereichert. Über Stimulation durch TSH kann diese Anreicherung weiter gesteigert werden. Andere Anionen hemmen die Aufnahme von  $I^-$ , wie zum Beispiel  $ClO_4^-$ ,  $SCN^-$ ,  $TcO_4^-$ . Der Iodid-Transport in die Zelle erfolgt in einem energieverbrauchenden Prozess: Unter Hydrolyse von ATP baut die ebenfalls basolateral lokalisierte  $Na^+-K^+$ -ATPase einen  $Na^+$ -Gradienten auf. Durch Kopplung an den darauf erfolgenden Wiedereinstrom von  $Na^+$  in die Zelle wird der Transport von Iodid gegen den elektrochemischen Gradienten energetisch ermöglicht.

An der apikalen Membran wird Iodid durch den Halogenid-Transporter Pendrin in das Kolloid des Follikellumens abgegeben. Auch Thyreoglobulin wird nach Transport durch sekretorische Vesikel hierhin sezerniert. Für die Hormonsynthese muss Iodid zunächst oxidiert werden, um dann auf die Tyrosinreste des Thyreoglobulins in 3'- oder

5'-Position des Phenolrings übertragen zu werden. Auf diese Weise entstehen an der Proteinkette die beiden hormonell inaktiven Komponenten Monoiod- und Diiodtyrosin. Anschließend werden zwei iodierter Tyrosylreste zu Triiodthyroninen und Tetraiodthyroninen gekoppelt: Die Speicherform der Schilddrüsenhormone T3 bzw. T4 in Tg-gebundener Form ist fertig. Beide Schritte werden von der Thyroperoxidase (TPO) katalysiert. Die Reaktion wird durch TSH stimuliert und durch antithyreoidale Pharmaka (die meist Peroxidase-Inhibitoren sind und eine intrinsische reduzierende Aktivität haben), sowie durch hohe Dosen von Iod (Wolff-Chaikoff-Effekt) gehemmt [2].

Ferner benötigt die TPO für diesen Schritt als Elektronenakzeptor  $H_2O_2$ , welches von zwei kürzlich beschriebenen NADPH-Oxidasen erzeugt wird, ThOX1 und ThOX2. Bei ThOX1 und ThOX2 handelt es sich um Flavoproteine mit vermuteten Bindungsstellen für FAD sowie für NADPH. Dieses und andere reduzierte Purinnukleotide sowie  $Ca^{2+}$  werden als essenzielle Kofaktoren benötigt. Funktionelle Untersuchungen zeigen, dass die beiden Enzyme zusammen mit zwei anderen zur Hormonsynthese notwendigen Komponenten, Pendrin und TPO, an der apikalen Plasmamembran verankert sind. Die Produktion von  $H_2O_2$  stellt dabei den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar [3].

Zur Ausschüttung von Schilddrüsenhormon in den Blutstrom, ebenfalls von TSH stimuliert, wird Tg durch rezeptorvermittelte Endozytose aus dem Kolloid wieder in die Schilddrüsenzelle aufgenommen. In Phagolysosomen wird es dann unter Freisetzung von T3 und T4 durch Proteasen hydrolysiert.

Im Plasma liegen die Schilddrüsenhormonmoleküle zum ganz überwiegenden Teil als T4, zu einem geringen Anteil auch als T3 vor und sind dort an drei verschiedene Proteine gebunden: Thyroxinbindendes Globulin, Transthyretin (Thyroxinbindendes Präalbumin) und Serumalbumin. Freies Schilddrüsenhormon liegt nur in Spuren vor. Die Wirkform der Schilddrüsenhormone im Organismus ist T3. Allerdings stammt das im Blut zirkulierende T3 nur zu 20 % aus der Schilddrüse, mindestens 80 % entstehen peripher durch Iodabspaltung von T4 in 5'-Stellung. Dieser Schritt wird durch die 5'-Deiodasen Typ I und Typ II katalysiert. Für eine Reihe von Zellen wurde gezeigt, dass die Aufnahme der Hormone in die Zelle über ein  $Na^+$ -abhängiges oder ATP-verbrauchendes Transport-System erfolgt. In vielen Geweben konnten außerdem



cytosolische Bindungsproteine identifiziert werden, und einige Studien legen unterschiedliche Bindungsproteine für T3 und T4 nahe [4].

Der intrazelluläre Wirkort von T3 ist überwiegend die DNA des Zellkerns, wo es die Transkription beeinflusst. T3 übt die meisten seiner Funktionen über Kernrezeptoren der c-erbA-Familie aus, die wiederum als Liganden-modulierte Transkriptionsfaktoren agieren (TR $\alpha$ 1, TR $\beta$ 1, TR $\beta$ 2). Dies tun sie entweder zusammen mit Liganden-unabhängigen TR-Varianten (TR $\alpha$ 2 oder rev-erbA) oder durch Bildung von Heterodimeren mit Retinsäure-Rezeptoren. Auch in Mitochondrien und an der Plasmamembran wurden funktionelle T3-Rezeptoren bzw. direkte Schilddrüsenhormonwirkungen nachgewiesen [5]. Unter T3-Wirkung vermehren sich, wahrscheinlich sekundär, sowohl die Anzahl der Mitochondrien als auch ihre Cristae, was die Basis der stoffwechselsteigernden Wirkung von T3 darstellt. Allgemein erhöht sich der O<sub>2</sub>-Verbrauch bei vermehrtem Energieumsatz und damit auch die Wärmeproduktion. T3 besitzt außerdem eine permissive Wirkung gegenüber Adrenalin und erhöht wahrscheinlich auch die Dichte der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren am Myokard. Während der Entwicklung fördert es Wachstum und Reifung, vor allem von Knochen und Gehirn [6].

## **1.2 KARZINOME DER SCHILDDRÜSE**

Nach der WHO-Klassifikation werden maligne Neoplasien der Schilddrüse in Karzinome, Sarkome, Lymphome und Metastasen unterteilt. Am häufigsten sind dabei die Karzinome, die man in vier Untergruppen unterteilt:

- das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC),
- das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FTC),
- das anaplastische Schilddrüsenkarzinom,
- und das medulläre Schilddrüsenkarzinom.

Das papilläre und das follikuläre Schilddrüsenkarzinom können auch als differenziertes Schilddrüsenkarzinom zusammengefasst werden.

Die Angaben über Häufigkeitsverteilungen schwanken, jedoch kann man davon ausgehen, dass 60 bis 80 % der Karzinome ein papilläres Wachstumsmuster zeigen. Zur Dia-

gnosestellung stützt man sich zusätzlich auf das Vorhandensein von Psammomkörpern und charakteristischen nukleären Veränderungen. Exposition gegenüber radioaktiver Strahlung, vor allem während der Kindheit, stellt einen wichtigen Risikofaktor dar. Der Metastasierungsweg ist hauptsächlich lymphogen.

Follikuläre Schilddrüsenkarzinome stellen zwischen 20 und 30 % der Schilddrüsenkarzinome dar. Entscheidend für die Diagnose ist eine Invasion von Kapsel oder Gefäßen, und das Fehlen von für papilläre Karzinome typischen Veränderungen. Sie kommen gehäuft in höherem Lebensalter und in Iodmangelgebieten vor und metastasieren vorwiegend hämatogen.

Anaplastische Karzinome sind niedrig differenziert und hochaggressiv, haben aber noch Anzeichen einer epithelialen Differenzierung. Das umgebende Gewebe zeigt bei der histologischen Untersuchung oft gutartige Tumoren oder hochdifferenzierte Karzinome. Derartige Befunde weisen auf eine Transformation des gutartigen Tumors bzw. des hochdifferenzierten Karzinoms zu einem anaplastischen Karzinom hin. Therapeutisch werden externe Bestrahlung in Kombination mit Chemotherapie versucht. Die Prognose ist infaust.

Während die drei genannten Tumorarten aus den Follikelzellen der Schilddrüse entstehen, stammen medulläre Schilddrüsenkarzinome von den Calcitonin-produzierenden C-Zellen der Schilddrüse ab. Sie kommen entweder sporadisch oder im Rahmen einer Multiplen Endokrinen Neoplasie 2A oder 2B familiär vor. Die Behandlungsmöglichkeiten für diese Karzinome sind jedoch ebenfalls begrenzt. Mittel der Wahl ist die operative Resektion. Radio- oder Chemotherapie sind von unsicherem therapeutischem Nutzen [7, 8, 9].

Therapeutische Optionen für differenzierte Schilddrüsenkarzinome sind in erster Linie die totale oder subtotale Entfernung der Schilddrüse und von Lymphknotenmetastasen sowie meist eine Radioiodtherapie. Zur Rezidivprophylaxe wird oft eine Suppressions-therapie mit Thyroxin angeschlossen, um die TSH-Produktion über den hypothalamischen und hypophysären Feedback-Regelkreis zu inhibieren und damit eine Stimulation der Proliferationsrate von restlichem Schilddrüsengewebe oder Metastasen zu verhindern. Externe Bestrahlung oder Chemotherapie hingegen sind weniger wirksam.

In 30 % der Fälle beobachtet man jedoch im Verlauf eine Entdifferenzierung dieser Karzinome, gekennzeichnet durch einen Verlust schilddrüsenpezifischer Funktionen und Eigenschaften wie beispielsweise Iodidaufnahme (durch Verlust des NIS) und Regulation der Zellproliferation durch verschiedene TSH-Spiegel (durch Verlust des TSH-Rezeptors). Verbunden damit ist der Wegfall oben genannter Therapieoptionen und die Gefahr eines Übergangs des Tumors in ein anaplastisches Karzinom. Die Suche nach alternativen Behandlungsstrategien ist deshalb unabdingbar. Große Hoffnungen werden in Gen- und Immuntherapie gesetzt. Einen anderen neuen therapeutischen Ansatz bei entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen stellt die Redifferenzierungstherapie mit Retinsäure dar. Dabei werden die wachstumshemmenden und differenzierungsfördernden Eigenschaften der Retinsäure ausgenutzt, die auch in der Behandlung anderer Malignome erfolgreich eingesetzt werden. In vitro-Studien zeigen einen Einfluss der Retinsäure auf Wachstum, schilddrüsenpezifische Funktionen und Metastasierungspotenzial, der als partielle Redifferenzierung gewertet werden kann. Beispiele sind Differenzierungsparameter wie Typ 1-Deiodase, NIS-mRNA und Iodidaufnahme sowie ICAM -1 und CD 97 [10, 11, 12].

In einer multizentrischen klinischen Studie wurden 50 Patienten evaluiert, die an einem wenig differenzierten, inoperablen Schilddrüsenkarzinom mit fehlender bzw. unzureichender Iodidaufnahme litten. Die Patienten wurden oral mit Retinsäure behandelt, um das Redifferenzierungspotenzial sowie die Möglichkeiten, sie dann wieder einer Radioiodtherapie zuzuführen, zu untersuchen. Von 50 Patienten zeigten während der Nachsorge 12 (24 %) einen Abfall und 8 (16 %) ein stabiles Niveau an Tg. Die Aufnahme von radioaktivem Iod nahm bei 21 von 50 Patienten (42 %) zu, davon bei 13 Patienten sehr deutlich, und blieb bei 29 Patienten unverändert. Bei 6 von 37 Patienten (16 %) nahm die Tumorgröße ab, bei 22 von 37 Patienten (59 %) nahm sie zumindest nicht weiter zu. Gestützt auf die eben beschriebenen Parameter zeigten 20 % der Patienten eine Besserung und 18 % einen stabilen Krankheitsverlauf, insgesamt 19 Patienten [13].

Von 20 dieser Patienten, die zu einem früheren Zeitpunkt evaluiert worden waren, litten 8 an einem FTC, 7 an einem PTC und 5 an einem oxyphilen Schilddrüsenkarzinom. Ein Tumortyp-spezifisches Ansprechen auf die Therapie konnte nicht beobachtet werden. Von 8 Patienten, deren Iodidaufnahme wieder anstieg, litten 3 Patienten an einem FTC,

3 an einem PTC und 2 an einem oxyphilen Schilddrüsenkarzinom. Alle diese Patienten zeigten vorher einen langjährigen fortschreitenden Verlauf ohne Ansprechen auf andere Therapieoptionen [14].

### **1.2.1 Hürthle-Zell-Karzinome**

Hürthle-Zell-Tumoren sind Schilddrüsentumoren, die ausschließlich oder vorwiegend aus Hürthle-Zellen bestehen (auch onkozytäre oder oxyphile Zellen genannt, vor allem in anderen Organen). Meist findet man Hürthle-Zellen in lange bestehenden Basedow-Strumen, Autoimmun-Thyreoiditiden, strahlengeschädigten Schilddrüsen, Neoplasmen und adenomatösen Knoten. Generell kommen oxyphile Zellen in endokrinen Drüsen, Speicheldrüsen, Niere und anderen parenchymatösen Organen vor, weniger dagegen im Gastrointestinal- und Respirationstrakt. Dies lässt vermuten, dass diese Zellen vorwiegend in Geweben oder Tumoren mit niedrigem Zellumsatz vorkommen [8, 15].

Die Zellen sind in der Regel vergrößert, pleomorph und polygonal und besitzen aufgrund ihres hohen Gehalts an hypertrophierten Mitochondrien ein granuläres, eosinophiles Zytoplasma. Trotz des hohen Gehalts an oxidativen Enzymen mit aktivem Stoffwechsel scheint die Zelleistung jedoch nicht adäquat, und zumindest in der Schilddrüse weisen onkozytäre Zellen vermindertes Gesamtprotein und Thyreoglobulin auf, eine reduzierte Deiodase- und Iodierungsaktivität sowie eine verringerte Iodaufnahme. Die Kerne sind groß, hyperchromatisch und bizarr geformt mit prominentem Nukleolus. Zytogenetische Veränderungen sowie Veränderungen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen sind weitgehend organspezifisch, das heißt, sie haben mehr Gemeinsamkeiten mit nicht-oxyphilen Tumoren des entsprechenden Organs als mit oxyphilen Tumoren anderer Organe. In der Schilddrüse verhalten sie sich meist ähnlich wie follikuläre Tumoren. Allerdings können auch papilläre und sogar medulläre Tumoren aus Hürthle-Zellen aufgebaut sein. Morphologisch sind medulläre Hürthle-Zellen von solchen follikulären Ursprungs nicht zu unterscheiden, ebenso wie die morphologische Unterscheidung zwischen Hürthle-Zellen der Schilddrüse und oxyphilen Zellen in anderen Organen nicht möglich ist. Genauso wenig gelingt eine morphologische oder histochemische Unterscheidung von Hürthle-Zellen in Hashimoto-Thyreoiditiden oder Knotenstrumen von adenomatösen oder karzinomatösen Hürthle-Zellen. Durch eine

Einteilung nach pathologischen Malignitätskriterien wie Invasion von Kapsel und Gefäßen lässt sich jedoch eine Vorhersage über das klinische Verhalten treffen [8, 16].

Hürthle-Zell-Tumoren zeigen sich histologisch öfter invasiv als follikuläre Neoplasmen und metastasieren sowohl hämatogen als auch lymphogen. Klinisch sind Hürthle-Zell-Karzinome im Vergleich zu follikulären oder papillären Karzinomen mit einer höheren Mortalität verbunden. Ob dies mit dem seltenen Ansprechen auf eine Radioiodtherapie von nur etwa 5 % der Patienten aufgrund der reduzierten Iod-Aufnahmekapazität oder eher mit den intrinsischen biologischen und proliferativen Eigenschaften dieser Karzinome in Zusammenhang steht, konnte bisher nicht geklärt werden. Das Vorkommen von onkozytären Zellen in einer Feinnadelaspirationsbiopsie sollte daher zur Resektion und histologischen Untersuchung des betroffenen Gewebes auf Malignität führen. Diese höhere Malignität in der Schilddrüse steht im Gegensatz zur Tendenz zur Benignität oder niedrigeren Malignität oxyphiler Tumoren anderer Organe [15, 16].

Wie oben bereits erwähnt, sind Hürthlezellen durch einen erhöhten Gehalt an Mitochondrien gekennzeichnet. Menge, Morphologie und Aktivität der mitochondrialen Enzyme können jedoch von Fall zu Fall stark variieren. Obwohl seit langem vermutet wird, dass Veränderungen in der Expression und Funktion von Proteinen, die am Energiehaushalt beteiligt sind, in der Tumorbilogie eine wichtige Rolle spielen, konnten spezifische Veränderungen in Genen, die für mitochondriale Proteine kodieren, noch nicht sicher nachgewiesen werden. Mitochondriale DNA kodiert 13 Proteine - alle essenzielle Bestandteile der Atmungskette - sowie 2 rRNAs und 22 tRNAs. Die Kontrolle der Atmungskettenfunktion liegt jedoch bei von nukleärer DNA kodierten Genen, die für über 90 % der Atmungskettenproteine verantwortlich sind, sowie für die notwendigen Enzyme für Replikation und Transkription der mitochondrialen DNA. Die mitochondriale DNA macht weniger als 1 % der totalen DNA in eukaryoten Zellen aus, besitzt aber einen eigenen genetischen Code und eine molekulare Ringstruktur ähnlich der eines Plasmids. Anders als nukleäre DNA wird sie nicht von Histonen und anderen Proteinen geschützt. Zusätzlich ist sie stärker als diese den schädlichen Einflüssen von freien Sauerstoffradikalen ausgesetzt, einem natürlichen Nebenprodukt der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung. Dies ist wahrscheinlich die Ursache der zehnfach erhöhten Rate an somatischen Mutationen im Vergleich zu nukleärer DNA.

Prinzipiell könnten diese Mutationen zu einer neoplastischen Transformation beitragen, indem sie die zelluläre Energiekapazität beeinflussen, den mitochondrialen oxidativen Stress erhöhen und/oder die Apoptose modulieren [16].

Andere Autoren beschreiben eine ungestörte Funktion der Atmungskettenenzyme, allerdings verbunden mit einem Defekt in der Kopplung der oxidativen Phosphorylierung, einem Anstieg des uncoupling protein 2 (UCP2) auf das Zweifache im Vergleich zur Kontrolle und folglich einer signifikant verminderten ATP-Synthese. Die mitochondriale Proliferation könnte daher eine Anpassungsreaktion an eine primär nukleäre Veränderung sein, d.h. an die Überexpression von UCP2. Andererseits könnte diese Überexpression eine Antwort auf die mitochondriale Proliferation sein, die als Folge einer verminderten ATP-Synthese auftritt. In diesem Fall würde die mitochondriale Proliferation zu einer Überproduktion an reaktiven Sauerstoffspezies führen, was im Gegenzug einen Anstieg des UCP2 zufolge hätte [17].

### **1.3 OXIDATIVER STRESS UND ANTIOXIDANTIEN**

In lebenden Zellen werden als Folge von Stoffwechselfvorgängen sowie aufgrund äußerer Einflüsse permanent reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet (ROS). Diese werden seit längerem aufgrund von in-vitro-Experimenten und Tierversuchen unter anderem mit oxidativen Schäden der DNA in Zusammenhang gebracht und stehen deshalb im Verdacht, die Entstehung von Krebs sowie altersbedingte degenerative Krankheiten zu begünstigen. Mögliche Angriffspunkte im Verlauf der Karzinogenese sind [18, 19]:

- Schädigung der DNA, die nicht oder falsch repariert bei der Zellteilung zu Mutationen führen kann. Betreffen diese Mutationen kritische Gene wie Onkogene oder Tumorsuppressorgene, kann dies Tumorinitiation und -progression auslösen.
- Direkte Interaktion mit Signalvorgängen und Wachstum der Zelle.
- Mitogenese durch ROS-induzierte Zellschäden und daraus resultierende Folgen.
- Durch Mitogenese erhöhtes Risiko einer klonalen Expansion von Zellen, die durch Onkogenaktivierung oder Tumorsuppressorgeninaktivierung transformiert wurden.

Die Gefahr durch Schäden durch ROS machte für lebende Zellen die Entwicklung verschiedener antioxidativer Defense-Strategien nötig. Ein Ungleichgewicht von Oxidantien und Antioxidantien, das potenziell zu Zellschäden führen kann, wird als oxidativer Stress bezeichnet. Epidemiologische Studien weisen nahezu ausnahmslos auf eine Assoziation von einer Antioxidantien-reichen Nahrung oder hohen Konzentrationen von Antioxidantien im Plasma mit vermindertem Krebsrisiko hin, vor allem was Karzinome des oberen Gastrointestinaltrakts und der Luftwege betrifft. So reduziert beispielsweise laut einer chinesischen Studie in einer spurenelementarmen Hochrisikopopulation eine Kombination von Vitamin E,  $\beta$ -Carotin und Selen das Risiko für das Auftreten von Magenkrebs [20].

Wie oben bereits erwähnt, gibt es endogene und exogene Quellen für ROS [18, 19]:

- Während der Zellatmung in den Mitochondrien unterliegt ein Teil des Sauerstoffs einem Einzelelektronentransfer, wodurch ein Superoxidanionradikal entsteht (Superoxid,  $O_2^-$ ). Zwar besitzt dieses nur eine begrenzte Reaktivität, wird aber durch Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt. Die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser wird von Katalase und Glutathionperoxidase sichergestellt. In Gegenwart von Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer jedoch wird Wasserstoffperoxid zu Hydroxylradikalen ( $OH^\cdot$ ) reduziert, den reaktivsten Sauerstoffspezies überhaupt.
- Andere körpereigene Quellen für ROS stellen die Reperfusion ischämischer Gewebe, der Arachidonsäurestoffwechsel und von Leukozyten sezernierte Stoffe wie Superoxid, Stickoxid und Hypochlorsäure, die wiederum miteinander äußerst reaktive Reaktionsprodukte wie Hydroxylradikale erzeugen.
- Wichtige exogene Quellen für ROS stellen Rauchen, Luftverschmutzung und Nahrung dar. Auch viele Karzinogene, kurzweilige ionisierende Strahlung und UV-Licht tragen ebenfalls zur Bildung von ROS bei.
- Zusätzlich zu den ROS-Quellen aus der ganz normalen Stoffwechselaktivität gibt es in Thyrozyten aufgrund der  $H_2O_2$ -Produktion während der T3/T4-Biosynthese eine

weitere Quelle für ROS. Thyrozyten sind daher in besonderem Maße einer oxidativen Belastung ausgesetzt und auf effektive Schutzsysteme angewiesen [3].

Antioxidative Defense-Systeme können die Zelle jedoch nicht völlig vor schädlichen Effekten schützen. Diese betreffen alle zellulären Strukturen, wenn auch in Hinblick auf Krebs die DNA sicher das wichtigste Ziel darstellt.

## **1.4 SELEN**

Das Element Selen wurde vor rund 200 Jahren vom schwedischen Chemiker Berzelius entdeckt und wegen seiner Farbenprächtigkeit nach der griechischen Mondgöttin, Selenene, benannt. Anfangs galt Selen als hoch giftig und kanzerogen: So zeigten beispielsweise in den 30er Jahren Studien aus der Veterinärmedizin, dass hohe Konzentrationen an Selen in der Nahrung auf Säugetiere toxisch wirken. Weitere Studien ergaben, dass auch beim Menschen bereits eine tägliche Selenzufuhr von 800 µg zu chronischen Vergiftungserscheinungen führt. Erst nach und nach kam man den positiven Seiten des Selen auf die Spur. 1957 entdeckten Schwarz und Foltz die Bedeutung des Selen als essenzielles Spurenelement. Im Bereich des Immunsystems und für den Schutz des Körpers gegen oxidative Substanzen spielt Selen als elementarer Bestandteil vieler Enzyme eine wichtige Rolle. Außerdem mehrten sich Hinweise auf eine antikanzerogene Wirkung, die Datenlage diesbezüglich ist bisher jedoch nicht eindeutig. So fand man in der norwegischen Janus-Studie eine starke Korrelation zwischen prädiagnostisch niedrigem Selen Spiegel im Serum und später diagnostiziertem Schilddrüsenkrebs [21]. In einer polnischen Studie, in der verschiedene pathologische Schilddrüsen-Gewebeproben sowie Serumproben der entsprechenden Patienten auf ihren Selengehalt untersucht wurden, ergaben sich die höchsten Serumwerte für Probanden mit gesunder Schilddrüse und die niedrigsten Gewebe-Selenkonzentrationen in Karzinomen [22, 23]. Zagrodzki et al. konnte im Rahmen einer vergleichbaren Studie diese Ergebnisse nicht bestätigen: Zwischen dem Selen- bzw. pGPx-Gehalt von Serumproben gesunder Probanden und dem von Struma- bzw. Schilddrüsenkarzinompatienten bestand kein signifikanter Unterschied. Auch die Konzentration an Selenoproteinen in benignen und malignen Schilddrüsenresektaten zeigte keine klare Korrelation mit dem Malignitätsgrad des Gewebes [24].



