

**Aus dem Zentrum für operative Medizin  
Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. D. K. Bartsch**

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



**In vitro Evaluation der antitumoralen Effekte und des  
Redifferenzierungspotentials von Histondeacetylaseinhibitoren in  
Schilddrüsenkarzinomen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von:

Moritz Arndt Elxnat aus Berlin-Charlottenburg

Marburg 2020

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg  
am: 02. Juni 2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referentin: Prof. Dr. med. Katharina Holzer

1. Korreferent: Prof. Dr. Thorsten Stiewe

MEINER FAMILIE

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	1
Abkürzungsverzeichnis:.....	4
1 Einleitung.....	6
1.1 Das Schilddrüsenkarzinom .....	6
1.1.1 Epidemiologie .....	6
1.1.2 Histologische Einteilung, Ätiologie und Prognose .....	6
1.1.3 Risikofaktoren.....	8
1.1.4 Diagnostik.....	9
1.1.5 Therapie .....	10
1.1.6 Pathophysiologie .....	12
1.1.7 Natrium Iodid Symporter .....	17
1.1.8 HMGA2.....	18
1.1.9 TTF1.....	19
1.1.10 Nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (ncRNAs) .....	19
1.1.11 Histondeacetylasen und Histondeacetylaseinhibitoren .....	22
1.1.12 Zielsetzung und Fragestellungen .....	26
2 Material und Methoden .....	27
2.1 Materialien.....	27
2.1.1 Geräte .....	27
2.1.2 Primer, Antikörper, Kits, Chemikalien, Reagenzien, Medien, Puffer, Lösungen und Gebrauchsmaterialien .....	30
2.1.3 Kits .....	31
2.1.4 Chemikalien und Reagenzien .....	33
2.1.5 Zellkulturmedium.....	34
2.1.6 Puffer, Lösungen, Gele, Marker .....	34
2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....	35
2.1.8 Zelllinien .....	36
2.1.9 Sammlung von Tumorproben.....	37
2.2 Methoden .....	37
2.2.1 Zellkultur .....	38
2.2.2 Zellzahlermittlung.....	41
2.2.3 Prinzip der Zellproliferationsmessung mittels xCELLigence .....	41
2.2.4 Isolierung totaler RNA aus Zellen .....	43

2.2.5	cDNA Herstellung.....	45
2.2.6	Prinzip der Real-Time Polymerase Chain Reaction .....	47
2.2.7	Prinzip der Proteinbestimmung mithilfe des Bicinchoninsäure-Assay .....	49
2.2.8	Prinzip des Western Blot .....	52
2.2.9	In-vitro Radiojoduptake .....	55
2.2.10	Statistische Analyse.....	55
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Einflüsse auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzellen durch HDACi .....	56
3.1.1	Einfluss von Panobinostat auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien .....	57
3.1.2	Einfluss von SAHA auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien	59
3.1.3	Einfluss von TSA auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien ..	61
3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der xCELLigence Versuchsreihe .....	62
3.2	Ergebnisse der qRT-PCR.....	64
3.2.1	Expression von NIS (SLC5A5) .....	64
3.2.2	Expression von HMGA2 .....	65
3.2.3	Expression von TTF1.....	66
3.2.4	Expression von lncRNA H19.....	71
3.2.5	Expression der miRNAs let-7b und let-7f .....	76
3.3	Ergebnisse des Western Blot.....	82
3.4	Ergebnisse des Radiojoduptake.....	85
4	Diskussion .....	88
4.1	Effekte von HDACi in Zelllinien des Schilddrüsenkarzinoms .....	90
4.2	Redifferenzierungspotential der HDACi anhand der NIS Expression und der Radiojodaufnahme.....	92
4.3	Inverse Korrelation von HMGA2 und miRNAs der Let7 Familie in Schilddrüsenkarzinomen .....	95
4.4	Rolle der lncRNA H19 in Schilddrüsenkarzinomen .....	96
4.5	Auswirkungen von HDACi auf den Differenzierungsmarker TTF1 .....	98
4.6	Ausblick .....	101
5	Zusammenfassung und Abstract.....	103
5.1	Zusammenfassung.....	103
5.2	Abstract.....	104
6	Anhang.....	106
6.1	Literaturverzeichnis .....	106
6.2	Verzeichnis meiner akademischen Lehrer .....	116