Definitive Klarheit über eine protektive Wirkung von Selen in Zusammenhang mit Krebs konnte somit bisher nicht geschaffen werden. Neuere Interventionsstudien geben jedoch Hinweise auf eine antikarzinogene Wirkung durch Selensupplementierung. So soll eine Selensupplementierung die Inzidenz von Lungen-, Prostata-, Kolon- und Rektumkrebs signifikant verringern [20, 25, 26]. Eine mögliche Erklärung für diese Schutzwirkung ist, dass Selenoproteine wie zum Beispiel Glutathionperoxidasen, Selenoprotein P und einige andere durch ihre Funktion im Stoffwechsel der ROS und der Redoxregulation Mutationen der DNA verhindern. Im menschlichen Körper ist die Schilddrüse das Organ mit dem höchsten Gehalt an Selen, neben Iod ein zweites für Schilddrüsenhormonbiosynthese, -aktivierung und -metabolismus notwendiges Spurenelement [22].

### **1.5 SELENOPROTEINE**

Seine biologische Wirkung übt Selen meist als Bestandteil von Proteinen, so genannten Selenoproteinen, aus. Der Einbau von Selen in Proteine erfolgt in Form der seltenen Aminosäuren Selenocystein und Selenomethionin. Dabei ist der Begriff Selenoproteine auf Proteine beschränkt, die Selenocystein enthalten [27]. Der Proteineinbau von Selenocystein, das durch das sonst als Stopcodon fungierende UGA-Triplet codiert wird, erfolgt durch eine Selenocystein-tRNA. Um einen vorzeitigen Abbruch der Synthese zu verhindern, wird dabei anstatt konventioneller Faktoren ein spezifischer Elongationsfaktor benötigt. Dieser wird nur dann aktiviert, wenn in der 3'UTR (untranslated region) der mRNA eine bestimmte Haarnadelschleife in der Sekundärstruktur der mRNA, auch als SECIS (selenocystein insertion sequence) bezeichnet, vorhanden ist [22].

Bis vor kurzem waren etwa 21 spezifische Selenoproteine in Säugetieren und Bakterien bekannt. Durch Anwendung bioinformatischer Methoden wurden nun weitere Selenoproteine in den Genomen von Mensch, Maus und Ratte entdeckt. Diese Untersuchungen ergaben unter anderem, dass das humane Selenoproteom wahrscheinlich nicht mehr als 25 Selenoproteine umfasst. 18 dieser Proteine kann eine biologische Funktion zugeordnet werden. Im Folgenden werden einige Selenoproteine näher beschrieben [28, 29].

### 1.5.1 Glutathionperoxidasen

1973 wurde Selen als essenzieller Bestandteil der cytosolischen Glutathionperoxidase identifiziert, die bis 1990 das einzige eukaryontische Selenoenzym mit bekannter Funktion blieb. Die Glutathionperoxidasen stellen eine Familie von Proteinen dar, die Aufgaben im Schutz der Biomembranen und Lipide der Zellen vor reaktiven Sauerstoffverbindungen übernimmt. Es handelt sich hierbei um genetisch unterschiedliche, antioxidativ wirksame Enzyme, mit deren Hilfe  $\text{H}_2\text{O}_2$  und andere Hydroperoxide unter Oxidation von Glutathion zu  $\text{H}_2\text{O}$  oder zu den entsprechenden Alkoholen umgesetzt werden. Mittlerweile konnten sie in allen Geweben, in denen oxidative Prozesse ablaufen, nachgewiesen werden. Die cGPx (GPx-1), pGPx (GPx-3) und GI-GPx (GPx-2) sind homotetramere Proteine. Im katalytischen Zentrum liegt pro Untereinheit (cGPx: 23 kDa, pGPx: 25 kDa, GI-GPx: 22 kDa) ein Selenocysteinrest vor. Sie setzen spezifisch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Lipid- und andere niedermolekulare Hydroperoxide um. Die PH-GPx (GPx-4) liegt als monomere Form vor und reduziert vor allem Phospholipid- und Cholesterin-Hydroperoxide. Beim Menschen gibt es noch eine weitere Selenocystein enthaltende GPx, GPx-6, über deren Funktion noch nichts Sicheres bekannt ist. Außerdem konnte in Ratten, Mäusen, Schweinen, Affen und Menschen eine Nebenhoden-spezifische GPx (GPx-5) mit über 60 % identischer Sequenz zur cytosolischen GPx identifiziert werden, die jedoch kein Selenocystein enthält. Auf die verschiedenen Enzyme soll im Folgenden einzeln eingegangen werden [29, 30, 31, 32]:

Wie oben bereits erwähnt, war die cytosolische Glutathionperoxidase (cGPx) das erste identifizierte eukaryontische Selenoprotein und wurde nachfolgend in den meisten eukaryontischen Geweben gefunden. Auch die Schilddrüse weist eine starke Expression dieses Enzyms auf, ein Organ mit hoher  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion im Rahmen der Schilddrüsenhormon-Biosynthese, das ein potentes antioxidatives Defense-System zum Schutz seiner Membranen benötigt [33]. Im Promotor des humanen cGPx-Gens wurde unter anderem die Existenz von Sauerstoff-responsiven Elementen (OREs) beschrieben, die die Genexpression abhängig vom Sauerstoffpartialdruck in der Zelle regulieren. Jedoch bewirken im Mausmodell weder eine Überexpression noch der Knockout der cGPx einen negativen Effekt auf die Entwicklung und den physiologischen Zustand der entsprechenden Tiere, auch die Expression anderer Glutathionperoxidasen wurde nicht

beeinflusst. Erst wenn die Knockout-Mäuse experimentell oxidativem Stress wie beispielsweise Myokardischämie mit anschließender Reperfusion oder Toxinen ausgesetzt werden, zeigen sich in diesen Tieren erhöhte Empfindlichkeit und deutliche Fehlfunktionen. Hingegen erweist sich Überexpression des cGPx-Gens bei transgenen Mäusen nicht als rein vorteilhaft. Zwar scheinen diese Tiere besser gegen zerebrale und myokardiale Ischämieschäden sowie bestimmte Neurotoxine geschützt zu sein, entwickeln andererseits jedoch beispielsweise unter dem Einfluss bestimmter Karzinogene schneller Hautkrebs [32].

Eine andere Isoform dieses Enzyms ist die Plasma-Glutathionperoxidase (pGPx). Sie ist dafür zuständig,  $H_2O_2$  und reaktive Sauerstoffintermediate, die durch phagozytierende Zellen oder Endothelzellen sezerniert werden, zu reduzieren. Sie ist auf DNA-Ebene zu 57 % identisch mit der cGPx und ist auf Chromosom 5q32 lokalisiert. Im SDS-Gel zeigen diese beiden Isoformen unterschiedliches Wanderungsverhalten und werden nicht von den gleichen Antikörpern erkannt. Sekretion von pGPx wurde für proximale Nieren-Tubuli nachgewiesen, von einer Reihe anderer Zellarten wurde die Produktion von pGPx aufgrund von Vorhandensein der mRNA oder der Identifizierung des Proteins vermutet, so zum Beispiel für Herz, Plazenta, Lunge, gastrointestinale Zellen und auch Schilddrüse [32, 34].

Im Magen-Darm-Trakt von Mensch und Nagetier wird ein weiteres Isoenzym exprimiert: die gastrointestinale Glutathionperoxidase (GI-GPx). Sie dient zur Reduktion von Peroxiden, die mit der Nahrung oder durch angesiedelte Mikroorganismen in den Gastrointestinaltrakt gelangen. Bei der Ratte wurde die mRNA ausschließlich im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen, beim Menschen auch in der Leber und zum Teil in Brustgewebe.

Wie oben schon erwähnt, reduziert die monomere Form der Phospholipidhydroperoxid-Glutathionperoxidase (PH-GPx) im Unterschied zur cGPx vornehmlich Phospholipid- und Cholesterin-Hydroperoxide. Ihre Hauptaufgabe besteht im Schutz von Biomembranen gegenüber Peroxidation. Neuere Ergebnisse weisen zudem auf eine DNA-Reparaturfunktion der PH-GPx hin. Das Enzym kann sowohl membrangebunden als auch im Cytosol vorliegen. Es wurde bisher in Herz, Leber und Hirn von Schweinen, in Leber und Testis von Ratten und in humaner Plazenta identifiziert. Die mRNA wird in den

meisten Geweben gefunden. Damit die PH-GPx ihre Schutzfunktion erfüllen kann, werden physiologische Konzentrationen an Vitamin E benötigt, was auf einen synergistischen Effekt der beiden antioxidativen Systeme hinweist: Vitamin E reduziert Lipidperoxid-Radikale zu Lipid-Hydroperoxiden. Diese werden von der PH-GPx reduziert, wodurch weitere radikalbildende Kettenreaktionen vermieden werden [32].

### 1.5.2 Thioredoxin-Reduktasen

Die Thioredoxin-Reduktasen (TrxR) gehören zur Flavoproteinfamilie der Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen. Zu dieser Familie gehören auch die Glutathion-Reduktasen, die reduziertes Glutathion z.B. für die Glutathionperoxidase bereitstellen. Diese Enzyme sind homodimere Proteine, die jeweils als prosthetische Gruppe ein FAD enthalten, eine NADPH-Bindungsstelle und im aktiven Zentrum ein redoxaktives Disulfid, das die Substrate nach der Elektronenübertragung reduziert. Selenocystein stellt die vorletzte Aminosäure am C-terminalen Ende dar. Entfernt oder ersetzt man es durch Cystein, so fällt die Enzymaktivität mit Thioredoxin oder Dithionitrobenzoesäure als Substrat um bis zu zwei Größenordnungen ab. Bisher sind zwei menschliche TrxRs bekannt, TrxR1 und TrxR2, die in den Mitochondrien lokalisiert ist. Das Molekulargewicht beträgt 54,6-56 kDa bzw. 56,2 kDa. In Helminthen wie z.B. *Schistosoma mansoni* wurde kürzlich eine dritte, bifunktionelle Thioredoxin-Glutathion-Reduktase (TGR) beschrieben. Das Enzym, ebenfalls ein Selenoprotein, stellt eine ungewöhnliche Fusion einer Pyridin-Nukleotid-Disulfid-Oxidoreduktase mit einer redoxaktiven Glutaredoxin-Verlängerung dar. Es zeigt TrxR-, Glutathion-Reduktase- und Glutaredoxinaktivität, was auf die Verwandtschaft der verschiedenen Redoxsysteme hinweist [35, 36].

TrxRs wurden nach ihrer Fähigkeit benannt, oxidierte Thioredoxine (Trxs) zu reduzieren, eine Gruppe kleiner ubiquitärer, redoxaktiver Peptide. Aber auch andere endogene Substrate können reduziert werden, wie zum Beispiel Lipidsäure, Lipidhydroperoxide, NK-Lysin, Vitamin K<sub>3</sub>, Dehydroascorbinsäure, das Ascorbyl-freie Radikal und das Tumorsuppressorprotein p53 (möglicherweise essenziell für dessen Funktion) sowie einige exogene Substrate. Die Hauptfunktionen der TrxR1 bestehen darin, Reduktionsäquivalente für Enzyme wie Ribonukleotid-Reduktase und Thioredoxin-Peroxidase bereitzustellen, durch Thiol-Disulfid-Austausch Cysteinreste in bestimmten Transkriptionsfaktoren zu reduzieren und dadurch die Gen-Transkription zu beeinflussen. Die TrxR2

könnte eine Rolle im Schutz der Zelle gegen mitochondrialen oxidativen Stress spielen. Für Säugetier-Thioredoxine wurden außerdem Wachstumsfaktorfunktionen und Apoptoseinhibition nachgewiesen. Auch im Schutz der Zelle gegen ROS spielt Thioredoxin eine wichtige Rolle. In Zellen, die mit ROS-bildenden Substanzen behandelt wurden, konnten sie Apoptose verhindern. Dies erklärt den Enzymanstieg bei O<sub>2</sub>-Exposition von Pavian-Lungen sowie den hohen Enzymgehalt in Keratinozyten und Melanozyten, möglicherweise als Schutzwall gegen die radikalbildende Wirkung der UV-Strahlung in der Haut.

Selen ist essenziell für die Aktivität der TrxR, und die Erhöhung des Selenspiegels auf 1 µM im Medium von Zellkulturen steigert die intrazelluläre Aktivität auf das 40-fache. Dabei nehmen sowohl der Seleneinbau in die TrxR pro Untereinheit (von 0,01 bei 27 nM auf 0,98 bei 1 µM) als auch die mRNA und die Proteinmenge mit steigender Selenkonzentration zu, auch wenn der Anstieg der beiden letzteren schwächer ausfällt als der Aktivitätszuwachs. Veränderungen der täglichen Selenzufuhr mit der Nahrung beeinflussen die TrxR-Aktivität auch in vivo. Ratten, die mehrere Wochen eine Selenmangeldiät erhalten, zeigen eine Abnahme der TrxR-Aktivität der Lunge, Leber und Niere, während die Aktivität im Hirn konstant bleibt. Besonders selenreiche Nahrung hingegen bewirkt einen vorübergehenden Anstieg der TrxR-Aktivität ohne Anstieg der Proteinsynthese, der möglicherweise, analog zu den Ergebnissen in Zellkultur, auf einen verstärkten Seleneinbau zurückzuführen ist [37, 38].

### **1.5.3 Deiodasen**

Die Existenz von Deiodasen wurde erstmals 1952 unmittelbar nach der Entdeckung von T<sub>3</sub> von Pitt-Rivers et al. postuliert. Der Beweis für eine extrathyroideale Produktion von T<sub>3</sub> wurde 1970 durch den Nachweis von T<sub>3</sub> bei athyreoten Patienten, denen T<sub>4</sub> verabreicht wurde, erbracht.

Die Aufgabe der Deiodase-Enzyme besteht in der lokalen und systemischen Kontrolle des verfügbaren Spiegels an T<sub>3</sub>, d.h. an aktiviertem Schilddrüsenhormon. Bisher sind drei verschiedene Deiodase-Isoenzyme bekannt, Typ I (5'DI), Typ II (5'DII) und Typ III. Ihre biochemischen und regulatorischen Eigenschaften sind verschieden: Sie zeigen unterschiedliche Gewebeverteilungen und Expressionsmuster während der Entwicklung

und reagieren verschieden auf Deiodase-Inhibitoren. Während die 5'DI durch PTU gehemmt wird, ist die 5'DII gegenüber diesem Inhibitor nur wenig empfindlich. Aber auch die Substratspezifitäten sind unterschiedlich. Aktivierung von T4 zu T3 wird von zwei Enzymen katalysiert, der 5'-Deiodase Typ I und Typ II. Inaktivierung von T4 und T3 geschieht durch die 5'-Deiodase Typ III und teilweise Typ I.

Alle drei enthalten einen Selenocysteinrest im aktiven Zentrum, wobei die Typ II-Deiodase noch zusätzlich einen Selenocysteinrest nahe des C-Terminus enthält. Tierversuche, klinische und Zellkulturstudien belegen eine selenabhängige Expression von 5'DI. Für die 5'DII konnte im Gegensatz hierzu bisher keine klare Selen-Abhängigkeit festgestellt werden. Einige Studien zeigen, dass unter schwerem Selenmangel die Expression der Typ III-Deiodase sinkt, was auf ihre Selenoprotein-Natur hinweist. Ein klarer Beweis für selenabhängige Expression der 5'DI in vivo mit folgendem Abfall des T3-Spiegels konnte für den Menschen bisher jedoch nicht gefunden werden, auch in experimentellen Studien konnte keine Abhängigkeit der funktionellen Expression der zwei Selenoenzyme Glutathionperoxidase und 5'DI vom Selenstatus in der menschlichen Schilddrüse nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu zeigen Tierversuche deutlich die Regulierung der 5'DI-Expression über den Selen-Status, wobei hier der Selengehalt der Nahrung stärker als bei Menschen vertretbar variiert wurde [5, 39].

In menschlichen Schilddrüsenkarzinomen sowie Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien kann die 5'DI außerdem als Differenzierungsmarker angesehen werden, da die Aktivität der 5'DI stark mit dem Differenzierungsgrad des entsprechenden Gewebes bzw. der entsprechenden Schilddrüsenzelllinie korreliert [40]. Interessanterweise wird die Enzymaktivität in den mäßig differenzierten FTC-Zelllinien FTC 133 und FTC 238 von einem niedrigen Niveau durch Retinsäurebehandlung um ein Vielfaches gesteigert, nicht dagegen in anaplastischen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wie C 643 und HTh 74. Die bereits hohe Enzymaktivität in der hoch differenzierten Rattenschilddrüsenkarzinom-Zelllinie FRTL 5 wird ebenfalls nicht beeinflusst. Auch diese Daten weisen darauf hin, dass die 5'DI sowie ihre Induzierbarkeit durch Retinsäure als sensitiver Differenzierungsparameter zumindest für follikuläre Schilddrüsenkarzinome geeignet sind [12].

### 1.5.4 Selenoprotein P

Selenoprotein P (SePP) ist ein extrazelluläres, monomeres Glykoprotein, das gemäß der Anzahl von UGA-Codons der mRNA in seiner Glykopeptidkette beim Menschen bis zu 10 Selenocysteinreste enthält. Damit ist es, abgesehen von der Typ II-Deiodase, das einzige Protein, für das mehr als ein Selenatom pro Polypeptidkette beschrieben ist. Seine mRNA weist in der 3'UTR außerdem zwei SECIS-Elemente auf. In humanem Plasma existieren mindestens zwei Isoformen. Die fertigen Proteine zeigen im SDS-Page eine Molekülmasse von 61 und 55 bzw. 51 kDa. Das im Plasma befindliche SePP, das für mindestens 40-50 % der Plasmakonzentration an Selen verantwortlich ist, wird vornehmlich in der Leber produziert. Daher ist es bei Zirrhosepatienten erniedrigt. Ein geringerer Teil wird allerdings auch in Herzmuskel, Niere, Lunge, Hoden, Plazenta, Uterus, Hirn und weiteren Geweben exprimiert [27, 41].

Obwohl die Funktion von SePP noch nicht völlig geklärt ist, wird vermutet, dass es als Transportprotein und/oder der extrazellulären Abwehr gegen Oxidation dient. Eine kürzlich erschienene Studie belegt anhand von Experimenten mit SePP-Knockout-Mäusen, dass SePP als Transportprotein eine Schlüsselrolle bei der Verteilung von hepatischem Selen in die Zielgewebe spielt. Der Selengehalt in den Lebern von Knock-Out-Mäusen ist erhöht, der Selenspiegel in Plasma und anderen Geweben jedoch erniedrigt. Analog ändern sich auch die Aktivitäten der Selenoenzyme. Gleichzeitig zeigen sich in der Reduktion der mRNA von cGPx und PH-GPx im Lebergewebe bereits toxische Wirkungen der hohen Selenkonzentration. Somit ist SePP in erster Linie eine Funktion als Transportprotein zuzuschreiben, von dem der Selenstatus anderer Gewebe abhängt, sowie ferner eine Aufgabe in der Detoxifikation von mit der Nahrung aufgenommenen Selenverbindungen in der Leber [42]. Diese Ergebnisse werden durch die Resultate von zwei anderen Arbeitsgruppen unterstützt [43, 44].

Verschiedene Studien untermauern zudem die These einer Funktion in der antioxidativen Defense: Beispielsweise entwickeln selendefiziente Ratten nach der Injektion von Diquat, das die Bildung von Superoxidanion begünstigt, im Gegensatz zu den Kontrollieren Leber- und Nierennekrosen. Seleninjektion vor der Diquatgabe bewirkt bei den selendefizienten Ratten einen deutlichen Schutz vor Lipidperoxidation und eine niedrigere Mortalität. Die GPx-Aktivität in Leber, Niere, Lunge oder Plasma steigt indes nicht

an, was nahe legt, dass nicht sie für die genannten Effekte verantwortlich ist [41]. Ferner schützt SePP in humanem Plasma gegen Peroxynitrit-vermittelte Oxidation und reduziert in vitro, ähnlich wie PH-GPx, Phospholipidhydroperoxid, wobei es Thiole als Kosubstrat benötigt. Die Reduktion von Peroxynitrit, das als wichtiger Mediator entzündlicher Toxizität eingeschätzt wird, wurde in vitro auch für die niedermolekularen Selenoproteine cGPx und TRxR gezeigt. Endothelzellen sind eine beständige Quelle von Stickstoffmonoxid. Folglich sind sie Schäden durch Peroxynitrit besonders ausgesetzt, vor allem in Anwesenheit von Superoxid-produzierenden Zellen wie aktivierten Neutrophilen oder Makrophagen. Da SePP in vivo mit Endothelmembranen assoziiert ist (nicht aber von Endothelzellen produziert wird!), könnte der Schutz der Endothelzellen vor Oxidation durch Peroxynitrit ebenfalls eine relevante Funktion von SePP darstellen [27].

Auch gibt es mehrere Hinweise auf eine wichtige Funktion von Selenoprotein P im ZNS. SePP-Knockout-Mäuse entwickeln sich bis zwei Wochen nach der Geburt völlig normal. In der dritten Lebenswoche jedoch entwickeln homozygote SePP-Knockout-Mäuse Zeichen einer Ataxie mit einem breitbasigen, schwerfälligen Gang. Zusätzlich weisen diese Tiere ein reduziertes Körpergewicht auf und haben eine verkürzte Lebenserwartung. SePP kann auf Protein- und RNA-Ebene aus Präparationen des ZNS nachgewiesen werden. In menschlichem sowie in Ratten-Hirngewebe findet man SePP-mRNA, und auch immunologisch kann SePP sowohl aus menschlichen Gehirnen und in entsprechenden Gehirnschnitten als auch im Mediumüberstand von kultivierten Rattengliazellen nachgewiesen werden. Möglicherweise spielt SePP hier eine Rolle beim Schutz des Myelins bzw. der Neuronen vor oxidativen Schäden [42, 45, 46].

Die Konzentration von SePP variiert stark in Abhängigkeit von der Selenzufuhr und dem allgemeinen Selenstatus. Beispielsweise zeigen Patienten, die ohne Selenzusatz parenteral ernährt werden, eine signifikant verminderte Konzentration an SePP im Vergleich zu gesunden Probanden. Aber auch andere Faktoren üben einen gewissen Einfluss aus. So haben Frauen im Vergleich zu Männern möglicherweise einen etwas niedrigeren Spiegel an SePP, ebenso weisen Raucher einen geringeren Gehalt an SePP oder Plasma-Selen auf. Eine Erklärung für die letzteren Befunde mag die Assoziation von Rauchen und einer leichten chronischen Entzündung des Respirationstrakts und der



Gefäßendothelzellen geben [41]. Außerdem besteht eine positive Korrelation der Plasmaspiegel von SePP und Albumin sowie eine negative Korrelation der Plasmaspiegel von SePP und  $\alpha_1$ -Antitrypsin, beides Akut-Phase-Proteine. Da das humane SePP-Gen ferner einen Promoter enthält, dessen Aktivität durch Einfluß von Zytokinen wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sinkt, wird SePP auch als eine Art negatives Akut-Phase-Protein angesehen [47].

### 1.5.5 Hierarchie der Selenverteilung

Unter Selenmangelbedingungen unterliegt die Verteilung des vorhandenen Selen auf die verschiedenen Proteine einer hierarchischen Regulation. Dies betrifft sowohl die Proteine untereinander als auch die unterschiedlichen Gewebe, so dass bestimmte Enzyme bzw. Gewebe bevorzugt mit Selen versorgt werden.

Bestimmte Sequenzen in der 3'UTR der mRNA verschiedener Selenoproteine sind unter anderem dafür zuständig, den Einbau des Selen bei begrenzten Ressourcen zu steuern. Unterschiede in den 3'UTRs dreier Selenoproteine, der cGPx, der PH-GPx und der 5'DI haben Differenzen um 100 % in der Expression des entsprechenden Proteins bei Selenmangelbedingungen zur Folge. Allgemein steht die 5'DI in der Hierarchie der Selenversorgung höher als die cytosolische GPx, wohingegen die PH-GPx und Selenoprotein P (SePP) mit der 5'DI auf einer Ebene oder gar höher stehen. Während der Selenit-Depletionsphase kann in der Schweinenieren-Zelllinie LLC-PK1 ein vorübergehender Abfall der Expression mit einem folgenden Wiederanstieg der 5'DI beobachtet werden, während die cGPx kontinuierlich abfällt. Dies ist wahrscheinlich durch eine Verschiebung des Selen beim Abbau der reichlich vorhandenen cGPx zugunsten der schwächer exprimierten 5'DI bedingt, wodurch die Produktion von für die Stoffwechselfunktion unentbehrlichem T3 aus T4 gesichert wird. In der immortalisierten, nicht transformierten Rattenschilddrüsenzelllinie FRTL-5 reduziert Selenentzug das Aktivitäts- und mRNA-Niveau von cGPx, während für 5'DI und PH-GPx geringere Veränderungen beobachtet werden. Die Unterschiede in der Expression der 5'DI nach Selenzufuhr in unterschiedlichen Konzentrationen fallen eher bescheiden aus, wohingegen die cGPx-Expression bei Konzentrationen über 100 nM auf über das Doppelte ansteigt.

Bemerkenswert ist auch, dass verschiedene Gewebe, die 5'DI-Aktivität exprimieren, unterschiedlich und nach einem festen Muster auf Variationen des Selen-Status reagieren. Während die Expression der 5'DI in Leber und Niere schnell auf Selen reagiert, zeigt sie in der Schilddrüse, einigen anderen endokrinen Geweben sowie im Gehirn nur geringe Reaktion. Im Gegensatz zu vielen anderen Geweben speichert die Schilddrüse außerdem unter Selenmangelbedingungen Selen, genauso wie einige andere endokrine Gewebe, Hirngewebe und Gewebe des Reproduktionstrakts [5, 22, 48].

Auch die TrxR steht in der Hierarchie der Selenoenzyme relativ weit oben. Das regulierende Sequenzelement der TrxR1 ist unter Normalbedingungen hochaktiv, reagiert jedoch weniger auf zusätzliche Selenversorgung als das SECIS-Element der Typ1-Deiodase. Dies lässt vermuten, dass bei niedriger Selenversorgung die TrxR1-Spiegel besser aufrechterhalten werden, bei Selenüberschuss jedoch kein dramatischer Proteinanstieg stattfindet [37].

Andere Studien untersuchen die Unterschiede in der Regulation bei Selenmangelbedingungen von SePP und cGPx. Beispielsweise steigt bei selendefizienten Ratten nach Injektion von <sup>75</sup>Se-Selenit der Einbau in SePP in der Leber an, wohingegen der Einbau in cGPx im Vergleich zu Kontrollratten abfällt. Erhalten die Ratten zunächst eine normale und daraufhin für 14,5 Wochen eine Selenmangel-Diät, nimmt cGPx im Lauf der Zeit schneller ab als SePP und erreicht ein niedrigeres Niveau. Auch das mRNA-Level sinkt in einer ähnlichen Art und Weise, was auf eine prätranslationale Regulation hinweist. Der Selenmangel führt nicht nur zu einem verstärkten Abbau der mRNA, sondern auch zu einer verminderten Effizienz des SECIS-Elements bei der Verhinderung eines vorzeitigen Kettenabbruchs beim UGA-Codon. Zu ähnlichen Ergebnissen kam man im Rahmen einer schwedischen Studie, bei der durch eine Umstellung auf lactovegetarische Kost die Selenaufnahme der Probanden um etwa 50 % abnahm. In den ersten drei Monaten nahm die Konzentration von Selen im Plasma um 11 % ab, die der pGPx um 17 %. Hingegen blieb die Konzentration von SePP stabil. Diesen Befunden zufolge steht SePP in der Hierarchie höher als die pGPx [41].

## **1.6 RETINSÄURE**

Retinsäure, der biologisch aktive Metabolit von Vitamin A, vermittelt ein weites Spektrum von morphogenetischen, Proliferations- und Differenzierungsprozessen *in vitro* und *in vivo*. Im menschlichen Körper wird Retinsäure unter anderem aus Vitamin A metabolisiert, das über die Nahrung aufgenommen wird. Nach dem Transport im Plasma, an Albumin gebunden, passiert sie frei die Zellmembran und wird nach Aufnahme in die Zelle an ein spezifisches Protein (CRABP) gebunden. Im Zellkern interagiert Retinsäure mit spezifischen Kernrezeptoren, die sich in zwei Subfamilien (RARs und RXRs) mit jeweils verschiedenen Untertypen gliedern. Wie Steroid- und Vitamin D<sub>3</sub>-Rezeptoren gehören sie zu der Familie der Kernrezeptoren, die als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren fungieren.

RARs haben eine hohe Affinität zu all-trans-Retinsäure und verändern die Genexpression nach Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen, sogenannte Retinsäure-responsive Elemente (RAREs). RXRs haben zwar auch eine gewisse Affinität zu all-trans-Retinsäure, 9-cis-Retinsäure bindet hier jedoch weitaus besser. RARs und RXRs üben ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren meist als RAR-RXR-Heterodimere aus. Je nach Art der Bindung und abhängig von der Anwesenheit bestimmter Agonisten oder Antagonisten können sie spezifische genetische Programme positiv oder negativ modulieren. RXRs sind ferner Dimerisationspartner einer großen Anzahl anderer nukleärer Kernrezeptoren, was möglicherweise bedeutet, dass spezifische RXR-Liganden multiple Transduktionswege unabhängig von RARs modulieren [49]. Da auch Rezeptoren für Wachstumshormone, Onkogene, Interleukine, Cytokine und Zell-Zell-Interaktionsfaktoren mit Retinoidrezeptoren interagieren, spielt Retinsäure außerdem eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen und Geweben.

Während der Embryonalentwicklung ist Retinsäure ein wichtiger Regulator der Morphogenese. Bei Vitamin A-Mangel oder medikamentöser Retinsäure-Zufuhr zu Beginn der Schwangerschaft bei Akne können typische Fehlbildungen wie zum Beispiel Lippen-Kiefer-Gaumenspalte oder Gliedmaßenfehlbildungen resultieren. Aber auch nach der Embryonalzeit zeigen Retinoide eine ausgeprägte Wirkung auf Proliferation und Differenzierung verschiedener Gewebe wie z.B. Respirationsepithel, Darmschleimhaut, Haut und diverse Tumorzellen. Auf unterschiedliche Tumorpromotoren wirken sie

hemmend. Die Progression von prämaligen Zellen zu Zellen mit invasiven, malignen Eigenschaften wird verlangsamt, aufgehalten oder sogar rückgängig gemacht. In der klinischen Tumorthherapie wird Retinsäure im Rahmen von Studien und mittlerweile auch in der Praxis eingesetzt. Das Paradebeispiel für erfolgreiche Behandlungsstrategien mit Retinsäure ist die Promyelozytenleukämie, bei der bis zu 90 % Remissionen erzielt werden können. Vielversprechende Ergebnisse zeigte auch der therapeutische Einsatz bei Kopf- und Halstumoren, bei Schilddrüsentumoren und bei Hauttumoren [13, 50, 51, 52]. Verschiedene teils tumorspezifische Mechanismen führen entweder zu Redifferenzierung oder verhindern eine weitere Entdifferenzierung der Tumorzellen.

## **1.7 FRAGESTELLUNG**

Hürthle-Zell-Karzinome stellen wie oben bereits erläutert eine Sonderform follikulärer Schilddrüsentumoren dar, weisen jedoch im Vergleich zu letzteren eine höhere Rate an Malignität auf. Das seltene Ansprechen auf eine Radioiodtherapie mag ein weiterer Grund sein für die höhere Mortalität, die mit diesen Tumoren assoziiert ist. Die stark vermehrten, hyperplastischen Mitochondrien sind seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung und zahlreicher Spekulationen. Verschiedene Mutationen der mitochondrialen DNA konnten bisher identifiziert werden, deren genauere Bedeutung zur Zeit noch unklar ist. Mutationen der mitochondrialen DNA entstehen vermutlich aufgrund von Schädigung durch mitochondriale ROS. Im Allgemeinen werden oxyphile Tumorzellen als metabolisch aktiv charakterisiert. Allerdings scheinen sie Defekte der Atmungskette aufzuweisen, was eine kompensatorische Vermehrung der Mitochondrien und infolgedessen ein höheres Maß an ROS plausibel erscheinen lässt. Dies wirft die Frage auf, ob die Expression von Selenoproteinen, die in erster Linie für den Schutz der Zellen vor oxidativer Schädigung verantwortlich sind, in Hürthle-Zell-Tumoren intakt ist.

Bei mäßig differenzierten Schilddrüsenkarzinomen wie FTC 133 und 238 bewirkt die Stimulation mit Retinsäure vielfältige positive Effekte im Sinne einer partiellen Redifferenzierung [11,12]. Aufgrund des seltenen Ansprechens oxyphiler Tumorzellen auf eine Radioiodtherapie und ihrer vergleichsweise hohen Tendenz zur weiteren malignen Entartung ist es daher von Interesse, die Reaktion solcher Zellen auf eine Retinsäurestimulation zu prüfen. Als *in vitro*-Modell für oxyphile Schilddrüsentumoren eignet sich die

Zelllinie XTC.UC1, das bisher einzige Zellkulturmodell für Hürthle-Zell-Karzinome [53].

Ziel dieser Arbeit ist es, die selenabhängige Expression und Funktion von Selenoproteinen in XTC-Zellen zu untersuchen. Außerdem soll analysiert werden, ob und in welcher Form die Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bzw. Retinsäure einen Effekt auf die Expression der verschiedenen Selenoproteine ausübt. Schließlich soll auch das Expressionsmuster schilddrüsenpezifischer Proteine in XTC-Zellen mittels RT-PCR näher betrachtet werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 GERÄTE

Brutschrank	Heraeus Instruments (Hanau)
Filmentwicklungsmaschine	Curix-60, Agfa (Leverkusen)
Gamma-Counter	Riastar, Packard (Zaventem, Belgien)
Gel-Apparatur für Agarosegele	Minigelkammer, Roth (Karlsruhe)
Gel-Apparatur für SDS-Page	Mini Protean II, Bio-Rad (München)
Heizblock	Techne DB3, Gesellschaft für Laborbedarf (Würzburg)
Kamera	MP4, Polaroid (Offenbach)
Mikrokonzentratoren	Centricon, Millipore (Billerica, MA, USA)
pH-Meter	pH 523, WTW (Weilheim)
Photometer	UV Visible Spectrophotometer, Pharmacia (Freiburg)
Pipetus	Pipetus-Standard, Hirschmann (Eberstadt)
Sterilbänke	HA 2472 GS, Heraeus Instruments (Hanau) HB 2448, Heraeus Instruments (Hanau)
Thermozykler	MHH, Landgraf (Langenhagen) PRC-200, MJ-Research (Waltham, MA, USA)
Ultraschall	Labsonic, Braun (Melsungen)
UV-Lampe	FLX-35 M, Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, Frankreich)
Wasserbad	Wasserbad 1083, Ges. für Laborbedarf (Würzburg) Köttermann Labortechnik (Uetze/Hänigsen)
Zentrifugen	Biofuge 17 RS, Heraeus (Hanau) L 70-Ultrazentrifuge, Beckman (Unterschleißheim) EBA 12, Hettich (Tuttlingen) Megafuge 1.0 R, Heraeus (Hanau)

## **2.2 MATERIALIEN**

Plastikwaren wurden bei Greiner (Kremsmünster, Österreich), Sarstedt (Nümbrecht), Biometra (Göttingen) und Eppendorf (Hamburg) gekauft. Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Amersham (Freiburg), Bio-Rad (München), Boehringer (Mannheim), Gibco BRL bzw. Life Technologies (Paisley, Schottland), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen. Lösungen wurden je nach benötigter Reinheit mit deionisiertem Wasser, doppelt destilliertem, deionisiertem Wasser oder mit sterilem, RNase-freiem Aqua ad injectabilia von Pharmacia angesetzt.

### **2.2.1 Lösungen und Puffer**

TE            10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0

TBE           0,09 M Tris-Borat, 2 mM EDTA, pH 8,3

PBS (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung)

137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,47 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
pH 7,4

Homogenisationspuffer

250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM Dithiothreitol  
(DTT, frisch zugeben), pH 7,4

Farbmarker für Agarosegele (Stop-Puffer, 5-fach konzentriert)

0,25 % Bromphenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v),  
30 % Glycerin (w/v), 1 mM EDTA

### **2.2.2 XTC.UC1-Zellen**

Die Hürthle-Zell-Tumor-Zelllinie XTC.UC1 (im Folgenden XTC genannt) wurde freundlicherweise von Andreas Zielke, Marburg, zur Verfügung gestellt. Hierbei handelt es sich um eine Schilddrüsenkrebszelllinie, die aus der Weichteilmetastase eines Hürthle-Zell-Karzinoms bei einer 63jährigen Frau 5 Jahre nach Erstopoperation etabliert wurde. Sie gilt als hochdifferenziert, da die Zellen immunoreaktiv für Thyreoglobulin sind und auf TSH-Stimulation mit cAMP-Erhöhung, gesteigerter Proliferation und Freisetzung von Thyreoglobulin reagieren. XTC-Zellen weisen eine epitheloide Morpholo-

gie auf, die Zellzahlverdopplungszeit beträgt etwa 4,3 Tage. In vitro sind sie zu Migration und Invasion durch rekonstituierte Basalmembranen befähigt, in vivo bilden sie nach Xenotransplantation in athymischen Mäusen spontan Metastasen. Sie weisen typische Charakteristika onkozytärer Zellen auf, wie beispielsweise hypertrophe Mitochondrien, eine erhöhte Aktivität der Atmungskettenenzyme und einen erhöhten Gehalt an mitochondrialer DNA. Anzeichen von Defekten der Atmungskette oder einer Entkopplung zwischen Atmungskette und ATP-Produktion konnten nicht entdeckt werden [53, 54].

### **2.2.3 Computersoftware und Statistik**

Für Berechnungen wurde QuattroPro für Windows (Borland International Inc.) verwendet, Graphiken wurden in SigmaPlot für Windows (SPSS Inc., Chicago, USA) erstellt, Bilder wurden in Corel Photo-Paint Version 8.0 und CorelDraw 8 (Corel Corporation, Ottawa, Kanada) bearbeitet und Statistiken in SPSS Version 11 (SPSS Inc., Chicago, USA) berechnet. Sämtliche Proben wurden als Duplikate angelegt und die Versuche wurden mindestens dreimal durchgeführt. Aus den Ergebnissen wurden Mittelwerte gebildet. Aufgrund des begrenzten Umfangs der Stichproben wurde auf die Darstellung einer detaillierten statistischen Analyse verzichtet.

## **2.3 METHODEN**

### **2.3.1 Zellkultur**

Die Passagenzahl der verwendeten Zelllinie XTC.UC1 lag zum Zeitpunkt der Versuche zwischen 18 und 32. Zur Stammerhaltung wurden die Zellen als Monolayer in 75 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen mit DMEM F12, ergänzt mit 10 % fetalem Kälberserum, kultiviert und bei 37°C in feuchter Atmosphäre (95% Luft, 5% CO<sup>2</sup>) inkubiert. Das Medium wurde alle 72 bis 96 Stunden erneuert. Einmal pro Woche wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 passagiert wie folgt:

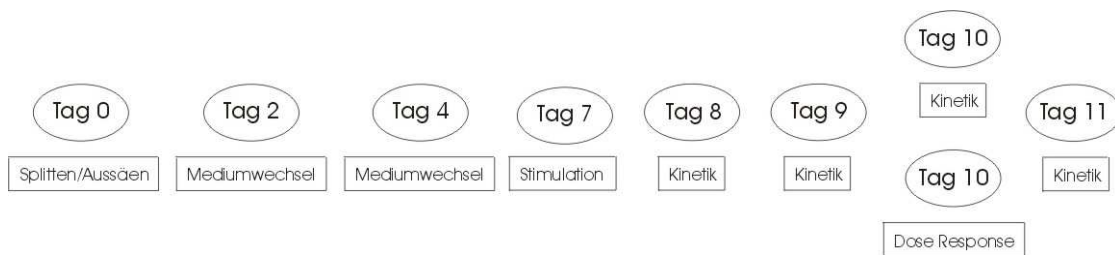
Waschen der Zellen mit HBSS (gepufferte physiologische Kochsalzlösung), Überschichten der Zellen mit 1 ml Trypsin (etwa 5 Minuten Inkubation bei 37°C), Suspension der gelösten Zellen in serumhaltigem Medium und Wiederaussäen [53].



### 2.3.2 Gewinnung der Zellhomogenate:

Für Stimulationsversuche wurden die Zellen zunächst unter Serum-freien Bedingungen gezogen, um eine Selendepletion durchzuführen. Dazu wurden sie jeweils am Tag 0 passagiert und in 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen ausgesät. Die Zellsuspension wurde dabei im Verhältnis 1:6 bis 1:8 verdünnt, um ein zu dichtes Bewachsen des Flaschenbodens aufgrund der längeren Zeitspanne in Kultur (siehe unten) zu verhindern.

An Tag 2 und 4 erfolgte jeweils ein Mediumwechsel mit serumfreien Medium. An Tag 7 wurden die Zellen nach einem weiteren Mediumwechsel mit serumfreien Medium mit den jeweiligen Konzentrationen an Selen bzw. 1 µM all-trans-Retinsäure stimuliert. Zur Bestimmung der Stimulationskinetik wurden die Zellen anschließend im Abstand von jeweils 24 Stunden bis Tag 11 (bzw. Tag 13) geerntet, für die Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit wurden die Zellen nach 72 Stunden am Tag 10 geerntet.



**Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf der Zellkultur-Experimente**

Zur Ernte wurde das Medium vollständig abgesaugt, die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, und durch Abkratzen mit einem Plastik-Zellkulturschaber in eiskaltem Homogenisationspuffer geerntet. Die Zellen wurden in Eppendorfreaktionsgefäße überführt und bei 100 Watt (10 mal 0,5 s Puls) sonifiziert. Für TRxR-Assays wurden die Extrakte in diesem Zustand belassen und tiefgefroren.

Für die Bestimmung der TypI 5'-Deiodase- bzw. der Glutathionperoxidase-Aktivität wurden die Extrakte im modifizierten Verfahren nach Chu [55] anschließend 10 Minuten bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert (Biofuge 17RS, Heraeus), der Überstand (Cytosolfraktion für GPx-Assays) abgenommen und das Pellet nochmals mit Homoge-

nisationspuffer wie oben angegeben sonifiziert (Membranfraktion für Deiodasebestimmung). Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt, die Proben wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

### 2.3.3 Gewinnung der Proteinkonzentrate aus Kulturmedium

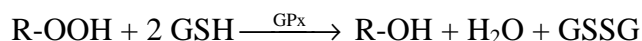
Um eventuell sezernierte Proteine im konditionierten Medium bestimmen zu können, wurde der Zellkulturüberstand mit Hilfe von Mikrokonzentratoren in der Kühlzentrifuge bei 4000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  einkonzentriert. Dabei wurde das Volumen von 2 ml auf etwa 25 bis 50  $\mu\text{l}$  reduziert.

### 2.3.4 Protein-Bestimmungen

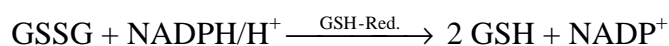
Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde durch einen modifizierten Bradford-Proteinassay von Bio-Rad bestimmt [56]. Die Messung erfolgte am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm. Anhand der Standardkurve aus einer IgG-Proteinstandardlösung (unterschiedliche Konzentrationen von ca. 1,3 bis 1,9 mg/ml) wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.3.5 Aktivitätsbestimmung der Glutathionperoxidasen

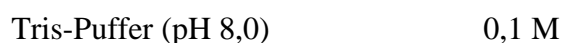
Die Bestimmung der GPx-Aktivität wurde durch einen gekoppelten enzymatischen Test nach Beutler durchgeführt [57]: Die GPx reduziert Peroxid (im Assay tertiär-Butyl-Hydroperoxid) zu Alkohol, wobei GSH zu GSSG oxidiert wird.



Oxidiertes Glutathion kann durch die Glutathion-Reduktase (GSH-Red.) unter NADPH-Oxidation wieder regeneriert werden. Die Oxidation von  $\text{NADPH}/\text{H}^+$  zu  $\text{NADP}^+$  kann spektralphotometrisch bei 340 nm beobachtet werden:



In einem Endvolumen von 1 ml wurden in einer Halbmikroküvette der Reaktionsansatz vorgelegt, bestehend aus:



EDTA (pH 8,0)	0,5 mM
NADPH	200 $\mu$ M
Glutathion	2 mM
Glutathion-Reduktase	1 U/ml
(Typ IV aus Bäckerhefe)	

50  $\mu$ g (Rattengewebe) bzw. 100  $\mu$ g (Zelllinien) Protein der Cytosolfraktion wurde zugegeben. Zur Bestimmung der unspezifischen NADPH-Oxidation wurde vor dem Start der Reaktion zu je einem der Dreifachwerte 10 mM Mercaptosuccinat (Endkonzentration) zugegeben. Die erhaltenen Werte wurden später von den Messwerten abgezogen. Mercaptosuccinat blockiert spezifisch die GPx-Aktivität und besitzt bei 340 nm eine zu vernachlässigende Absorption. Die Reaktion wurde durch 7  $\mu$ M tertiär-Butyl-Hydroperoxid gestartet. Nach einer kurzen Vorinkubationsphase von eineinhalb Minuten wurde die NADPH-Oxidation im Photometer bei 340 nm und Raumtemperatur 3 Minuten lang über den linearen Bereich hinweg gemessen.

### 2.3.5.1 Berechnung der spezifischen GPx-Aktivität:

Die Aktivität der GPx wurde bei einem Extinktionskoeffizienten für NADPH von  $\epsilon_{\text{NADPH}}(340 \text{ nm}) = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^3 \text{ cm}^{-1}$  nach folgender Formel berechnet [58]:

$$\text{Spezifische GPx-Aktivität} = \frac{\Delta A_{340} \text{ min}^{-1} * 1 \text{ cm}^3 * 1000}{[\text{nmol} * \text{mg}^{-1} * \text{min}^{-1}] \quad 6,22 \text{ cm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} * 1 \text{ cm} * \text{Proteinmenge in [mg]}}$$

### 2.3.6 Aktivitätsbestimmung der Thioredoxinreduktasen

Die Aktivität der Thioredoxinreduktasen wurde im DTNB-Reduktionsassay bestimmt. Alle bisher bekannten großen Thioredoxinreduktasen (Molekulargewicht ca. 55 kDa pro Untereinheit) reduzieren das artifizielle Disulfidsubstrat 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB, Ellmann's Reagenz) NADPH-abhängig zu 2-Nitro-5-thiobenzoat (TNB).

In Halbmikroküvetten wurden zunächst 900  $\mu$ l des Reaktionsmix vorgelegt:

NADPH	0,24 mM
EDTA	10 mM
BSA	0,2 mg/ml

DTNB	5,05 mM
KPO <sub>4</sub> (pH7,0)	1 M: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 M

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl des Homogenates gestartet. Beim Leerwert wurden statt dessen 100 µl Homogenisationspuffer zugesetzt, um den nicht enzymatischen Umsatz zu bestimmen, der bei der Berechnung der Aktivität vom Rohwert subtrahiert wird.

### 2.3.6.1 Berechnung der spezifischen TRxR-Aktivität:

Gemessen wird die durch das Thiolat des gebildeten TNB gemessene Absorptionszunahme bei 412 nm ( $\epsilon_{\text{TNB}}(412 \text{ nm}) = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) während der ersten zwei Minuten. Rechnerisch wird die Aktivität auf den NADPH-Verbrauch bezogen. Da pro NADPH zwei TNB entstehen, muss die Absorptionsänderung zusätzlich durch 2 geteilt werden. Ein Unit an TRxR-Aktivität schließlich ist definiert als 1 µmol pro Minute gebildetes TNB bei 37 °C [58]:

$$\text{Spezifische TRxR-Aktivität} = \frac{\Delta A_{412} \text{ min}^{-1} * 1 \text{ cm}^3}{13,6 \text{ cm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} * 2 * 1 \text{ cm} * \text{Proteinmenge in [mg]}}$$

[mU \* mg<sup>-1</sup> \* min<sup>-1</sup>]

### 2.3.7 Aktivitätsbestimmung der Deiodase-Isoenzyme

#### 2.3.7.1 Reinigung des Tracers

Die Aktivität der Typ1-Deiodase (5'DI) wurde durch einen Test bestimmt, der auf der enzymatischen Freisetzung von <sup>125</sup>I aus radioaktiv markiertem 3,3',5'-[<sup>125</sup>I]-Triiodothyronin (rT3) (NEN, Zaventem, Belgien) beruht [59]. Vor jedem Test wurde der Tracer zunächst durch Adsorptionschromatographie an Sephadex LH 20 (Pharmacia) gereinigt, da während der Lagerung spontane Deiodierung und Radiolyse auftreten können. Die Menge des zu reinigenden Tracers wurde jeweils so gewählt, dass der fertige Substratmix für die Reaktionslösung eine Aktivität von ca. 50 000 cpm/50 µl aufwies. Zur Aufreinigung des Tracers wurden 600 µl Sephadex (suspendiert in 0,1 N HCl) in eine Kunststoffsäule mit Fritte pipettiert und mit 3 ml 0,1 N HCl äquilibriert. Nach Auftragen des Tracers wurde dieser zunächst mit 3 ml HCl und anschließend mit 3 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Elution erfolgte mit 1 ml einer Lösung aus Ethanol und NH<sub>3</sub> im Ver-

hältnis 98:2 (v/v) durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 Minuten) in ein Glasröhrchen. Das Lösungsmittel wurde dann in einem lauwarmen Wasserbad durch N<sub>2</sub>-Strom vollständig eingedampft.

### 2.3.7.2 Messung der Enzymaktivität

Unmittelbar danach wurde der Tracer in einem zweifach konzentrierten Substratmix aus

NaOH	0,33 mM
DTT	40 mM
EDTA	2 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 6,8	0,2 M
nicht-markiertes rT3	0,2 µM

wieder gelöst.

Der Enzymtest wurde in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt. Für jede Probe wurden drei parallele Ansätze gemessen. Es wurden jeweils 40 µl des zu messenden Homogenates (mit einer Gesamtproteinmenge von 10 bis 20 µg) und 10 µl H<sub>2</sub>O bzw. PTU als Inhibitorlösung vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Substratmix gestartet und für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 50 µl einer Lösung aus

Bovinem Serumalbumin (BSA)	10 %
PTU	10 mM

zum Abfangen der Iodothyronine bzw. Hemmung der 5'DI-Aktivität zugegeben. Die Proteine wurden anschließend mit 400 µl 10%iger, eiskalter Trichloressigsäure ausgefällt. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (4000 rpm, 10 Minuten) und anschließend 480 µl des Überstandes auf Dowex 50 WX-2-Säulen (Bio-Rad) aufgetragen, die vorher mit 4 ml 10%iger Essigsäure gewaschen wurden. Freies <sup>125</sup>I wurde mit zweimal 1 ml 10%iger Essigsäure in Glasröhrchen eluiert und 10 Minuten im Gamma-Counter gezählt. Zur Ermittlung der Blindwerte wurden 50 µl Substratmix mit 10 µl H<sub>2</sub>O inkubiert und das Homogenat erst nach Abstoppen der Reaktion zugegeben. Zur Berechnung der spezifischen Aktivität muß der Wert bestimmt werden, der bei 100 % Umsatz theoretisch erreichbar wäre. Hierzu wurden 50 µl des Substratmixes in 2 ml H<sub>2</sub>O ebenfalls im Gamma-Counter gezählt.

### 2.3.7.3 Berechnung der spezifischen 5'DI-Aktivität:

Die Deiodaseaktivität wurde in fmol deiodiertes rT3 pro mg Protein und Minute berechnet:

$$\text{Spezif. Deiodaseaktivität} = \frac{2 * \text{rT3-Menge [nmol]} * 10^6 (\text{cpm}_{\text{frei}} - \text{cpm}_{\text{blind}})}{[\text{fmol/mg/min}] \quad \text{cpm}_{(100\%)} * \text{Proteinmenge [mg]} * \text{Zeit [min]} * 480/550}$$

Da beim Umsatz des Substrats rT3, aufgrund der freien Drehbarkeit um die Etherbindung, mit gleicher Wahrscheinlichkeit sowohl  $^{125}\text{I}$  als auch nicht radioaktives Iodid freigesetzt wird steht im Zähler der Faktor 2. Da nur 480  $\mu\text{l}$  von 550  $\mu\text{l}$  des Überstandes über die Säulen gereinigt wird, wird auch dieser Faktor mit in die Berechnung einbezogen. Die Konzentration an nicht markiertem Substrat richtet sich nach der zu erwartenden Aktivität des entsprechenden Isoenzym. Die Menge an radioaktiv markiertem Substrat (spezifische Aktivität: 27 bis 40 MBq/ $\mu\text{g}$ ) ist im Vergleich zum kalten Substrat vernachlässigbar klein, so dass dieser Faktor nicht mit in die Berechnung der Aktivität einbezogen wird.

### 2.3.8 Western-Blot

Der Western-Blot ist eine Kombination von hochauflösender Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen und immunologischem Nachweis, der eine spezifische Detektion von Proteinen auch in geringsten Konzentrationen erlaubt [60]. Nach Beendigung der Gel-Elektrophorese werden in einem zweiten elektrophoretischen Schritt, dem Blotten, die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, um die Proteine für Antikörper zugänglich zu machen und sie zu immobilisieren. Der Nachweis erfolgt mit einem zweiten Antikörper und einer enzymatischen Reaktion.

#### 2.3.8.1 SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

Das Trenngel wurde auf Basis von MDE-Gel-Lösung, einer Polyacrylamid-ähnlichen Matrix, hergestellt:

MDE-Lösung (Bio Whittaker Mol. Appl., Rockland, ME, USA)	3,6 ml
Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8)	3,0 ml

SDS 10 %	120 µl
H <sub>2</sub> O	5,215 ml

Nach Zugabe von 60 µl 40%igem Ammoniumperoxodisulfat (APS) zum Starten der radikalischen Polymerisation und 4,8 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Katalysator wurde das Gel luftblasenfrei in den Gießstand gegossen.

Für das Sammelgel wurde eine Lösung angesetzt aus:

MDE-Lösung	750 µl
Tris-HCl 1,0 M (pH 6,8)	650 µl
H <sub>2</sub> O	3,570 ml

25 µl APS und 5 µl TEMED wurden dazugegeben wie oben beschrieben. Anschließend wurde die Sammelgellösung auf das Trenngel gegeben.

Die Proben mit einem Proteingehalt zwischen 10 und 20 µg wurden mit Roti-Load 4fach Probenpuffer (Roth, Karlsruhe) versetzt, anschließend 5 Minuten in kochendem Wasser denaturiert und auf Eis gelagert. Zur Elektrophorese wurden die auspolymerisierten Gelplatten in die Zellen eingesetzt und mit Laufpuffer bedeckt, bestehend aus:

Glycin	192 mM
Tris	25 mM
SDS	0,1 %

Als Proteinmarker wurde Sigma P-1677 prestained eingesetzt, eine Mischung aus folgenden sechs vorgefärbten Proteinen:

Protein	Molekularmasse	Molekularmasse mit Berücksichtigung d. Farbstoffs
β-Galaktosidase	116 kDa	126 kDa
Fructose-6-Phosphat-Kinase	84 kDa	102 kDa
Pyruvatkinase	58 kDa	81 kDa
Ovalbumin	45 kDa	53,5 kDa
Laktatdehydrogenase	36,5 kDa	37 kDa
Triosephosphat-Isomerase	26,6 kDa	31,4 kDa

**Tabelle 1: Zusammensetzung des Protein-Markers Sigma P-1677 prestained**

Bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, wurde eine Spannung von 110 V angelegt. Danach wurde auf 200 V erhöht, bis die Markerbande den unteren Gelrand erreichte.

### 2.3.8.2 Elektroblot

Für den Blot wurde eine verstärkte Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 85, 0,45 µm (Schleicher und Schuell, Dassel) verwendet. Gel und Membran wurden luftblasenfrei zwischen zwei mit Transferpuffer getränkten Whatman-Filtern und zwei Schaumstoffpads in die Halterung eingelegt und in die mit Transferpuffer gefüllte Elektroblotapparatur eingesetzt.

Zusammensetzung der Transferpuffer-Stammlösung (10fach konzentriert):

Tris	0,25 M
Glycin	1,9 M
pH 10,0	mit NaOH-Plätzchen einstellen

Zusammensetzung der Transferpuffer-Gebrauchslösung:

Transferpuffer-Stammlösung	100 ml
Methanol	200 ml
H <sub>2</sub> O	700 ml

Der Elektroblot wurde für zwei Stunden unter ständiger Kühlung bei einer Spannung von 20 V mit einer Stromstärke von 300 mA durchgeführt. Die geblotteten Banden wurden anschließend durch eine Ponceau S-Färbung überprüft.

Zusammensetzung der Ponceau S-Stammlösung:

Ponceau S	2 g
Trichloressigsäure	30 g
Sulfosalicylsäure	30 g
H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Um eine Gebrauchslösung herzustellen, wurde die Ponceau S-Stammlösung 1:10 mit Wasser verdünnt. Darin wurde die Membran 5 bis 10 Minuten leicht geschwenkt, dann mit entsalztem Wasser gewaschen, zwischen Folie gelegt und zur Dokumentation am Densitometer fotografiert. Um freie Plätze auf der Membran als nicht erwünschte potenzielle Bindungsstellen für später zugegebene Reagenzien zu blockieren, wurde die



Membran nun 2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockierungslösung geschwenkt, bestehend aus:

BSA	2,5 %
Magermilchpulver	2,5 %
Pferdeserum	2,0 %
Tween-20 0,1 % in PBS	ad 100 ml

Anschließend wurde mit dem ersten, mit Inkubationslösung 1 im Verhältnis 1:750 verdünnten SePP-Antikörper rP2 bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Antikörper vier mal 10 Minuten mit einer Lösung aus 1,0 % BSA, 1,0 % Magermilchpulver, 1,0 % Pferdeserum und Waschlösung 1 ad 200 ml abgewaschen und die Membran mit dem zweiten Antikörper anti-rabbit-IgG Peroxidase-Konjugat (Sigma) (1:2000 in Inkubationslösung 2 verdünnt) eine Stunde bei 4°C inkubiert. Abschließend wurde nochmals vier mal 10 Minuten mit einer Lösung aus 1,0 % BSA, 1,0 % Magermilchpulver, 1,0 % Pferdeserum und Waschlösung 2 ad 200 ml gewaschen.

Zusammensetzung der Inkubationslösung 1:

BSA	1,0 %
Magermilchpulver	1,0 %
Pferdeserum	1,0 %
Tween-20 0,1 % in PBS	ad 6 ml

Zusammensetzung der Waschlösung 1

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA (pH 8,0)	2 mM
Triton X-100	0,1 %
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

Zusammensetzung der Inkubationslösung 2

BSA	1,0 %
Magermilchpulver	1,0 %
Pferdeserum	1,0 %
Tween-20 0,1 % in PBS	ad 40 ml

#### Zusammensetzung der Waschlösung 2

Tris-HCl (pH 7,5)	10 mM
NaCl	1 mM
EDTA (pH 8,0)	2 mM
Triton X-100	0,1 %
H <sub>2</sub> O	ad 1000ml

Zur Detektion wurde zunächst eine Reagenzlösung hergestellt aus:

ECL-Lösung I	5 ml
ECL-Lösung II	5 ml
Tween-20 0,05 % in PBS	ad 40 ml

Die Membran wurde für eine Minute mit der Reagenzlösung bedeckt. Nach dem Abtropfen wurde die Membran luftblasenfrei zwischen Folie gelegt, ein KODAK X-OMAT-Film (Weisser, München) wurde aufgelegt und anschließend in der Photomaschine entwickelt.

### **2.3.9 RT-PCR**

Die RT-PCR ist ein Verfahren, mit dem man durch reverse Transkription aus isolierter RNA eine DNA mit komplementärer Sequenz (cDNA) erzeugen kann. In einer Polymerase-Kettenreaktion können dann spezifische Target-Sequenzen nachgewiesen werden.

#### **2.3.9.1 RNA-Isolierung mit RNeasy-Säulchen von Qiagen**

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA wurden die XTC-Zellen zunächst zweimal mit autoklaviertem PBS gewaschen, gründlich abgesaugt und mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen nach Protokoll des Herstellers verarbeitet. Dabei wurde auf RNase-freies Arbeiten geachtet.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe der RNA mit H<sub>2</sub>O im Verhältnis 1:49, 1:99 und 1:199 hergestellt und mit dem RNA-Programm des Photometers in einer Quarzküvette nach Einstellung des Nullwerts durch H<sub>2</sub>O gemessen. Aus den vom Photometer ermittelten Werten wurde dann die RNA-Konzentration berechnet (XTC-RNA: 0,66 mg/ml).

### 2.3.9.2 Reverse Transkription

Zu 5 µg Gesamt-RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser wurde 1 µl Oligo-dT gegeben (12 bis 18 bp), ein Poly-A-Strang, der als unspezifischer Primer vor allem mRNA erkennt. Durch 10minütige Inkubation bei 70°C und nachfolgender rascher Abkühlung auf Eis wurde die RNA linearisiert. Anschließend wurden pro Ansatz

5-fach First Strand Buffer	4 µl
DTT 0,1 M	2 µl
Desoxyribonukleotide (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM)	1 µl
RNase Out Inhibitor	1 µl

zupipettiert und für 2 Minuten bei 42°C vorinkubiert. Die Reverse Transkription wurde durch Zugabe von 200 U Superscript Reverser Transkriptase gestartet und bei 42°C für 50 Minuten inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der gleiche Ansatz ohne Transkriptase inkubiert. Um das Enzym zu denaturieren wurde die Reaktion anschließend für 15 min auf 72°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Als Positivkontrollen wurde entweder cDNA aus FTC 133-Zellen oder cDNA aus einem Gemisch verschiedener nicht maligner Strumen verwendet. Die cDNA für die Positivkontrollen wurde freundlicherweise von Sarah Kaufmann zur Verfügung gestellt.

### 2.3.9.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die so hergestellte cDNA wurde in der Polymerasekettenreaktion vervielfältigt [61, 62].

Ein PCR-Ansatz enthielt in einem Endvolumen von 50 µl:

Template-cDNA	4 µl der 1:6 verdünnten cDNA
Primer sense/antisense	jeweils 25 pmol
10-fach Puffer	5 µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	je 0,2 mM
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
Taq-Polymerase (Qiagen)	0.25 µl

Der Ansatz wurde zunächst für 300 s auf 94°C erhitzt, anschließend wurde die DNA in 15 bis 30 Zyklen der Abfolge [45s, 94°C; 45s, T°C; 45 s, 72°C], einmalig 300 s, 72°C amplifiziert. Die Annealingtemperatur T wurde im allgemeinen 1-2°C unter der

Schmelztemperatur des Primers gewählt. Tab. 3 gibt eine Übersicht der verwendeten Primerkombinationen, der Produktlängen, der Annealingtemperaturen sowie der Konzentration an  $MgCl_2$ .

#### **2.3.9.4 Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel**

Zur Analyse wurden die DNA Fragmente durch Elektrophorese im mit Ethidiumbromid (5,0  $\mu$ l pro ml Gel) gefärbten Agarosegel aufgetrennt, je nach erwarteter Produktlänge wurden dabei 1 % oder 2 % Agarose in TBE 0,5 % verwendet. Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und fluoresziert im UV-Licht bei 254 nm Wellenlänge. Nach Auspolymerisation wurde das Gel in die Kammer überführt und mit TBE 0,5% als Laufpuffer bedeckt. 10  $\mu$ l PCR-Produkt wurden mit 2,5  $\mu$ l 6x-Loading buffer versetzt und vorsichtig in die Geltaschen aufgetragen, zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde ein 100-bp-DNA-Längenmarker (Life Technologies) verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei 100 V und 150 mA. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht photographiert.

Gen	Primerkombination	Produktlänge	Annealingtemp. 'T'	MgCl <sub>2</sub> -Konzentration
β -Aktin <sup>1</sup>	β-Aktin1 β-Aktin 2	661 bp	60°C, 35 Zyklen	--
GAPDH <sup>1</sup>	GAPDH 1 GAPDH 2	600 bp	60°C, 35 Zyklen	--
Glut 1 <sup>2</sup>	RW 21 RW 22	723 bp	62°C, 35 Zyklen	--
Thyreoglobulin <sup>2</sup>	Tg1 Tg2	280 bp	62°C, 35 Zyklen	--
Thyreoglobulin <sup>3</sup>	Tal1 Tal2i	160 bp	Touchdown: 63-55°C -1°C/Zykl., 40 Zyklen	--
DI <sup>4</sup>	C 52 B 63	605	56°C, 40 Zyklen	2,0 mM
DII <sup>5</sup>	RW 2 RW 9	796 bp	58°C, 35 Zyklen	--
TSH-Rezeptor <sup>6, 7</sup>	hTSHr2 hTSHr3	310 bp	55°C, 40 Zyklen	2,0 mM
NIS <sup>8</sup> <i>NIS II</i> <sup>9</sup>	CR 11 CR 12 CR 13 CR 14	678	60°C, 35 Zyklen  60°C, 35 Zyklen	
RAR α <sup>10</sup>	RAR α 1 RAR α 2	600 bp	64°C, 35 Zyklen	--
RAR β <sup>10</sup>	RAR β 1 RAR β 2	600 bp	64°C, 35 Zyklen	--
RAR γ <sup>10</sup>	RAR γ 1 RAR γ 2	600 bp	64°C, 35 Zyklen	--

**Tabelle 2: Verwendete Primerkombinationen, Produktlängen, Annealingtemperaturen und MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen bei der Amplifikation der untersuchten Gene.**

<sup>1</sup> Stratagene

<sup>2</sup> Ralf Winzer, RT-PCR-Nachweis schilddrüsen-spezifischer Gene in menschlichen Schilddrüsen-gewebe und Zelllinien. Inauguraldissertation, Würzburg, 2000

<sup>3</sup> Tallini G., Ghossein R.A., Emanuel J., Gill J., Kinder B., Dimich A.B., Costa J., Robbins R., Burrow G.N., Rosai J. (1998) Detection of thyroglobulin, thyroid peroxidase, and RET/PTC1 mRNA transcripts in the peripheral blood of patients with thyroid disease. J. Clin. Oncol. 16 (3): 1158-1166

<sup>4</sup> Barbara Rüger, Etablierung der quantitativen Analyse von schilddrüsenrelevanten Genen in humanem Biopsiematerial und Zelllinien. Inauguraldissertation, Würzburg, 2002

<sup>5</sup> Ralf Winzer, RT-PCR-Nachweis schilddrüsen-spezifischer Gene in menschlichen Schilddrüsen-gewebe und Zelllinien. Inauguraldissertation, Würzburg, 2000

<sup>6</sup> Nagayama, Y., Kaufman, K.D., Seto, P. and Rapoport, B. (1989) Molecular cloning, sequence, and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1184-1190

<sup>7</sup> Libert, F., Lefort, A., Gerard, C., et al. (1989) Cloning, sequencing, and expression of the human thyrotropin (TSH) receptor: evidence for binding of autoantibodies. Biochem. Biophys. Res. Commun. 165, 1250-1255

<sup>8</sup> Cornelia Schmutzler, unveröffentlicht

<sup>9</sup> Cornelia Schmutzler, unveröffentlicht

<sup>10</sup> Rosewicz S, Brembeck F, Kaiser A, Marschall ZV, Riecken EO. Differential growth regulation by all-trans retinoic acid is determined by protein kinase C alpha in human pancreatic carcinoma cells. Endocrinology. 1996 Aug;137(8):3340-7

## **3 ERGEBNISSE**

### **3.1 NACHWEIS VON SELENOPROTEINEN IN XTC-ZELLEN NACH STIMULATION MIT $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ - BZW. ALL-TRANS-RETINSÄURE**

Die Aktivitäten der Glutathionperoxidasen, Thioredoxinreduktasen und Deiodasen in XTC-Zellen nach Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  wurden in Abhängigkeit von Stimulationszeit und Selenit-Konzentration im Medium bestimmt. Außerdem wurde der Effekt von all-trans-Retinsäure (all-trans-RA) allein und in Kombination mit Selenit untersucht.

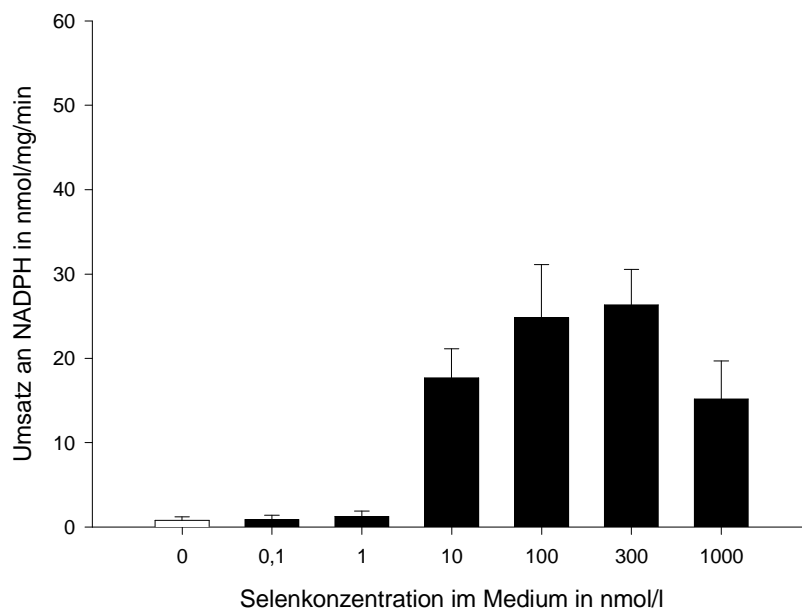
#### **3.1.1 Glutathionperoxidaseaktivitäten**

Die Konzentrationsabhängigkeit der Glutathionperoxidase-(GPx-)aktivität zeigt einen deutlichen, hochsignifikanten Anstieg ab  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ -Konzentrationen von 10 nmol/l. Zwischen 100 bis 300 nmol/l wird ein Plateau erreicht, bei 1000 nmol/l fällt die Kurve bereits wieder ab. Bei 100 nmol/l ergibt sich ein Stimulationsfaktor auf das 30,9-fache im Vergleich zur Kontrolle.

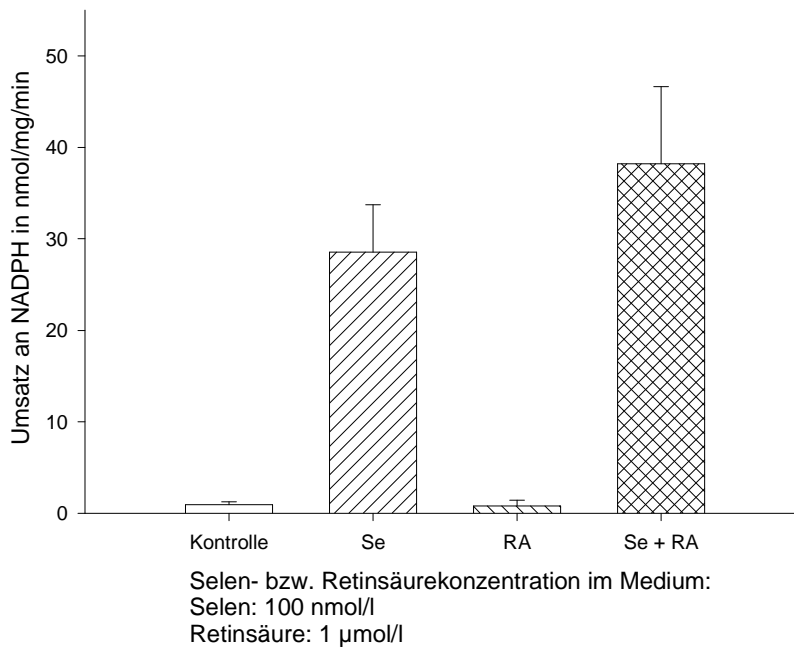
Stimulation der Zellen mit all-trans-RA alleine in Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  bewirkt nach 72 h keinen Aktivitätsanstieg der GPx. In Kombination mit Natriumselenit ergibt sich zwar eine etwas höhere Aktivität im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit Natriumselenit, der Unterschied ist aber nicht signifikant.

In der Kinetik nimmt die Enzymaktivität bereits nach 24 Stunden Stimulation mit 100 nmol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  deutlich zu. In den folgenden Tagen steigt die Kurve weiterhin kontinuierlich an. Nach 96 Stunden erfolgte für die noch nicht geernteten Zellen ein Mediumwechsel, ab diesem Zeitpunkt nimmt die Steilheit des Kurvenanstiegs nochmals zu. Die depletierten und nicht stimulierten XTC-Proben zeigen keine nennenswerte Enzymaktivität.

Auch in konditioniertem Medium von XTC-Zellen kann eine von Dosis und Zeit der Selenitstimulation abhängige Zunahme der Enzymaktivität qualitativ nachgewiesen werden. Einer vorsichtigen Schätzung zufolge beträgt der ins Medium sezernierte Anteil etwa 5 bis 10 % der in den Zellen enthaltenen Enzymmenge.

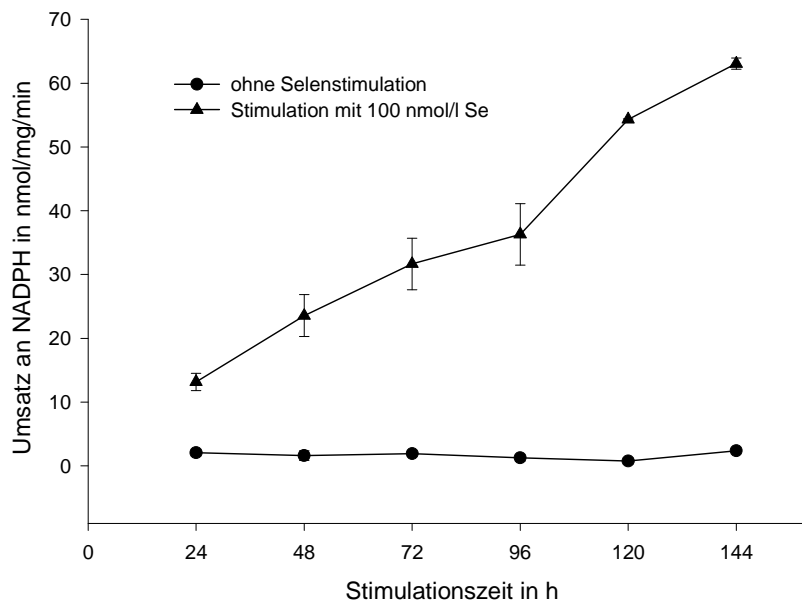


**Abbildung 2: Dosis-Wirkungs-Beziehung der GPx-Aktivität in XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .**

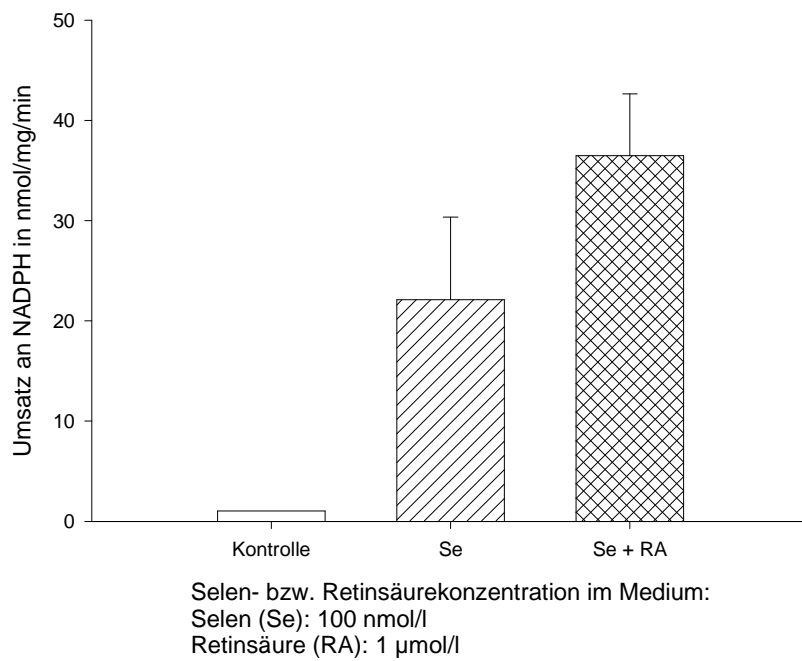


**Abbildung 3: GPx-Aktivität in XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bzw. all-trans-RA.**

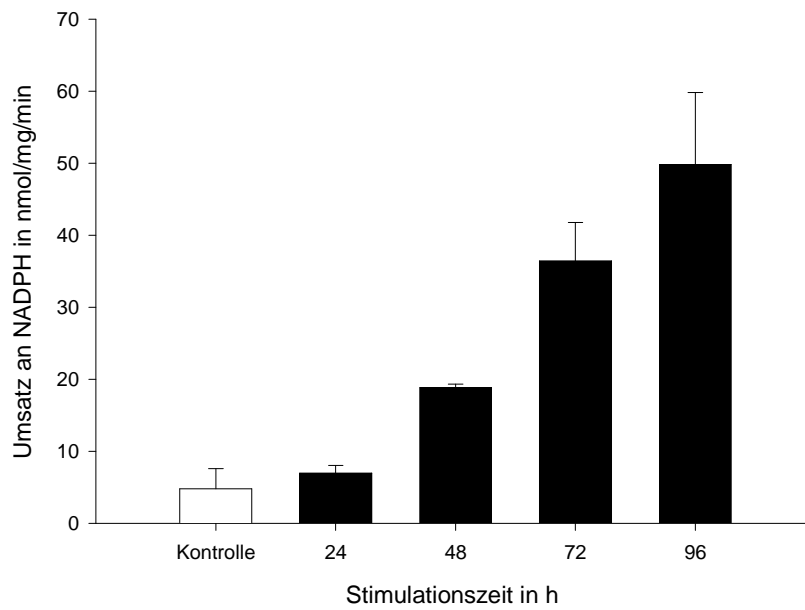




**Abbildung 4: Kinetik der GPx-Aktivität in XTC-Zellen nach Stimulation mit 100 nmol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .**



**Abbildung 5: GPx-Aktivität in konditioniertem Medium von XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bzw. all-trans-RA.**



**Abbildung 6: Kinetik der GPx-Aktivität in konditioniertem Medium von XTC-Zellen nach 24 bis 96 h Stimulation mit 100 nmol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .**

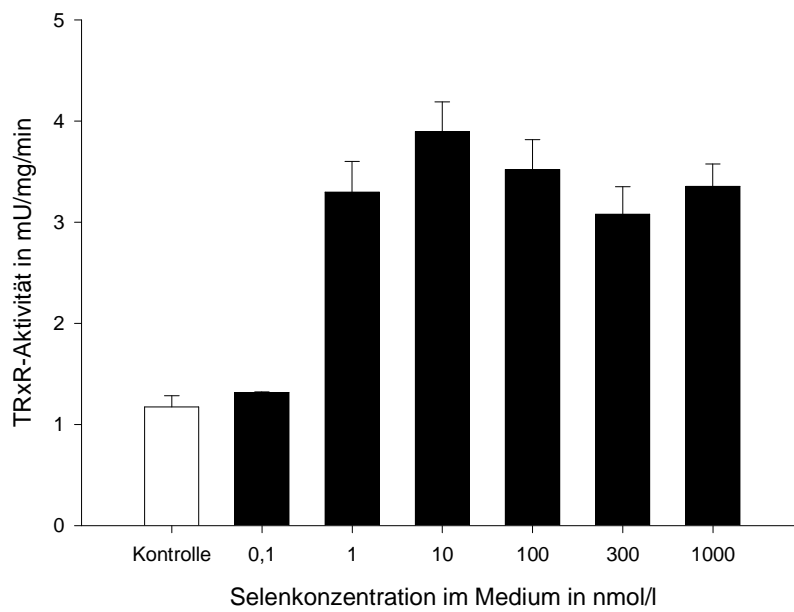
### 3.1.2 Thioredoxinreduktaseaktivitäten

Die Thioredoxinreduktasen zeigen in ihrer Aktivität ebenfalls eine klare Selenitabhängigkeit. In der Dosis-Wirkungs-Kurve liegt hier nicht wie bei den Glutathionperoxidasen ein kontinuierlicher Anstieg vor. Stattdessen werden bereits ab Natriumselenitkonzentrationen von 1 nmol/l maximale Aktivitäten erreicht. Diese halten sich auf einem Plateau ohne nennenswerten Abfall bis zu Konzentrationen von 1000 nmol/l. Der Stimulationsfaktor der Probe mit 100 nmol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  in Bezug auf die Kontrolle beträgt nach 72 h 3,0.

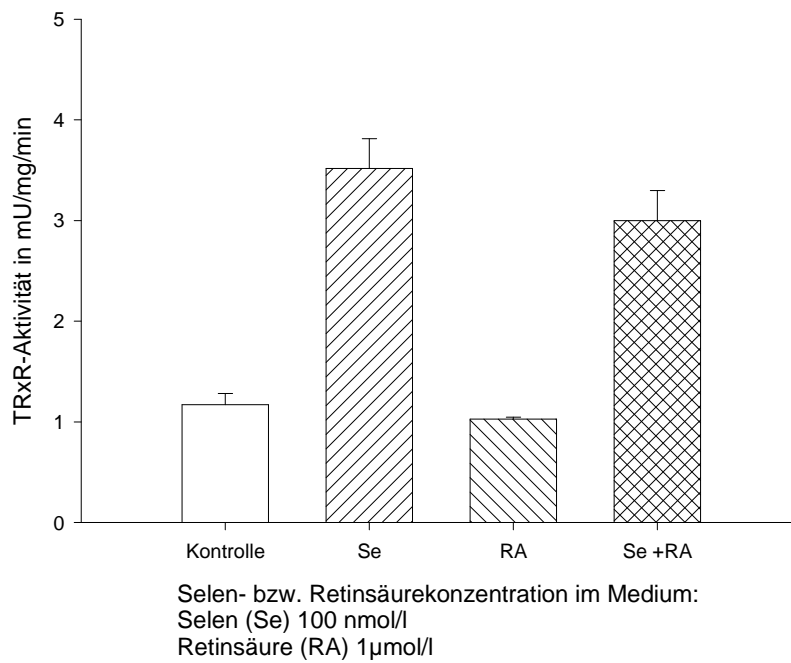
Weder Stimulation der Zellen mit all-trans-RA alleine in Konzentration von 1  $\mu\text{mol/l}$  noch die Kombination mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bewirkt nach 72 h einen Aktivitätsanstieg der TrxR im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle.

In der Kinetik beobachtet man schon nach 24 h Stimulation mit 100 nmol/l  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  einen deutlichen Aktivitätszuwachs von 1,04 mU/mg/min in der Kontrolle auf 2,65, entsprechend einem Stimulationsfaktor von 2,5. Danach steigt die Aktivität der stimulierten Zellproben nur noch unwesentlich an, die Enzymaktivitäten der Kontrolle hingegen fallen leicht ab.

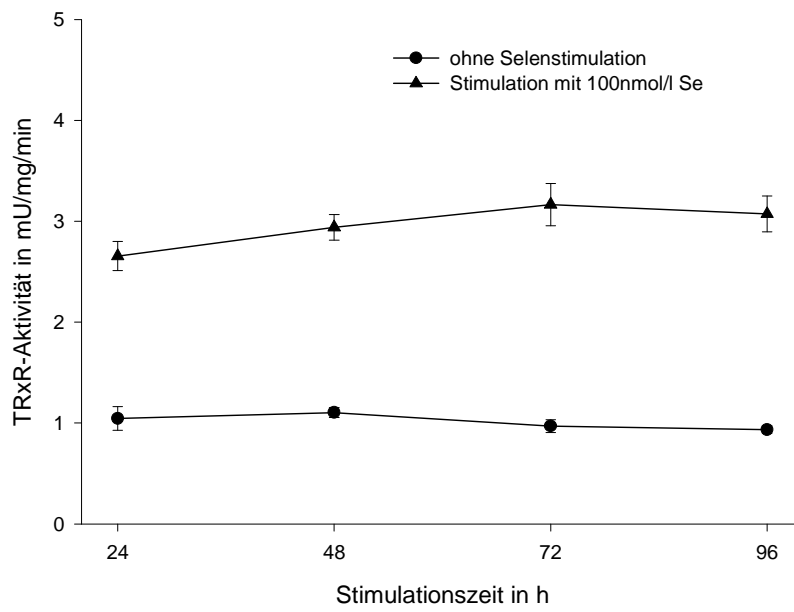
Die Daten legen auch für die Thioredoxinreduktasen einen Anstieg der Enzymaktivitäten in konditioniertem Medium nahe. In der Kinetik ist ein deutlicher Anstieg im Gegensatz zu den Zellextrakten allerdings erst nach 96 Stunden zu beobachten. In der Dosisabhängigkeitskurve steigt die Aktivität im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration 10 nmol/l an. Der Anteil der sezernierten Thioredoxinreduktasen im Vergleich zu der in den Zellen enthaltenen Menge beträgt einer groben Abschätzung zufolge etwa 10 bis 20 %.



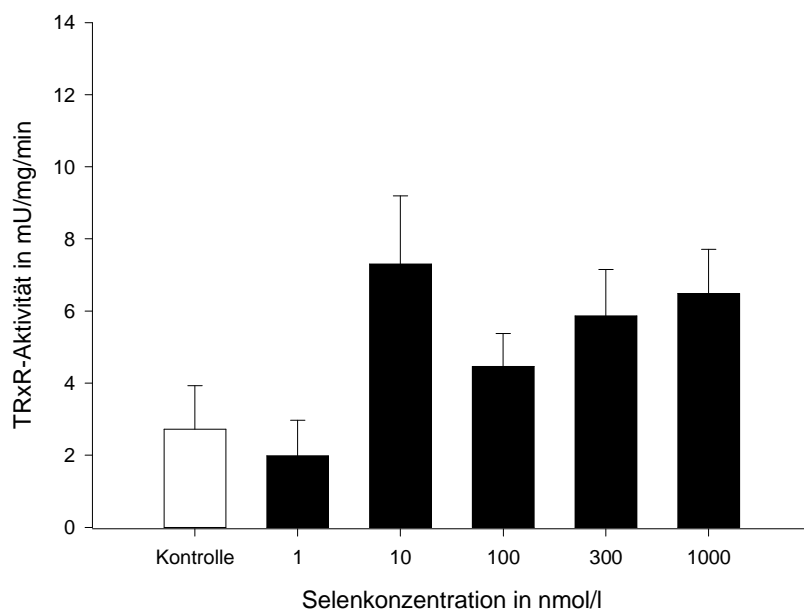
**Abbildung 7: Dosis-Wirkungs-Beziehung der TRxR-Aktivität in XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .**



**Abbildung 8: TRxR-Aktivität in XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bzw. all-trans-RA.**

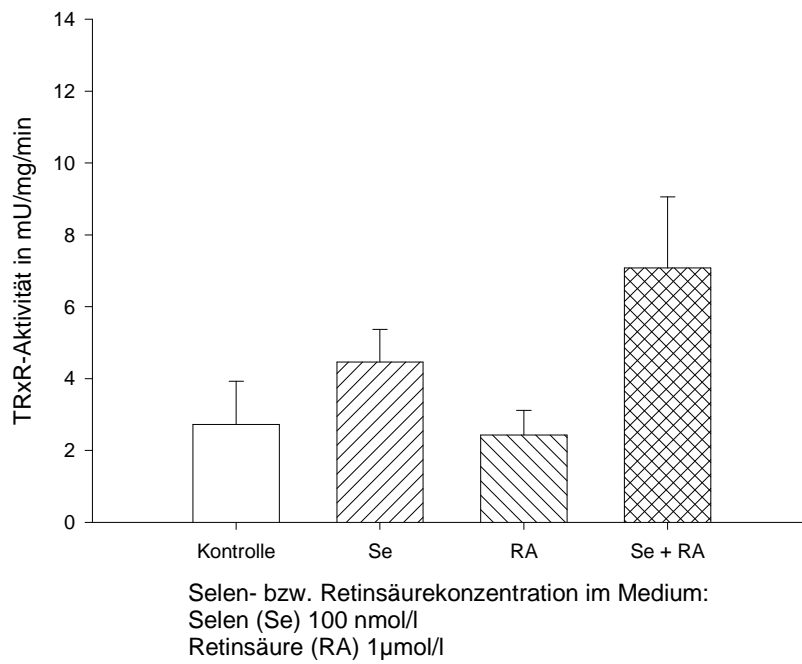


**Abbildung 9: Kinetik der TRxR-Aktivität in XTC-Zellen nach 24 bis 96 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .**

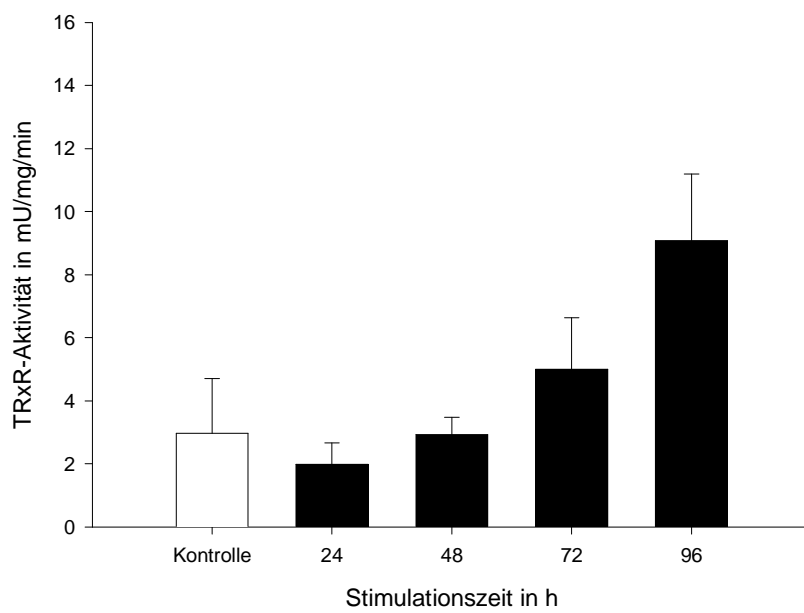


**Abbildung 10: Dosis-Wirkungs-Beziehung der TRxR-Aktivität in konditioniertem Medium von XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .**





**Abbildung 11: TRxR-Aktivität in konditioniertem Medium von XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bzw. all-trans-RA.**



**Abbildung 12: Kinetik der TRxR-Aktivität in konditioniertem Medium von XTC-Zellen nach 24 bis 96 h Stimulation mit 100 nmol/ Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>.**

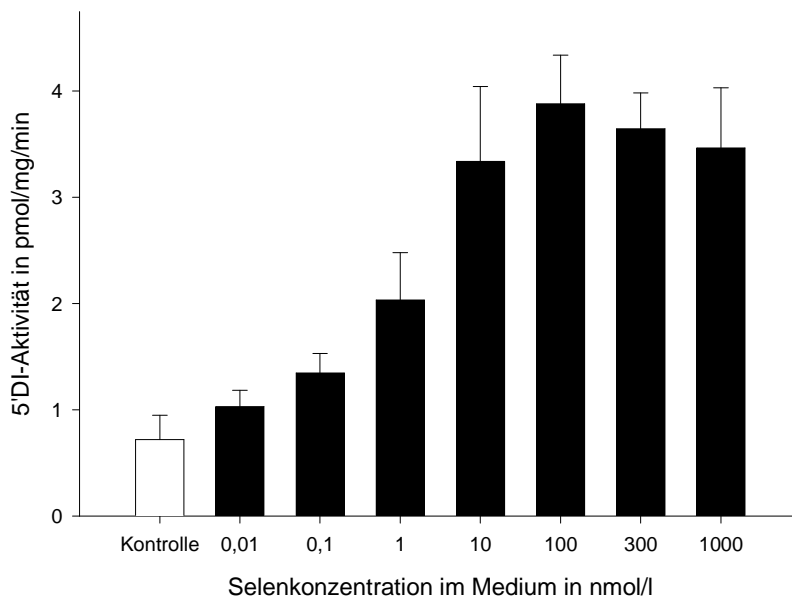
### 3.1.3 5'-Deiodase Typ 1-Aktivitäten

Die Aktivität der 5'-Deiodase Typ 1 (5'DI) wurde bei frühen und späten Passagenzahlen der XTC-Zellen gesondert gemessen. In frühen Passagen (21 bis 23) zeigt die 5'DI ebenfalls eine deutliche Abhängigkeit von der Natriumselenitkonzentration im Medium. Bereits nach 24 h steigt die Enzymaktivität von im Mittel 818,7 in der Kontrolle auf 1369,2 pmol/mg/min signifikant an, entsprechend einem Stimulationsfaktor von 1,7. Das Maximum von durchschnittlich 3880,0 pmol/mg/min (Kontrolle: 718,4 pmol/mg/min; Stimulationsfaktor 5,4) wird nach 72 h erreicht, danach fallen die Aktivitäten leicht ab. Die Aktivität der nicht stimulierten Proben nimmt nach 96 h auf 40 % des Wertes bei 24 h ab.

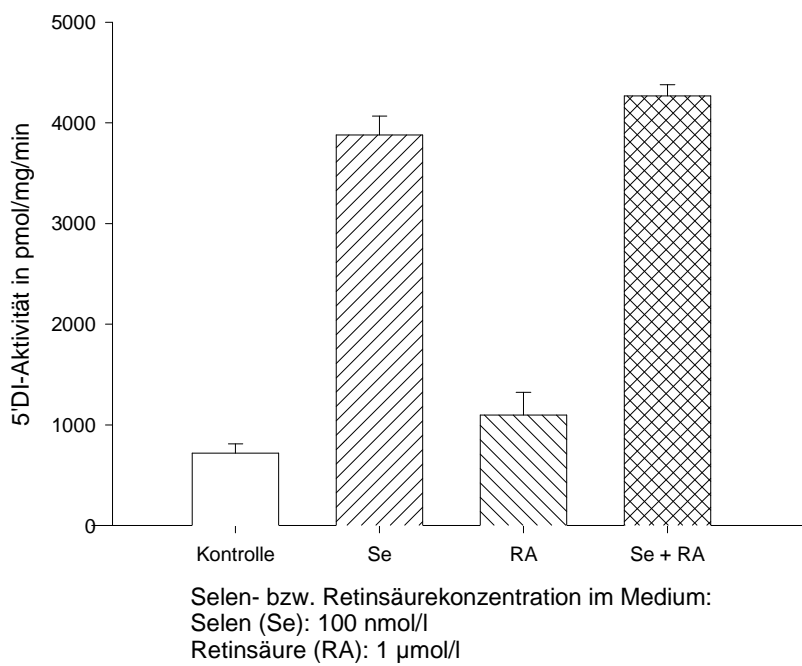
Bei höheren Passagenzahlen jedoch, zwischen 28 und 31, ist durch Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  gleich welcher Konzentration kein Effekt mehr zu erzielen. Auch die Absolutwerte der 5'DI-Aktivität erreichen dann nur noch etwa 8 % der Aktivität von Zellen mit niedriger Passagenzahl. Bei Stimulation mit all-trans-RA allerdings kann man eine leichte Steigerung verzeichnen. In Kombination mit 100 nmol/l Selen steigert sich die Aktivität sogar auf das 23,5-fache der Kontrolle.

Die Aktivitäten der anderen Selenoenzyme (GPx und TRxR) sinken weder im zeitlichen Verlauf derartig ab noch lässt sich eine signifikante Steigerung bei der Stimulation mit all-trans-RA mit oder ohne Kombination mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  erzeugen.

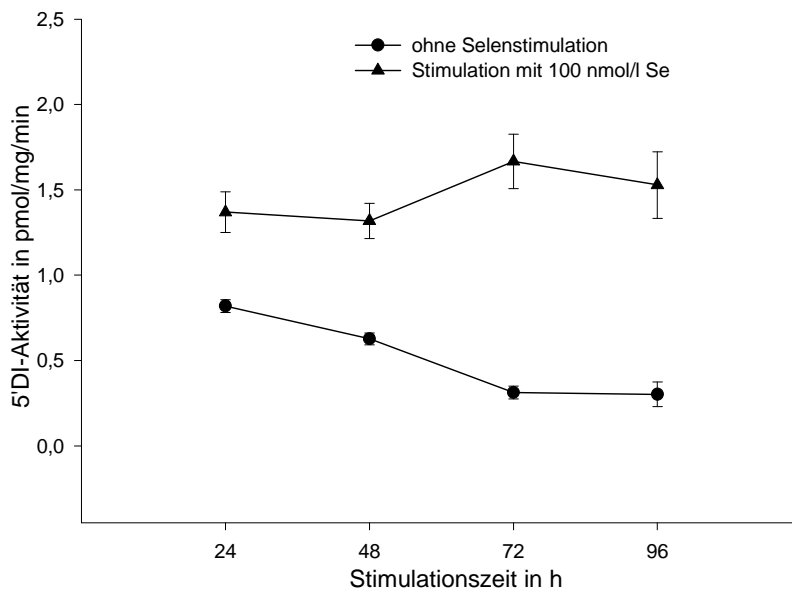
Bei Zellen mit weniger Passagen (zum Zeitpunkt des Versuchs zwischen 21 und 23) ist in der Dosis-Wirkungs-Kurve der Zuwachs an 5'DI-Aktivität bereits ab einer Selenitkonzentration von 0,1 nmol/l signifikant. Der Stimulationsfaktor erreicht bei 100 nmol/l Selen mit einem 5,4-fachen Wert im Vergleich zur Kontrolle sein Maximum, darüber hinaus sinken die Enzymaktivitäten wieder leicht ab.



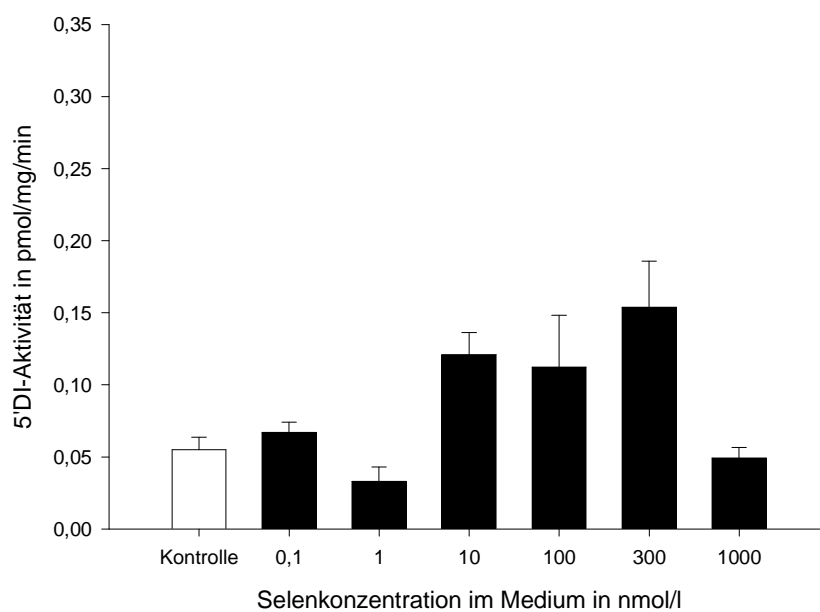
**Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Beziehung der 5'DI-Aktivität in XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bei niedriger Passagenzahl.**



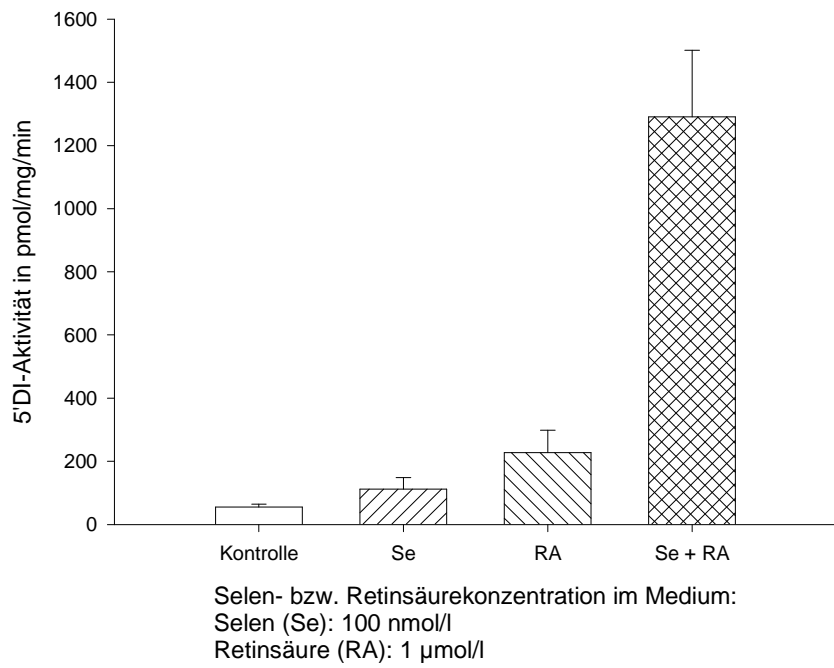
**Abbildung 14: 5'DI-Aktivität in XTC-Zellen nach 72 h Stimulation mit Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> bzw. all-trans-RA bei niedriger Passagenzahl.**



**Abbildung 15: Kinetik der 5'DI-Aktivität in XTC-Zellen nach 24 bis 96 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  bei niedriger Passagenzahl.**



**Abbildung 16: Dosis-Wirkungs-Beziehung der 5'-DI-Aktivität XTC-Zellen mit höheren Passagenzahlen nach 72 h Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ .**

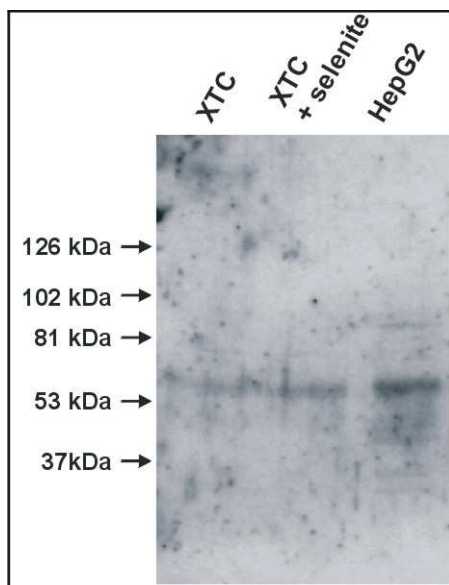


**Abbildung 17: 5'DI-Aktivität in XTC-Zellen mit höheren Passagen-  
zahlen nach 72 h Stimulation mit Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> bzw. all-trans-RA.**



### 3.1.4 Selenoprotein P

In der Western Blot-Analyse von konditioniertem Medium mit SePP-spezifischem Antikörper ist eine Bande bei 65 kD nachweisbar. Diese liegt auf der selben Höhe wie die Positivkontrolle aus Extrakten der Hepatokarzinomzelllinie HepG2. Zwischen Selenit-stimulierten und nicht stimulierten XTC-Zellen besteht kein deutlicher Unterschied.



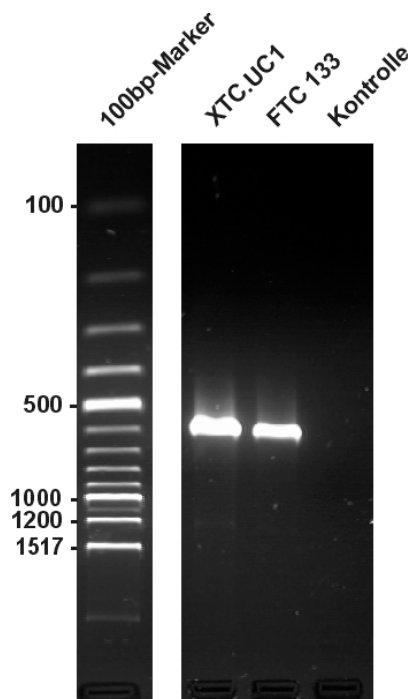
**Abbildung 18: Nachweis von Selenoprotein P aus konditioniertem Medium mittels Western Blot.**

### 3.2 ERGEBNISSE DER RT-PCR

Weiterhin soll im Rahmen der Arbeit geklärt werden, inwieweit XTC-Zellen ein schilddrüsenpezifisches Muster der Genexpression aufweisen. Hierzu wurden die Zellen auf die mRNA verschiedener Proteine, die typischerweise in differenzierten Schilddrüsenzellen exprimiert werden, mittels RT-PCR untersucht.

#### 3.2.1 GAPDH und $\beta$ -Aktin

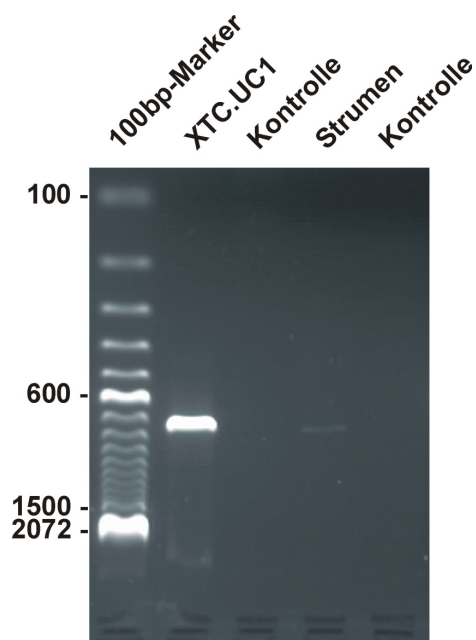
Um die erfolgreich gelungene RNA-Isolierung und cDNA-Synthese zu überprüfen, wurden die Proben auf die Expression von  $\beta$ -Aktin und Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) untersucht. Diese sogenannten „house-keeping“-Proteine sind in jeder menschlichen Zelle vorhanden. In der PCR zeigt sich auch für XTC-Zellen eine deutliche Expression der beiden mRNAs. (Aktin nicht gezeigt.)



**Abbildung 19: Nachweis von GAPDH-mRNA-Transkripten aus XTC-Zellen mittels RT-PCR.**

### 3.2.2 Glucose-Transporter Typ 1

Der Typ 1-Glucose-Transporter (Glut 1) ist normalerweise in den meisten Zelltypen [63, 64] exprimiert, nicht jedoch in gesunder Schilddrüse [65]. In verschiedenen Tumoren des Kopf- und Halsbereiches [66], der Haut [67] und verschiedenen anderen malignen Neoplasien [68, 69] konnte eine erhöhte Expression gezeigt werden. In XTC-Zellen ist das Glut1-Amplicon als Bande bei 723 Basenpaaren wesentlich ausgeprägter zu sehen als in der zur Kontrolle eingesetzten cDNA aus verschiedenen nicht malignen Strumen.



**Abbildung 20: Nachweis von mRNA-Transkripten des Glucosetransportproteins Glut1 in XTC-Zellen durch RT-PCR.**

### 3.2.3 Thyreoglobulin, TSH-Rezeptor und Natrium-Iodid-Symporter

Um die schilddrüsen-spezifischen Syntheseleistungen der Zellen zu überprüfen, wurden sie auf die Expression von Thyreoglobulin(Tg)-, Natrium-Iodid-Symporter(NIS)- und TSH- Rezeptor(TSHr)-mRNA hin untersucht. Wie bei Zielke et al. beschrieben, lassen sich Thyreoglobulin und der TSH-Rezeptor als deutliche Bande in der PCR nachweisen. Der Nachweis des Natrium-Iodid-Symporters in XTC-Zellen gelingt nicht, ebenfalls in Einklang mit Zielke et al. [53]. (TSHr und NIS nicht gezeigt.)

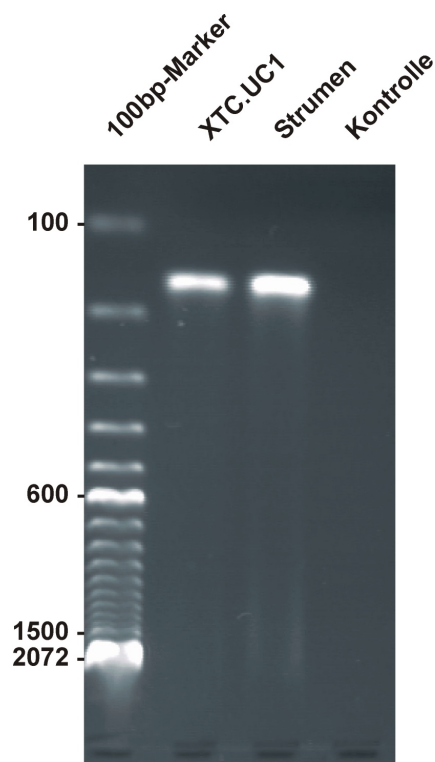
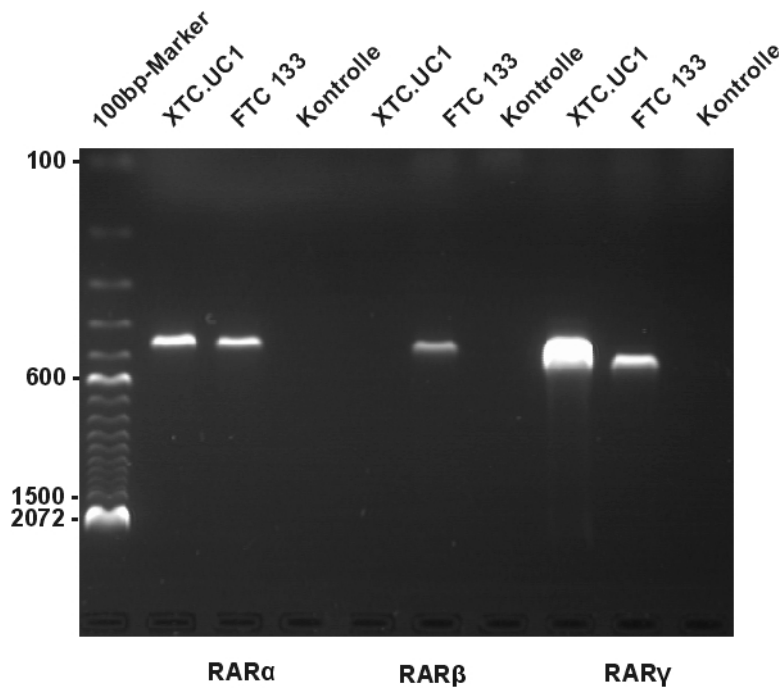


Abbildung 21: Nachweis von mRNA-Transkripten für Thyreoglobulin aus XTC-Zellen mittels RT-PCR.

### 3.2.4 RA-Rezeptoren

In der RT-PCR kann die Expression von mRNA der Retinsäurerezeptoren RAR  $\alpha$  und RAR  $\gamma$  in XTC-Zellen nachgewiesen werden, RAR  $\beta$ -mRNA hingegen nicht.



**Abbildung 22: Nachweis von mRNA-Transkripten der Retinsäurerezeptoren RAR  $\alpha$  und RAR  $\gamma$  aus XTC-Zellen mittels RT-PCR.**

### 3.2.5 Deiodasen

Das mit Hilfe von 5'DI-spezifischen Primern aus der cDNA von XTC-Zellen amplifizierte Produkt erzeugt in der Gelelektrophorese eine sehr deutliche Bande. Auch Transkripte des Deiodase Typ II-Gens sind in der RT-PCR gut darstellbar.

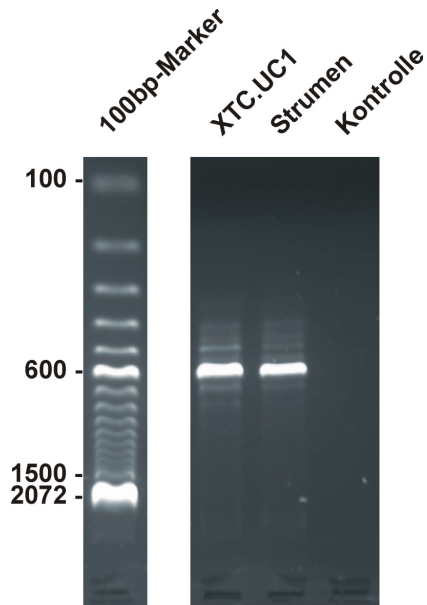


Abbildung 23: Nachweis von mRNA-Transkripten der 5'Deiodase Typ I aus XTC-Zellen mittels RT-PCR.

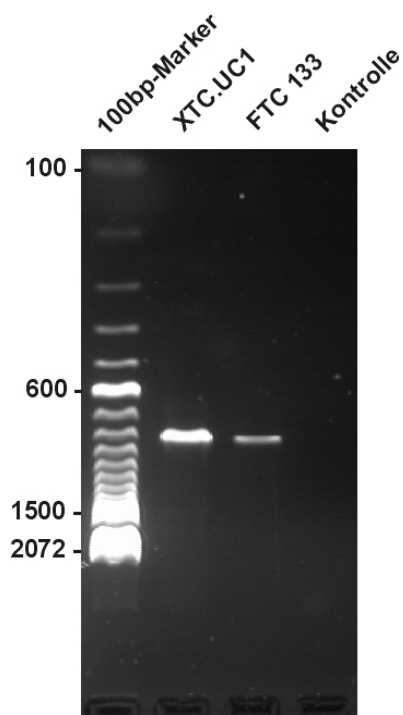


Abbildung 24: Nachweis von mRNA-Transkripten der 5'Deiodase Typ II aus XTC-Zellen mittels RT-PCR.

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 SELEN UND DIE SCHILDDRÜSE**

Das essenzielle Spurenelement Selen ist für die normale Funktion des menschlichen Körpers unerlässlich. Bei Mangelversorgung können sich Selenmangelkrankheiten wie die Kaschin-Beck-Krankheit manifestieren, bei der sich polytope, symmetrische Deformationen der Extremitätengelenke entwickeln. Im Bereich der Schilddrüse, die im menschlichen Körper zu den Organen mit dem höchsten Selengehalt gehört, kann es bei zusätzlichem Iodmangel zum myxödematösen Kretinismus kommen. Ein hoher Selengehalt sowie die Aktivität verschiedener Selenoenzyme sind vor allem in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen, Strumen oder Autoimmunthyreoiditiden stark ausgeprägt. Nebenschilddrüsenadenome und C-Zell-Karzinome hingegen enthalten nur vergleichsweise wenig Selen und geringe Mengen an Selenoproteinen. Dies legt nahe, dass sich das Selen vor allem in den Thyrozyten und den Follikeln befindet [22].

### **4.2 EXPRESSION VON SELENOENZYMEN MIT ANTIOXIDATIVER FUNKTION**

#### **4.2.1 Expression zellulärer Selenoenzyme mit antioxidativer Funktion**

Im Rahmen der Schilddrüsenhormonbiosynthese wird  $H_2O_2$  zur Iodierung der Tyrosylreste des Thyreoglobulins durch die Thyroperoxidase benötigt. Reaktive Folgeprodukte können zu oxidativen Schäden der Zelle und insbesondere der DNA führen. Letzteres wird als wichtiger Faktor im Rahmen der Karzinogenese angesehen, was sowohl für genomische als auch mitochondriale DNA gilt [70]. Mitochondriale ROS stellen überdies eine weitere wichtige Quelle oxidativer Belastung in fast jeder menschlichen Zelle dar [71, 72]. In Hürthle-Zellen dürften sie durch die gesteigerte Menge an Mitochondrien im Übermaß anfallen [15].

Zum Schutz vor ROS sind die Thyrozyten auf effektive Abwehrmechanismen angewiesen. Diese bestehen zum einen in der Kompartimentierung der  $H_2O_2$ -gekoppelten Reaktionen außerhalb der Thyrozyten und innerhalb des Follikellumens an der apikalen Zytoplasmamembran. Zum anderen schützen sich die Zellen durch  $H_2O_2$ -abbauende Enzyme wie Katalase und Glutathionperoxidase. Bisher wurde die Expression von drei der vier GPx-Isoenzyme in der Schilddrüse nachgewiesen, nämlich die der cGPx, der

pGPx und der PH-GPx, die beiden letzteren zumindest in Northern Blot und RT-PCR [22]. Zudem kann sowohl die cGPx, die pGPx und die PH-GPx als auch SePP in In-situ-Hybridisierungen von Schilddrüsengewebe nachgewiesen werden, wobei sämtliche Enzyme in den Thyrozyten exprimiert werden [73]. Auch anderen Selenoproteinen wie der Thioredoxinreduktase kommt bei der antioxidativen Defense der Zellen wahrscheinlich eine wichtige Aufgabe zu. Diese These wird unter anderem durch die Tatsache gestützt, dass ein Isoenzym der TRxR, die TRxR 2, in den Mitochondrien lokalisiert ist, wo ein Großteil der ROS anfällt [37]. Hier stellt sich die Frage, ob die mitochondrialen ROS, die in den aus Hürthle-Zellen abgeleiteten XTC-Zellen im Übermaß anfallen, auf die Expression der in Schilddrüsenzellen normalerweise stark exprimierten antioxidativen Selenoproteine einen stimulierenden oder hemmenden Einfluss ausüben.

Die Expression der untersuchten Selenoproteine in XTC-Zellen liegt, gemessen an den jeweiligen Enzymaktivitäten, etwa im gleichen Bereich wie in anderen untersuchten Schilddrüsenzelllinien. Dies gilt vor allem für die Thioredoxinreduktase. Die GPx-Aktivitäten der XTC-Zellen sind etwas höher als in FRTL-5-Zellen, die zwar hoch differenziert sind, aber aus Rattengewebe etabliert wurden. Im Vergleich zu der mit SV40 transformierten primären menschlichen Schilddrüsenzelllinie ori3 liegen die Werte jedoch niedriger, etwa im gleichen Bereich wie die der follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC 133 [73]. Die GPx-Aktivitäten in XTC-Zellen zeigen zudem eine deutliche Abhängigkeit von der Selenit-Konzentration im Kulturmedium. Anstieg, Maximum und Abfall vollziehen sich im gleichen Konzentrationsbereich wie bei anderen Schilddrüsenzelllinien. Die Kinetik zeigt einen kontinuierlichen Anstieg, der auch nach 144 h in Kultur noch kein Plateau erreicht. Dies weist auf eine kontinuierliche GPx-Synthese hin, die hauptsächlich über das Selenitangebot reguliert wird. Die Glutathionperoxidase kann daher in gewissem Rahmen als Marker für den Selenstatus betrachtet werden. Vilette et al. beschreibt dabei Unterschiede der Regulation *in vitro* und *in vivo* [74]: In FRTL-5-Zellen sinkt bei Selenmangelbedingungen die Menge an cGPx-mRNA ab, während die Menge an mRNA von PH-GPx und 5'DI keine Änderung erfährt. *In vivo* dagegen bleibt die Menge an cGPx-mRNA stabil, während die mRNA von PH-GPx und 5'DI sogar noch ansteigt. Die Hierarchie der Selenoenzyme bleibt jedoch gewahrt. Dies könnte möglicherweise mit einem zusätzlichen Einfluss von TSH auf die Regulation von cGPx und 5'DI zusammenhängen.



Die TrxR zeigt in der Konzentrationsabhängigkeit einen typischen abrupten Anstieg ab Selenit-Konzentrationen von 1 nmol/l mit anschließendem Plateau. Dies steht mit den Ergebnissen anderer Schilddrüsenzelllinien bzw. Zelllinien anderer Gewebe in Einklang. Auch in der Kinetik erreicht die Aktivität schnell ein Plateau. So vollzieht sich der Anstieg fast ausschließlich während der ersten 24 Stunden. Im Vergleich zum Aktivitätsanstieg bei GPx und 5'DI geschieht dies außerordentlich schnell. Allerdings ist die Amplitude der maximalen Stimulation der TrxR Aktivität geringer (3-fach bei der TrxR im Vergleich zu 5,4-fach bei der 5'DI bzw. 30-fach bei der GPx).

Welche Ursachen kommen hierfür in Frage? Frühere Studien, die die Selenabhängigkeit der TRxR-Expression und -Aktivität in Zellkultur auf mehreren Ebenen untersuchten, finden mit steigender Selenitkonzentration einen verstärkten Einbau von Se<sup>75</sup> in die Thioredoxinreduktase. Gleichzeitig stellen sie einen begleitenden Anstieg von mRNA und Protein der TRxR1 fest, der jedoch geringer ausfällt als der Zuwachs an Enzymaktivität. Auch im Rahmen von Transfektionsexperimenten mit COS-1-Zellen konnte ein Aktivitätsanstieg der TRxR in Abhängigkeit von der Selenitkonzentration gemessen werden, jedoch kein Anstieg an TRxR1-Protein. Daher ist davon auszugehen, dass der weitaus größte Anteil des Zuwachses an TRxR-Aktivität nach Stimulation mit Selenit durch einen Anstieg der spezifischen Enzymaktivität verbunden mit einem gesteigerten Seleneinbau bedingt ist. Somit wäre beispielsweise denkbar, dass die mRNA der TRxR bereits fertig zur Translation vorliegt und je nach Verfügbarkeit von Selen entweder Selenocystein als vorletzte Aminosäure in die entstehende Proteinkette eingebaut wird oder vorzeitiger Kettenabbruch erfolgt. In diesem Fall wäre das synthetisierte Protein funktionslos. Ein hoher Umsatz an Protein ist hierbei für einen schnellen Anstieg der spezifischen Enzymaktivität ohne wesentlichen Anstieg des Proteins notwendig, sofern man voraussetzt, dass die Selenatome nicht nachträglich in das fertige Molekül eingebaut werden können. Daher müssen eine rasche Synthese und ein rascher Abbau des Proteins gegeben sein. Hinweise hierauf gibt ein Cluster an sechs AU-reichen Elementen in der 3'UTR der TRxR1, der den Abbau der mRNA beschleunigt. Solche Instabilitäts-elemente werden typischerweise in der mRNA von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Protoonkogenen gefunden, die einem hohen Turnover aufweisen. Die mRNA der TRxR2 enthält allerdings keine solchen Elemente [37].

Insgesamt gesehen sind also Expression und Aktivität der untersuchten Selenoenzyme in XTC-Zellen weder aufgrund einer möglicherweise verstärkten mitochondrialen oxidativen Belastung reaktiv erhöht, noch besonders niedrig, was für einen Defekt in der Selenoproteinsynthese sprechen würde. Dies bietet keine Anhaltspunkte für eine Rolle der daraus folgenden Defizite im antioxidativen Schutzsystem bei Tumorentstehung und -progression. Auch das Expressionsmuster in Abhängigkeit von verschiedenen Selenkonzentrationen ist mit den Befunden bei anderen Zelllinien vergleichbar. Die Synthese der an der antioxidativen Defense beteiligten Selenoproteine in XTC-Zellen ist also funktionell.

#### **4.2.2 Expression sezernierter Selenoenzyme mit antioxidativer Funktion**

Einige Selenoproteine scheinen jedoch nicht nur eine intrazelluläre Funktion zu haben, sondern werden auch ins Plasma bzw. Medium sezerniert. Hinweise hierauf geben Befunde, die das Vorhandensein von pGPx-RNA in der Schilddrüse mittels Northern Blot und RT-PCR demonstrieren [22]. Bei Söderberg et al. [75] wird eine Sekretion von TRxR durch normale periphere Blutzellen sowie transformierte leukämische Zellen und Melanomzellen beschrieben. Der intrazelluläre Weg erfolgt dabei über den Golgi-Apparat. In vivo ist TRxR auch in frischem Spenderblut-Plasma nachweisbar.

Auch in konditioniertem Medium von XTC-Zellen kann GPx- und TRxR-Aktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität beider Enzyme variiert in Abhängigkeit von der Selenkonzentration und zeigt auch in der Kinetik eine ansteigende Tendenz. Diese Ergebnisse weisen auf eine Sekretion von GPx und TRxR hin. Diese Experimente werden durch die selenabhängige Darstellung von pGPx und TRxR aus konditioniertem Medium im Western Blot bestätigt [76]. Da das membranständige Protein 5'DI zwar in Zelllysaten von XTC-Zellen, nicht jedoch aus konditioniertem Medium im Western Blot nachgewiesen werden konnte, ist der extrazelluläre Nachweis von pGPx nicht durch ein unspezifisches Austreten von Protein im Rahmen einer Zellschädigung bedingt. Dies bedeutet, dass auch die Sekretion von Selenoproteinen in XTC-Zellen intakt ist [76].

Ein weiteres am antioxidativen Schutz der Zellen beteiligtes Selenoprotein ist SePP. Dabei handelt es sich um ein extrazelluläres Glykoprotein, das mindestens 40 % des in humanem Plasma vorhandenen Selens enthält [41, 27]. Seine Expression in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wurde in Hesse et al. erstmals beschrieben [77]. Da Selen essenzieller Bestandteil dieses Proteins ist, übt die Verfügbarkeit von Selen einen regulatorischen Einfluß auf die Expression aus: Ist kein Selenocystein vorhanden, das während der Translation für ein UGA-Codon eingesetzt werden kann, ist die Synthese eines funktionellen Proteins nicht möglich. Diskutiert werden hierbei prätranskriptionale Mechanismen, d.h. Regulation über die Transkriptionsrate, und besonders auch posttranskriptionale Mechanismen: So führt Selenmangel bei SePP und bei der cGPx nicht nur zu einem gesteigerten Abbau der Selenoprotein-mRNA, sondern auch zu einer verminderten Effizienz des SECIS-Elements bei der Unterdrückung eines vorzeitigen Kettenabbruchs beim UGA-Codon während der Translation [41]. Jedoch wird SePP bei Selenmangel im Vergleich zur cGPx und zur pGPx bevorzugt mit Selen versorgt, d.h. es steht in der Selenhierarchie weiter oben [27].

Unterschiede der SePP-Regulation unter normalen und unter Selenmangel-Bedingungen in Zellkultur legen jedoch nahe, dass es abgesehen vom Selenstatus noch weitere Zell- oder Spezies-spezifische Faktoren geben muss, die die Expression von SePP bei Selenmangel beeinflussen: Die SePP-mRNA in der humanen hepatozellulären Karzinom-Zelllinie HepG2 reagiert empfindlich auf Änderungen der Selenkonzentration, während die Expression der SePP-mRNA in der Ratten-Hepatom-Zelllinie H4IIE dadurch unbeeinflusst bleibt. Analog hierzu fällt die SePP-Sekretion durch Selen-defiziente Hep-G2-Zellen auf 10 % des Kontrollwertes, wohingegen H4IIE-Zellen auch unter Mangelbedingungen noch 40 % der Kontrollwerte sezernieren [27, 41]. In XTC-Zellen kann SePP im Western Blot aus konditioniertem Medium, nicht jedoch aus Zelllysaten nachgewiesen werden, was mit seiner Eigenschaft als sezerniertes, extrazelluläres Glykoprotein in Einklang steht. Ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Bande im Western Blot zwischen mit Selen stimulierten und nicht-stimulierten Proben fällt dabei jedoch nicht auf.

Wo liegt der Hintergrund dieser Protein- bzw. Enzymsekretion? Denkbar wäre, dass es sich um eine Sekretion antioxidativ wirksamer Enzyme zum Schutz des Follikelraums

vor  $H_2O_2$  und dessen reaktiver Folgeprodukte handelt. Hierzu muss jedoch noch geklärt werden, ob es sich bei den einzelnen Enzymen um eine Sekretion nach basal oder nach apikal, in das Follikellumen, handelt.

Howie et al., der die Enzym-Aktivität einer sezernierten GPx sowie entsprechende Banden im SDS-Page nachweisen konnte, beschrieb 1995 darüber hinaus eine zusätzliche Funktion der pGPx in der Schilddrüse. Dabei nahm er eher eine regulatorische Funktion des Enzyms bei der Schilddrüsenhormonbiosynthese als eine Funktion beim Schutz des Kolloids vor  $H_2O_2$  und dessen reaktiven Folgeprodukten an. Das Vorhandensein von  $H_2O_2$  stelle den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Synthese dar.  $H_2O_2$  und die Sekretion von pGPx ins Kolloid werden aber gegensinnig über second messenger reguliert, d.h. eine hohe Verfügbarkeit von  $H_2O_2$  geht mit einer niedrigen Verfügbarkeit von pGPx im Kolloid einher und umgekehrt. Dies bedeutet, dass bei einer Syntheseaktivität auf basalem Niveau mehr pGPx ins Kolloid sezerniert wird und dort die vorhandene Menge an zur Katalyse der Hormonsynthese nötigem  $H_2O_2$  vermindert. Bei einer hohen Syntheseleistung dagegen verbleibt die pGPx anstelle dessen in der Zelle und stellt dort einen zusätzlichen Schutz für das Cytosol dar, wenn die oxidative Belastung am höchsten ist [78]. Diese Experimente wurden in vitro an Primärkulturen von Thyrozyten durchgeführt, weswegen die Ergebnisse möglicherweise nicht einfach auf die Situation in vivo übertragbar sind. Die Richtigkeit der Resultate könnte man aber beispielsweise durch Darstellung der pGPx im Kolloid mittels Immunzytochemie oder anderen Methoden beweisen.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass sezernierte pGPx sowie auch sezernierte TRxR im Lumen der Follikel „überschüssiges“  $H_2O_2$  benutzen, um Quervernetzungen des Tg über Disulfidbrücken herzustellen, insbesondere an den sogenannten Thioredoxin-Boxen des Tg [79]. Somit käme der pGPx und der TRxR eine Rolle bei der Kondensation des Kolloids und der Formung der hochmolekularen unlöslichen Tg-Form zu. Bisher wurde auch diese Funktion der TPO zugeschrieben [80]. In Analogie zur Rolle der PHGPx bei der Reifung von Spermien könnten die beiden Selenoproteine dabei sogar selbst in das kondensierte Tg-Polymer mit eingebaut werden [81].

### **4.3 EINFLUSS VON PASSAGENZAHL UND RETINSÄURE AUF DIE EXPRESSION DER 5'DI**

Sowohl GPx als auch TRxR reagieren in XTC-Zellen ausschließlich auf Variationen der Selenitzufuhr. Weder Retinsäurezufuhr in einer für andere Schilddrüsenzelllinien optimalen Konzentration noch die Passagenzahl der Zellen üben einen signifikanten Einfluss auf die Enzymaktivität bzw. das Expressionsmuster aus.

Anders verhält sich dies für die 5'DI. In XTC-Zellen mit niedrigen Passagezahlen zeigt die 5'DI ebenfalls einen Zeit- und Dosis-abhängigen Aktivitätsanstieg bereits bei Selenit-Konzentrationen unter 1 nmol/l. Retinsäure kann in diesem Stadium die Enzymaktivität nicht signifikant steigern. Das Expressionsmuster ist folglich mit dem in differenzierten Zelllinien wie FRTL-5 vergleichbar [12].

In Zellen mit höheren Passagenzahlen hingegen ändert sich dies grundlegend: Die Stimulation mit Selenit allein bleibt nun selbst bei Optimaldosis ohne Effekt und bringt keinen signifikanten Zuwachs an 5'DI-Aktivität mehr. Eine niedrigere Aktivität der 5'DI mit zunehmender Entdifferenzierung wurde von Köhrle et al. [40] sowohl für Schilddrüsengewebe als auch für entsprechende Zelllinien beschrieben. Insofern kann dieses Enzym als Differenzierungsmarker für Schilddrüsenkarzinome gelten. Der Verlust an 5'DI in XTC-Zellen mit zunehmender Passagenzahl ist also als Zeichen für einen Schritt in Richtung Dedifferenzierung zu werten. Stimulation der Zellen mit Retinsäure alleine bewirkt präliminären Daten zufolge einen leichten Wiederanstieg der 5'DI-Aktivität. Diese Daten werden durch Western Blot-Experimente bestätigt, in denen die Intensität der entsprechenden Bande durch Retinsäure stimuliert wird [76]. Die Kombination von Retinsäure mit Selenit bewirkt einen hochsignifikanten Wiederanstieg der Aktivität auf das 5- bis 10-fache der Kontrolle, die nur mit Selenit stimuliert wurde. Dies entspricht dem Verhalten des Enzyms in den nur mäßig differenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien FTC 133 und 238 [12].

Dieses unterschiedliche Ansprechen auf Retinsäure ist somit mit den Unterschieden in der Signaltransduktion vergleichbar, die man zwischen den bereits erwähnten hoch differenzierten Zelllinien wie FRTL-5 und Zelllinien wie FTC 133 und 238 beobachten kann. In FRTL-5-Zellen ist noch eine hohe basale Aktivität an 5'DI vorhanden, die

durch Retinsäure nicht weiter beeinflusst wird. In FTC 133 und 238 hingegen beobachtet man nur eine relativ niedrige basale 5'DI-Aktivität, die jedoch durch Behandlung mit Retinsäure induziert werden kann. Völlig entdifferenzierte Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wie HTh 74 und C 643 wiederum haben sowohl die Fähigkeit zur 5'DI-Synthese als auch die Induzierbarkeit durch Retinsäure verloren [12]. Der beobachtete Wechsel in der Reaktion der 5'DI in XTC-Zellen auf Selenit und Retinsäure vollzieht daher wahrscheinlich einen Teil der Veränderungen nach, die während der Entdifferenzierung von normalen Thyrozyten zu follikulären Tumorzellen auftreten. Diese Unterschiede wurden bisher immer nur in verschiedenen Zelllinien im Vergleich beobachtet, nie hingegen in einer Zelllinie im Verlauf mehrerer Passagen. Daher könnten diese Zellen als Modell zur Untersuchung von Veränderungen in der Signaltransduktion (z.B. Verlust von Transkriptionsfaktoren) während der Entdifferenzierung dienen.

Außerdem zeigen diese Befunde nun auch *in vitro*, dass mäßig differenzierte oxyphile Schilddrüsenkarzinome prinzipiell einer Behandlung mit Retinsäure zugänglich sind und mit einer partiellen Redifferenzierung reagieren. *In vivo* wurden im Rahmen einer klinischen Studie bereits wenige Patienten mit Hürthlezzell-Karzinomen, die nicht mehr auf eine Radioiodtherapie ansprachen, mit einer Retinsäure-Redifferenzierungstherapie behandelt. Von 5 Patienten mit dieser Tumorart reagierten 2 positiv auf die Therapie im Sinne einer reinduzierten Iodidaufnahme [14]. Interessant wäre es nun, in weiteren Experimenten zu klären, ob die prophylaktische Behandlung von XTC-Zellen mit Retinsäure und Selenit ein Entdifferenzieren der Zellen verhindern oder hinauszögern kann.

#### **4.4 HIERARCHIE DER SELENOENZYME**

Die vorliegenden Ergebnisse sind ferner im Einklang mit früheren Resultaten aus Experimenten mit Schweinenierenzellen oder Rattengewebe, die eine Selenhierarchie postulieren. Verschiedene Selenoproteine zeigen deutliche gewebsspezifische Unterschiede bezüglich ihrer Expression bei Selendepletion und -repletion. Allgemein steht die 5'DI in der Hierarchie der Selenversorgung höher als die cGPx, wohingegen die PH-GPx und Selenoprotein P (SePP) mit der 5'DI auf einer Ebene oder gar höher stehen. Die GPx-Aktivität in XTC-Zellen zeigt erst ab Selenitkonzentrationen von 10 nmol/l einen signifikanten Anstieg, wohingegen sowohl TRxR als auch 5'DI bereits ab Konzentrationen

von 1 nmol/l einen deutlichen Zuwachs an Enzymaktivität aufweisen. Dabei ist der Anstieg der TRxR jedoch bereits sehr viel deutlicher ausgeprägt und nur wenig vom endgültigen Maximum entfernt.

Die Aktivität der 5'DI nimmt dagegen nur nach und nach bis zu einer optimalen Konzentration von 100 nmol/l kontinuierlich zu. Dies deckt sich mit Befunden, denen zufolge das regulierende SECIS-Element der TrxR1 unter Normalbedingungen hochaktiv ist. Auf zusätzliche Selenversorgung reagiert es allerdings weniger als das der Typ1-Deiodase. Dies lässt vermuten, dass bei schlechter Selenversorgung die TrxR1-Spiegel besser aufrechterhalten werden, bei Selenüberschuss jedoch kein dramatischer Proteinanstieg stattfindet [37]. Die 5'DI zeigt in der nicht-transformierten Schweinenierenzelllinie LLC-PK1 einen vergleichbaren Bereich für Anstieg und Maximalwerte in Abhängigkeit von der Selenkonzentration wie in XTC-Zellen. Während der Depletionsphase fällt die Aktivität der 5'DI in LLC-PK1 vorübergehend ab mit einem nachfolgenden Wiederanstieg. Die cGPx-Aktivität hingegen nimmt kontinuierlich ab. Dies wäre mit einer Umverteilung des Selens aus der reichlich vorhandenen cGPx in die knappere 5'DI vereinbar, die für den Umsatz von T4 in T3 und damit für eine geregelte Stoffwechselfunktion unerlässlich ist [82]. In XTC-Zellen kann man in den unstimulierten Kontrollen für die 5'DI noch fünf Tage nach Beginn des Selenentzugs 50 % der maximalen Aktivität messen, die dann im weiteren Verlauf stetig abfällt. Dies weist auch hier auf eine Umverteilung von Selen zugunsten der Deiodase hin.

Wie oben bereits erwähnt, erreicht die Aktivität der TRxR bei optimaler Stimulation höchstens das etwa 3-fache der Kontrolle. Außerdem überrascht es, dass die Kontrolle konstant ein Drittel der maximalen Aktivität zeigt, ohne im zeitlichen Verlauf weiter abzusinken, wie die 5'DI. Welche Ursachen kommen hierfür in Betracht? Eine mögliche Erklärung wäre, dass die gemessene basale Aktivität der unstimulierten Kontrolle methodisch bedingt nicht weiter absinkt. Denkbar wäre aber auch, dass die TRxR, analog zur 5'DI, aus Umverteilungsvorgängen Selen erhält und so die Aktivität stabil gehalten wird. Dies würde das Enzym in der Selenhierarchie sehr weit oben platzieren. Eine andere Erklärung wäre eine konstitutiv niedrige selenabhängige Amplitude, d.h., die Aktivität des Enzyms variiert auch bei starker Schwankung des Selenangebots nur wenig.

#### **4.5 EXPRESSION SCHILDDRÜSENTYPISCHER MARKER**

Die Zelllinie XTC.UC1 zeigt, obwohl aus metastasiertem malignen Gewebe gewonnen, noch deutliche Merkmale einer thyreoidalen Differenzierung. Dies wurde in der PCR durch die Darstellung von schilddrüsenspezifischen Markern nachgewiesen. Wie bereits bei Zielke et al. beschrieben, lassen sich aus XTC-Zellen sowohl Transkripte von Thyreoglobulin als auch des TSH-Rezeptors vervielfältigen, nicht jedoch des Natrium-Iodid-Symporters. Analog hierzu ist der Verlust der Iodid-Aufnahmefähigkeit in vivo ebenfalls ein häufiges Problem onkozytär veränderter Zellen, das auch bei der Patientin, von der das Ausgangsgewebe der Zelllinie isoliert wurde, aufgetreten war [53].

Weiterhin gelang die Darstellung der Transkripte der beiden Deiodase-Gene 5'DI und 5'DII in der RT-PCR, von denen zumindest die 5'DI einen schilddrüsentypischen Differenzierungsmarker darstellt. Die Bande des amplifizierten Produkts der 5'DII war dabei ähnlich stark ausgebildet wie die der 5'DI. Dies deckt sich mit früheren Befunden aus Untersuchungen verschiedener pathologisch veränderter Schilddrüsengewebe, in denen die Ergebnisse von 5'DI und 5'DII eine jeweils vergleichbare Ausprägung zeigen [83]. Die Expression funktioneller 5'DII in der Schilddrüse ist jedoch nach wie vor strittig, da die gemessene 5'DII-Aktivität in normalem oder pathologischem Schilddrüsengewebe zwei bis drei Größenordnungen niedriger liegt als die der 5'DI und aufgrund des methodischen Vorgehens die Relevanz dieser Aktivität nicht sicher beurteilt werden kann [22].

Einen Hinweis auf die Malignität von XTC-Zellen liefert die Amplifikation des Glucose-Transporter Typ 1 (Glut 1). Dieser wird in gesunder Schilddrüse normalerweise nicht exprimiert. In verschiedenen Tumoren, unter anderem des Kopf- und Halsbereiches, ist seine Expression jedoch erhöht. Auch für Karzinome der Schilddrüse beschreiben verschiedene Autoren eine gesteigerte Expression von Glut 1 [84, 85]. Für follikuläre und onkozytäre Schilddrüsenkarzinome findet man analog hierzu mit zunehmender Dedifferenzierung eine stärkere Expression von Glut-1-mRNA [83]. In XTC-Zellen ist Glut 1 im Vergleich zur Kontrolle aus nicht malignem Strumengewebe deutlich exprimiert, leider liegen hier keine direkten Vergleichswerte aus anderen Karzinomzelllinien vor.



#### **4.6 EXPRESSION VON RETINSÄURE-REZEPTOREN DER RAR-FAMILIE**

Wie oben bereits besprochen, bindet die Retinsäure intrazellulär an spezifische Rezeptoren. Diese wiederum binden zusammen mit ihrem Liganden im Zellkern an bestimmte DNA-Sequenzen und ändern so die Transkriptionsrate verschiedener Gene. Damit also Retinsäure in einer Zelle als Transkriptionsfaktor fungieren kann und die Zelle damit überhaupt der Wirkung von Retinsäure zugänglich ist, müssen die Retinsäure-Signaltransduktionswege intakt sein. Hierzu ist die Expression von Retinsäure-Rezeptoren notwendig, von denen zwei Unterfamilien existieren, RAR und RXR. Diese weisen unterschiedliche Affinitäten zu verschiedenen Retinsäure-Isomeren auf. Von jeder Familie gibt es wiederum drei Unterformen, RAR  $\alpha$ , RAR  $\beta$  und RAR  $\gamma$  bzw. RXR  $\alpha$ , RXR  $\beta$  und RXR  $\gamma$ .

In verschiedenen Schilddrüsengeweben und -zelllinien induziert die Stimulation mit Retinsäure unterschiedliche Effekte. Dies hängt möglicherweise mit Differenzen in der jeweiligen Rezeptoren-Population zusammen. Daher mag es von Nutzen sein, die entsprechende Rezeptor-Ausstattung zu kennen, um die Zugänglichkeit eines bestimmten Gewebes oder einer Zelllinie für eine Behandlung mit Retinsäure zu beurteilen. Verschiedene folliculäre und anaplastische Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien exprimieren funktionelle RARs und RXRs. Dabei ergeben sich unterschiedliche Niveaus an RAR- und RXR-mRNA-Transkripten in diesen Zelllinien, wahrscheinlich Ausdruck einer Dysregulation der Rezeptor-Expression in Schilddrüsenkarzinomen.

Insbesondere gilt dies für RAR  $\beta$ , der in FTC 238 nur minimal exprimiert wird, und für RAR  $\alpha$  in den anaplastischen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien HTh 74 und C 643. In FTC 133-Zellen kann die Expression von RAR  $\alpha$  und  $\beta$  durch Retinsäure-Behandlung gesteigert werden. In FTC 238-Zellen war dies weder für RAR  $\beta$  noch für RAR  $\alpha$ , der im Northern Blot dargestellt werden konnte, möglich. In HTh 74- und C 643-Zellen wird RAR  $\beta$  zwar durch Retinsäure stimuliert, die Expression der mRNA von RAR  $\alpha$  erfährt hierdurch anstatt einer Stimulation wie in FTC 133-Zellen jedoch eher noch eine Reduktion [51, 86].

In der Zelllinie XTC.UC1 wurde die Unterfamilie der RAR-Rezeptoren, die eine hohe Affinität zu all-trans-Retinsäure aufweisen, mittels RT-PCR untersucht. Dabei konnte

die Expression von mRNA für die Retinsäurerezeptoren RAR  $\alpha$  und RAR  $\gamma$  in XTC-Zellen nachgewiesen werden, RAR  $\beta$ -mRNA hingegen nicht. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, ob die redifferenzierenden Effekte einer Stimulation mit Retinsäure sich auch in XTC-Zellen auf die Expression von Retinsäurerezeptoren, insbesondere RAR  $\beta$ , auswirken.

Der Verlust oder eine Fehlregulation von RAR  $\beta$  wird für verschiedene Karzinome der Haut, Lunge oder Brust beschrieben und ist vermutlich in die Pathogenese involviert [87]. Das heißt, dass ein für die Zelldifferenzierung relevanter Retinsäure-Rezeptor in XTC-Zellen nicht mehr exprimiert wird. Welche Bedeutung dies für die Pathogenese der Zellen hat bzw. für ihre Tendenz zur Entdifferenzierung und ihre Reaktion auf Retinsäure, bleibt vorerst noch abzuwarten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die menschliche Schilddrüse gehört zu den Organen mit dem höchsten Gehalt an Selen und exprimiert verschiedene Enzyme, die im aktiven Zentrum Selenocystein enthalten. Hierzu gehören die 5'DI, die in den Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone involviert ist, die TRxR, die unter anderem die Redoxstatus-abhängige Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren reguliert, SePP, ein Protein, dem vor allem eine Funktion als Transportprotein zugeschrieben wird und das bis zu 10 Selenocysteinreste enthält, und einige GPx, die während der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängigen Schilddrüsenhormonbiosynthese eine Rolle beim Abbau von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spielen.

Die Zelllinie XTC.UC1 ist eine hoch differenzierte Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie, die aus der Weichteilmetastase eines Hürthle-Zell-Karzinoms einer 63-jährigen Patientin etabliert wurde. Hürthle-Zell-Karzinome weisen verschiedene charakteristische Anomalien auf, wie beispielsweise einen hohen Gehalt an Mitochondrien und verminderten Iodidtransport. Ein hoher Gehalt an Mitochondrien erzeugt aber eine erhöhte Belastung durch ROS. Dies wirft die Frage auf, ob die Expression von Selenoproteinen, die in erster Linie für den Schutz der Zellen vor oxidativer Schädigung verantwortlich sind, in Hürthle-Zell-Tumoren intakt ist. Im Rahmen der Arbeit wurde die Synthese der oben genannten Selenoproteine in XTC-Zellen überprüft.

Retinsäure bewirkt bei mäßig differenzierten Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wie FTC 133 und 238 vielfältige positive Effekte im Sinne einer partiellen Redifferenzierung. Klinisch wird Retinsäure zur Therapie bzw. Chemoprävention verschiedener solider und hämatologischer Tumoren eingesetzt. Aufgrund des seltenen Ansprechens auf eine Radioiodtherapie und der vergleichsweise hohen Tendenz zur weiteren malignen Entartung oxyphiler Tumorzellen wurde die Reaktion von XTC-Zellen auf eine Stimulation mit Retinsäure untersucht.

Trotz ihrer malignen Entartung weisen XTC-Zellen noch deutliche Merkmale einer thyreoidalen Differenzierung auf. Sie exprimieren sowohl Thyreoglobulin als auch den TSH-Rezeptor, nicht jedoch den NIS. Letzteres gilt ebenfalls als typisch für Hürthle-Zell-Tumoren. Diese und andere schilddrüsentypische Differenzierungsmarker wurden mittels RT-PCR auf ihre Expression in XTC-Zellen untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivitäten der untersuchten Selenoproteine in XTC-Zellen etwa im gleichen Bereich wie in anderen untersuchten Schilddrüsenzelllinien liegen. Diese umfassen sowohl weitere humane Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wie auch eine nicht maligne Thyrozytenlinie der Ratte. Die GPx-Aktivität steigt nach Selen-Behandlung bis zu einem Maximum bei 300 nmol/l an. Dabei wird in der Zeitkurve auch nach 144 h Inkubation kein Plateau erreicht. Sie zeigt eine deutliche Abhängigkeit von der Selenitkonzentration im Kulturmedium und kann als Marker für den Selenstatus betrachtet werden. Die Aktivität der TrxR wird schon durch 1 nmol/l Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> stimuliert und in der Kinetik bereits nach 24 h. Sowohl in der Dosisabhängigkeitskurve als auch in der Kinetik steigt sie dabei abrupt an und erreicht anschließend ein Plateau. Höhere Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>-Konzentrationen oder längere Inkubation haben jedoch kaum zusätzlichen aktivitätssteigernden Einfluss. Sowohl GPx als auch TRxR können mittels Enzymassay auch in konditioniertem Medium nachgewiesen werden. Erstere ist dabei mit der Unterform pGPx identisch. Auch SePP kann im Western Blot aus konditioniertem Medium nachgewiesen werden, zeigt aber keine Reaktion auf Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>-Stimulation.

Besonders interessant sind die Ergebnisse der Untersuchung der 5'DI-Aktivität, einem Differenzierungsmarker für Schilddrüsenkarzinome: Bei Passagenzahlen zwischen 20 und 22 wird die Aktivität der 5'DI wie bei GPx und TRxR zeit- und dosisabhängig durch Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> stimuliert. Bei höheren Passagenzahlen, zwischen 28 und 31, reagiert die 5'DI nicht länger auf Stimulation mit Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. Sie kann aber durch Stimulation mit 100 nmol/l Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> in Kombination mit 1 µmol/l Retinsäure oder – präliminären Daten zufolge – auch durch RA alleine wieder induziert werden. Dieses ungleiche Ansprechen auf Selenit- und Retinsäurestimulation entspricht der unterschiedlichen Regulation des Enzyms in differenzierten Schilddrüsenzelllinien wie FRTL-5 und eher entdifferenzierten follikulären Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien wie FTC 133 und 238. In FRTL-5-Zellen ist eine hohe basale Aktivität an 5'DI vorhanden, die durch Retinsäure nicht weiter beeinflusst wird. In FTC 133- und 238-Zellen hingegen beobachtet man nur eine niedrige basale 5'DI-Aktivität, die aber durch Behandlung mit Retinsäure induziert werden kann. Diese Unterschiede wurden bisher nur in verschiedenen Zelllinien im Vergleich beobachtet, nie hingegen in einer Zelllinie im Verlauf mehrerer Passagen. Der beobachtete Wechsel in der Reaktion der 5'DI in XTC-Zellen auf Selenit und Re-

tinsäure vollzieht daher vermutlich einen Teil der Veränderungen nach, die während der Entdifferenzierung von normalen Thyrozyten zu follikulären Tumorzellen auftreten.

Wie in anderen Systemen wird die 5'DI im Vergleich zur cGPx bevorzugt mit Selen versorgt. Bei Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  zeigt sie in XTC-Zellen bereits bei Konzentrationen von 1 nmol/l einen deutlichen Aktivitätszuwachs. Noch 5 Tage nach Beginn des Selenentzugs kann man in den unstimulierten Kontrollen für die 5'DI 50 % der maximalen Aktivität messen, Hinweis auf eine Umverteilung des Selens zugunsten dieses Enzyms. Dies zeigt, dass die Selenhierarchie unter den verschiedenen Selenoenzymen auch in XTC-Zellen intakt ist.

Die Ergebnisse der RT-PCR bestätigen die Literaturdaten in Bezug auf die Expression von Thyreoglobulin und TSH-Rezeptor sowie des NIS. Außerdem lässt sich ein weiterer schilddrüsentypischer Differenzierungsmarker darstellen, die 5'DI, sowie ihr Isoenzym, die 5'DII. Die beiden Enzyme zeigen dabei eine vergleichbar starke Ausprägung. In Übereinstimmung mit der Stimulierbarkeit der 5'DI in XTC-Zellen durch Retinsäure ist auch die Expression der Retinsäurerezeptoren RAR  $\alpha$  und RAR  $\gamma$  nachweisbar.

Insgesamt gesehen sind einerseits Expression und Aktivität der untersuchten Selenoenzyme in XTC-Zellen im Vergleich mit den anderen untersuchten Schilddrüsenzelllinien nicht erhöht, wie man es als kompensatorische Reaktion auf eine möglicherweise verstärkte Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies aus den amplifizierten und hyperaktiven Mitochondrien erwarten könnte. Andererseits ist ihre Aktivität im Vergleich zu den anderen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien auch nicht auffallend vermindert, was als Ursache für eine besonders ausgeprägte oxidative Schädigung von Zellbestandteilen inklusive Mutation der DNA und eine dadurch geförderte Tumorentstehung gewertet werden könnte. Diese Resultate am Zellkulturmodell eines Hürthle-Zell-Karzinoms bieten also keinen Anhaltspunkt für eine Rolle von Selenoenzymen bei Initiation und Progression dieser Art von Schilddrüsentumoren.

Ferner legen die Daten für XTC-Zellen eine unterschiedliche Responsivität verschiedener Selenoproteine auf Stimulation mit  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  nahe, abhängig von Passagenzahl oder Retinoid-abhängigem Differenzierungsstadium. Diese Zelllinie könnte daher ein interessantes Modell darstellen, um das Ansprechen menschlicher Schilddrüsenkarzinome

auf eine Redifferenzierungstherapie mit Retinsäure und möglicher Adjuvanzien wie Selenit weiter zu untersuchen.

- 
- [1] Fleischhauer K. und Groscurth P.: Endokrine Drüsen. In: Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. Drenckhahn, D. und Zenker, W. (eds.), Urban und Schwarzenberg, 1993, 189-197
- [2] Larsen P.R., Davies R.F., Hay I.D.: The Thyroid Gland. In: Williams textbook of endocrinology. Wilson J.D., Foster D.W., Kronenberg H.M., Larsen P.R. (eds.) W.B. Saunders Company, 1998, 9<sup>th</sup> ed., 390-410
- [3] De Deken X., Wang D., Dumont J.E., Miot F. (2002) Characterization of ThOX Proteins as Components of the Thyroid H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Generating System. *Exp. Cell Res.* 273, 187-196
- [4] Feldkamp J., Scherbaum W.A.: Schilddrüse. In: Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel. Nawroth, P.P., Ziegler R. (eds.) Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001, 104-107
- [5] Köhrle J. (2000) The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1853-1863
- [6] Silbernagl S., Despopoulos A.: Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart und Deutscher Taschenbuch-Verlag, 2001, 286-289
- [7] Herold G.: Innere Medizin. Köln, ohne Verlagsangabe, 2002, 622-623
- [8] Livolsi V.A.: Pathology of Thyroid Diseases. In: Braverman, L.E., Utiger, R.D. Werner & Ingbar's The Thyroid. Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 488-500
- [9] Gimm O. (2001) Thyroid cancer. *Cancer letters* 163: 143-156
- [10] Schmutzler C., Köhrle J. (2000) Innovative strategies for the treatment of thyroid cancer. *Eur. J. Endocrinol.* 143: 15-24
- [11] Schmutzler C., Winzer R., Meissner-Weigl J., Köhrle J. (1997) Retinoic Acid Increases Sodium/Iodide Symporter mRNA Levels in Human Thyroid Cancer Cell Lines and Suppresses Expression of Functional Symporter in Nontransformed FRTL-5 Rat Thyroid Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 832-838
- [12] Schreck R., Schnieders F., Schmutzler C., Köhrle J. (1994) Retinoids stimulate Type I Iodothyronine 5'-Deiodinase Activity in Human Follicular Thyroid Carcinoma Cell Lines. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 79: 791-798
- [13] Simon D., Körber C., Krausch M., Segering J., Groth P., Görge R., Grünwald F., Müller-Gärtner H.W., Schmutzler C., Köhrle J., Röher H.D., Reiners C. (2002) Clinical impact of retinoids in redifferentiation therapy of advanced thyroid cancer: final results of a pilot study. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 29 (6): 775-82
- [14] Simon D., Köhrle J., Reiners C., Boerner A.R., Schmutzler C., Mainz K., Goretzki P.E., Röher H.D. (1998) Redifferentiation therapie with Retinoids: Therapeutic Option for Advanced Follicular and Papillary Thyroid Carcinoma. *World J. Surg.* 22: 569-574
- [15] Máximo V., Sobrinho-Simoes M. (2000) Hürthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows Arch* 437: 107-115
- [16] Tallini G. (1998) Oncocytic tumours. *Virchows Arch.* 433: 5-12
- [17] Savagner F., Franc B., Guyetant S., Rodien P., Reynier P., Malthierry Y. (2001) Defective Mitochondrial ATP Synthesis in Oxyphilic Thyroid Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86 (10): 4920-4925
- [18] Loft S., Poulsen H.E. (1996) Cancer risk and oxidative damage in man. *J. Mol. Med.* 74: 297-312
- [19] Marnett L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 1 (3): 361-370
- [20] Blot W.J., Li J.Y., Taylor P.R., Gou W., Dawsey S., Wang G.Q., Yang C.S., Zheng S.F., Gail M., Li G.Y., et al. (1993) Nutrition intervention trials in Linxian, China: supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence and disease specific mortality in the general population. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1483-1492
- [21] Glatte E., Thomassen Y., Thoresen S.O., Haldorsen T., Lund-Larsen P.G., Theodorsen L., Aaseth J. (1989) Prediagnostic serum selenium in a case-control study of thyroid cancer. *Int. J. Epidemiol.* 18(1): 45-9
- [22] Köhrle J. (1999) The trace element selenium and the thyroid gland. *Biochimie* 81: 527-533
- [23] Kucharzewski M., Braziewicz J., Majewska U., Gozdz S. (2002) Concentration of selenium in the whole blood and the thyroid tissue of patients with various thyroid diseases. *Biol. Trace Elem. Res.*, 88 (1): 25-30

- [24] Zagrodzki P., Nicol F., Arthur J.R., Slowiaczek M. (2001) Selenoproteins in human thyroid tissues. *Biofactors* 14 (1-4): 223-227
- [25] Schrauzer G.N. (2002) Anticarcinogenic effects of selenium. *Cell. Mol. Life Sci.* 7: 1864-1873
- [26] Clark L.C., Combs G.F., Turnbull B.W., Slate E.H., Chalker D.K. et al. (1996) Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. *J. Am. Med. Assoc.* 276: 1957-1963
- [27] Mostert V. (2000) Selenoprotein P: Properties, Functions and Regulation. *Arch. Biochem. Biophys.* 376 (2): 433-438
- [28] Stadtman T.C. (1996) Selenocysteine. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 83-100
- [29] Kryukov G.V., Castellano S., Novoselov S.V., Lobanov A.V., Zehtab O., Guigo R., and Gladyshev V.N. (2003) Characterization of Mammalian Selenoproteomes. *Science* 300: 1439-1443
- [30] Flohé L., Günzler W., Schock H.H. (1973) Glutathione peroxidase, a selenoenzyme. *FEBS Letters* 32, 132 - 134
- [31] Rotruck J.T., Pope A.L., Ganther H.E., Swanson A.B., Hafeman D.G., Hoekstra W.G. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science* 179, 588-590
- [32] Arthur J.R. (2000) The glutathione peroxidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1825-1835
- [33] Köhrle J, Schuppert F., Fekete E., Dreher I. (1996) Divergent Expression of the selenoproteins type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in human thyroid tissues. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 104: 17
- [34] Howie A.F., Walker S.W., Akesson B., Arthur J.R., Beckett G.J. (1995) Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: a potential regulator of thyroid-hormone synthesis. *Biochem. J.* 308: 713-717
- [35] Agorio A., Chalar C., Cardozo S., Salinas G. (2003) Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin Glutathione reductase. *J. Biol. Chem.* 278(15): 12920-12928
- [36] Alger H.M., Williams D.L. (2002) The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121(1): 129-139.
- [37] Mustacich D. and Powis G. (2000) Thioredoxin reductase. *Biochem. J.* 346: 1-8
- [38] Ganther, H.E. (1999) Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase. *Carcinogenesis* 20 (9): 1657-1666
- [39] Bianco A.C., Salvatore D., Gereben B., Berry M.J., Larsen P.R. (2002) Biochemistry, cellular and molecular biology and physiological roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23 (1): 38-89
- [40] Köhrle J., Oertel M., Hoang-Vu C., Schnieders F., Brabant G. (1993) Type I-Deiodinase, a marker for differentiated thyroid carcinoma? *Exp. Clin. Endocrinol.* 101: 60-72
- [41] Persson Moschos M. (2000) Selenoprotein P. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1836-1845
- [42] Schomburg L., Schweizer U., Holtmann B., Flohé L., Sendtner M., Köhrle J. (2003) Gene disruption discloses role of Selenoprotein P in selenium delivery to target tissues. *Biochem J.* 370 (2): 397-402
- [43] Saito Y., Takahashi K. (2002) Characterization of selenoprotein P as a selenium supply protein. *Eur. J. Biochem.* 269, 5746-5751
- [44] Hill K.E., Zhou J., McMahan W.J., Motley A.K., Atkins J.F., Gesteland R.F., Burk R.F. (2003) Deletion of Selenoprotein P alters Distribution of Selenium in the Mouse. *J. Biol. Chem.* 278: 13640-13646
- [45] Scharpf M., Schomburg L., Schweizer U.: mündliche Mitteilung unpublizierter Daten
- [46] Yang X., Hill K.E., Maguire M.J., Burk R.F. (2000) Synthesis and secretion of selenoprotein P by cultured rat astrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1474(3): 390-6
- [47] Dreher I., Jakobs T., Köhrle J. (1997) Cloning and characterization of the human selenoprotein P promoter. *J. Biol. Chem.* 272: 29364-29371
- [48] Köhrle J. (2002) Iodothyronine Deiodinases. *Meth. Enzymol.* 347: 125-167
- [49] Zusi F.C., Lorenzi M.V., Vivat-Hannah V. (2002) Selective retinoids and rexinoids in cancer therapy and chemoprevention. *DDT* 7, 1165-1174
- [50] Biesalski H.K., Grimm P.: Taschenatlas der Ernährung. Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999, 128-137
- [51] Schmutzler C., Brtko J., Winzer R., Jakobs T.C., Meissner-Weigl J., Simon D., Goretzki P., Köhrle J. (1998) Functional Retinoid and Thyroid hormone receptors in human thyroid-carcinoma cell lines and tissues. *Int. J. Canc.* 76 : 368-376



- 
- [52] Chomienne C., Fenaux P., Degos L. (1996) Retinoid differentiation therapy in promyelocytic leukemia. *FASEB Journal* 10: 1025-1030
- [53] Zielke A., Tezelman S., Jossart G.H., Wong M., Siperstein A.E., Duh Q.-Y., Clark O.H. (1998) Establishment of a Highly Differentiated Thyroid Cancer Cell Line of Hürthle Cell Origin. *Thyroid* 8: 475-483
- [54] Savagner F., Chevrollier A., Loiseau D., Morgan C., Reynier P., Clark O., Stepien G., Malthiery Y. (2001) Mitochondrial Activity in XTC.UC1 Cells Derived from Thyroid Oncocytoma. *Thyroid* 11: 327-333
- [55] Chu F.F., Esworthy R.S., Akman S., Doroshow J.H. (1990) Modulation of glutathione peroxidase expression by selenium: effect on human MCF-7 breast cancer cell transfectants expressing a cellular glutathione peroxidase cDNA and doxorubicin-resistant MCF-7 cells. *Nucleic Acids Res.* 18: 1531-1539
- [56] Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- [57] Beutler, E. (1975) Glutathione peroxidase (GSH-Px). *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods.* Grune and Stratton, New York: 71-73
- [58] Smith A.D., Levander O.A. (2002) High-Throughput 96-Well Microplate Assays for Determining Specific Activities of Glutathione Peroxidase and Thioredoxin Reductase. *Meth. Enzymol.* 347: 113-121
- [59] Leonard J.L., Rosenberg I.N. (1980) Iodothyronine 5' deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5' deiodination of reverse triiodothyronine. *Endocrinology* 107: 1376-1383
- [60] Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- [61] Mullis K.B., Faloona F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350
- [62] Chien A., Edgar D.B., Trela J.M. (1976) Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bacteriol.* 127 (3): 1550-1557
- [63] Kayano T., Fukimoto H., Eddy R.L., Fan Y.S., Byers M.G., Shows T.B., Bell, G.I. (1988) Evidence for a family of human glucose transporter-like proteins. *J. Biol. Chem.* 263: 15245-15248
- [64] Fukimoto H., Kayano T., Buse J.B., Edwards Y., Pilch P.F., Bell G.I., Seino S. (1989) Cloning and characterization of the major insulin-responsive glucose transporter expressed in human skeletal muscle and other insulin-responsive tissues. *J. Biol. Chem.* 264: 7776-7779
- [65] Haber R.S., Weiser K.R., Pritsker A., Reder I., Burstein D.E. (1997) Glut1 glucose transporter expression in benign and malignant thyroid nodules. *Thyroid* 7: 363-367
- [66] Melannen P., Minn H., Grenman R., Härkönen P. (1994) Expression of glucose transporters in head-and-neck tumors. *Int. J. Cancer* 56: 622-629
- [67] Baer S.C., Casaubon L., Younes M. (1997) Expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in cutaneous neoplasia. *J. Am. Acad. Dermatol.* 37: 575-577
- [68] Yamamoto Z., Seino Y., Fukumoto H., Koh G., Yano H., Inagaki N., Yamada Y., Inoue K., Manabe T., Imura H. (1990) Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 170: 223-230
- [69] Younes M., Lechago L.V., Somoano J.R., Mosharaf M., Lechago J. (1996) Wide expression of the human erythrocyte glucose transporter Glut1 in human cancers. *Cancer Res.* 56: 1164-1167
- [70] Lohrer H.D., Hieber L., Zitzelsberger H. (2002) Differential mutation frequency in mitochondrial DNA from thyroid tumours. *Carcinogenesis* 23 (10): 1577-1582
- [71] Loft S., Poulsen H.E. (1996) Cancer risk and oxidative damage in man. *J. Mol. Med.* 74: 297-312
- [72] Marnett L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21: 361-370
- [73] Zeck S.: mündliche Mitteilung unveröffentlichter Daten
- [74] Villette S., Bermano G., Arthur J.R., Hesketh J.E. (1998) Thyroid stimulating hormone and selenium supply interact to regulate selenoenzyme gene expression in thyroid cells (FRTL-5) in culture. *FEBS Letters* 438: 81-84
- [75] Söderberg A., Sahaf B., Rosén A. (2000) Thioredoxin Reductase, a Redox-active Selenoprotein, is secreted by Normal and Neoplastic Cells: Presence in Human Plasma. *Cancer Res.* 60, 2281-2289
- [76] Menth M., Schmutzler C., Mentrup B., Takahashi K., Köhrle J.: Selenium- and retinoic acid-dependent regulation of selenoproteins in the human Hürthle cell carcinoma line XTC.UC1. Zur Veröffentlichung eingereicht bei „Thyroid“
- [77] Hesse K., Dreher I., Baur A., Lex B., Schmutzler C., Schütze N., Jakob F. and Köhrle J. (1999) Expression of selenoproteins in various eukaryotic cell lines. In: Meissner D. (ed) *Spurenelemente.* Stuttgart, Wiss. Verlagsges. 46-48

- 
- [78] Howie A.F., Walker S.W., Akesson B., Arthur J.R., Beckett G.J. (1995) Thyroidal extracellular glutathione peroxidase: a potential regulator of thyroid-hormone synthesis. *Biochem. J.* 308: 713-717
- [79] Köhrle J., Schmutzler C.: mündliche Mitteilung
- [80] Klein M., Gestmann I., Berndorfer U., Schmitz A., Herzog V. (2000) The thioredoxin boxes of thyroglobulin: possible implications for intermolecular disulfide bond formation in the follicle lumen. *Biol Chem.* 381 (7): 593-601
- [81] Roveri A., Flohé L., Maiorino M., Ursini F. (2002) Phospholipid-Hydroperoxide Glutathione Peroxidase in Sperm. *Methods Enzymol.* 347: 208-212
- [82] Köhrle J. (2000) The deiodinase family: selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell. Mol. Life Sci.* 57: 1853-1863
- [83] Winzer, R.: RT-PCR-Nachweis schilddrüsenpezifischer Gene in menschlichen Schilddrüsen Geweben und Zelllinien. Inauguraldissertation, Würzburg, 2000
- [84] Schoenberger J., Ruesschoff J., Marenhagen J., Hofstetter F., Eilles C. (1996) Overexpression of glucose transporter 1 (Glut 1) in thyroid carcinoma as a sign of higher malignancy. An immunohistochemical study [abstract]. 41th Symposium of the German Society of Endocrinology (DGE), Marburg, Germany, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 104 (1): 95
- [85] Haber R.S., Weiser K.R., Pritsker A., Reder I., Burstein D.E. (1997) Glut 1 glucose transporter expression in benign and malignant thyroid nodules. *Thyroid* 7: 363-367
- [86] Schmutzler C., Hoang-Vu C., Boltze C., Rüter B., Köhrle J. Human thyroid carcinoma cell lines show different retinoic acid receptor repertoires and retinoid responses. *Eur. J. Endocrinol.*, erscheint 2004
- [87] Love J.M. and Gudas L.J. (1994) Vitamin A, differentiation and cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 825-831

## **DANKSAGUNG**

Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Josef Köhrle für die Auswahl des Themas sowie für wertvolle Anregungen und Diskussionen. Auch an hektischen Tagen hatte er stets ein offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Danken möchte ich auch besonders herzlich Frau PD Dr. Cornelia Schmutzler für die Hilfe bei der methodischen und inhaltlichen Einarbeitung ins Thema und für die ausgezeichnete und kontinuierliche Betreuung beim Anfertigen der Arbeit.

Mein Dank gilt ferner Frau Dr. Birgit Mentrup für das Erstellen der Western Blots. Ihr und Herrn Dr. Lutz Schomburg, Frau Dr. Regina Ebert-Dümig und Frau Sabine Zeck möchte ich außerdem Danke sagen für interessante fachliche Diskussionen und methodische Tipps.

Ein besonderes Dankeschön meinen Eltern, die mich während des Studiums und der Dissertation finanziell unterstützten und Markus Breitenbach für die kritische Durchsicht und große Geduld.



# LEBENS LAUF

## **PERSÖNLICHE DATEN**

---

Marianne Menth  
geboren am 11. Oktober 1975 in Würzburg  
Ledig

## **SCHULBILDUNG**

---

1982 – 1986      Grundschule in Aub  
1986 – 1995      Gymnasium in Uffenheim

## **STUDIUM**

---

1995 – 2002      Medizinstudium an der Universität Würzburg  
1998 – 1999      Auslandsstudium an der Universität Montpellier, Frankreich  
1996 – 1998      Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes  
1997 – 2002      Stipendiatin des Cusanuswerks

## **DISSERTATION**

---

Thema      „Expression und Regulation von Selenoproteinen in XTC-Zellen“  
                 bei Prof. J. Köhrle, Molekulare Innere Medizin der  
                 Medizinischen Poliklinik Würzburg (jetzt Charité, Berlin)

08/01      Vorstellung der Ergebnisse auf  
                 der Jahrestagung der European Thyroid Association in Warschau  
                 (durch Prof. J. Köhrle),  
03/02      dem 46. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie  
                 in Göttingen und  
12/03      der Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung in Berlin

## **WEITERE QUALIFIKATIONEN**

---

EDV      MS Office, SPSS, Sigma Plot, Corel Draw, Quattro Pro  
Sprachen      Englisch und Französisch (fließend in Wort und Schrift)  
                 Portugiesisch und Spanisch (gute Kenntnisse)  
                 Italienisch (Grundkenntnisse)

## **FREIZEITAKTIVITÄTEN**

---

Sport, Engagement in der Jugendarbeit

## **BERUFSERFAHRUNG UND PRAKTIKA**

---

seit 5/03 ÄiP im Klinikum Großhadern der Universität München,  
Med. Klinik II (Gastroenterologie/Endokrinologie)

## **PRAKTISCHES JAHR**

---

10/01 – 02/02 Chirurgie, Hôpital Pourtalès Neuchâtel, Schweiz  
02/02 – 05/02 Neurologie, Universitätsklinik Würzburg  
05/02 – 07/02 Gastroenterologie und Endokrinologie  
Royal Cornwall Hospital Truro, Großbritannien  
07/02 – 09/02 Nephrologie, Guy's Hospital London, Großbritannien

## **FAMULATUREN**

---

03/98 – 04/98 Chirurgie, Kreiskrankenhaus Ochsenfurt  
10/98 – 12/98 Tumorzentrum (CLRC) Val d'Aurelle  
Universitätskrankenhaus Montpellier, Frankreich  
01/99 – 02/99 Kardiologie, Universitätskrankenhaus Montpellier  
03/99 Pneumologie, Universitätskrankenhaus Montpellier  
04/99 – 06/99 Neurologie, Universitätskrankenhaus Montpellier  
08/99 Hämatologie und Onkologie  
Städtisches Krankenhaus München-Neuperlach  
09/99 – 10/99 Gynäkologie und Geburtshilfe  
Hospicio Hospital Margao, Indien  
10/00 Neurologie und Psychiatrie  
Praxis Dr. M. Kropp, Würzburg

## **PFLEGEPRAKTIKA**

---

7/95 Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Ochsenfurt  
08/95 – 09/95 Orthopädie, Policlinique Bordeaux-Nord, Frankreich

## **SONSTIGE ANSTELLUNGEN**

---

1996 Pflegehilfskraft in der Abteilung für Innere Medizin  
Kreiskrankenhaus Ochsenfurt  
10/99 – 02/00 Tutorin im Präparierkurs

Oellingen, 14.1.2004