6.3	Danksagung.....	117
-----	-----------------	-----

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### Abbildungen:

<b>Abbildung 1:</b> Kreisdiagramm mit Darstellung der Häufigkeiten unterschiedlicher Schilddrüsenkarzinome in %	8
<b>Abbildung 2:</b> Genmutationen und Signalwege in Schilddrüsenkarzinomen	14
<b>Abbildung 3:</b> Kreisdiagramm mit den häufigsten Mutationen und Genfusionen in Schilddrüsenkarzinomen aus Schilddrüsenfollikelzellen mit Häufigkeiten	15
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung von Mechanismen der Beeinflussung der Gentranskription durch Histonacetylierung/-deacetylierung	23
<b>Abbildung 5a:</b> TPC1, Vergrößerung 10x	38
<b>Abbildung 5b:</b> TPC1, Vergrößerung 40x	38
<b>Abbildung 6a:</b> BCPAP, Vergrößerung 10x	39
<b>Abbildung 6b:</b> BCPAP, Vergrößerung 40x	39
<b>Abbildung 7a:</b> C643, Vergrößerung 10x	39
<b>Abbildung 7b:</b> C643, Vergrößerung 40x	39
<b>Abbildung 8a:</b> 8505C, Vergrößerung 10x	39
<b>Abbildung 8b:</b> 8505C, Vergrößerung 40x	39
<b>Abbildung 9a:</b> FTC133, Vergrößerung 10x	40
<b>Abbildung 9b:</b> FTC133, Vergrößerung 40x	40
<b>Abbildung 10:</b> Beispielhafte Darstellung von Rohdaten der ZL TPC1, Echtzeit Zellwachstumsanalyse mittels xCELLigence	56
<b>Abbildung 11:</b> Echtzeit Zellwachstumsanalyse (Real Time Cell Viability Analysis) von mit Panobinostat behandelten Schilddrüsenkarzinomzellen	58
<b>Abbildung 12:</b> Echtzeit Zellwachstumsanalyse (Real Time Cell Viability Analysis) von mit SAHA behandelten Schilddrüsenkarzinomzellen	60
<b>Abbildung 13:</b> Echtzeit Zellwachstumsanalyse (Real Time Cell Viability Analysis) von mit TSA behandelten Schilddrüsenkarzinomzellen	62
<b>Abbildung 14:</b> RT-qPCR von SLC5A5 (NIS)	65
<b>Abbildung 15:</b> RT-qPCR von HMGA2	66
<b>Abbildung 16a:</b> RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie TPC1	66
<b>Abbildung 16b:</b> RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie BCPAP	67
<b>Abbildung 16c:</b> RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie 8505C	67

<b>Abbildung 16d:</b> RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie C643	68
<b>Abbildung 16e:</b> RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie FTC133	68
<b>Abbildung 17a:</b> RT-qPCR von TTF1 in ATC Gewebeproben	69
<b>Abbildung 17b:</b> RT-qPCR von TTF1 in FTC Gewebeproben	70
<b>Abbildung 18a:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie TPC1	71
<b>Abbildung 18b:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie BCPAP	71
<b>Abbildung 18c:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie 8505C	72
<b>Abbildung 18d:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie C643	72
<b>Abbildung 18e:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie FTC133	73
<b>Abbildung 19a:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in ATC Gewebeproben	74
<b>Abbildung 19b:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in PTC Gewebeproben	74
<b>Abbildung 19c:</b> RT-qPCR von lncRNA H19 in FTC Gewebeproben	75
<b>Abbildung 20a:</b> RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie TPC1	76
<b>Abbildung 20b:</b> RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie BCPAP	77
<b>Abbildung 20c:</b> RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie 8505C	77
<b>Abbildung 20d:</b> RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie C643	78
<b>Abbildung 20e:</b> RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie FTC133	78
<b>Abbildung 21a:</b> RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie TPC1	79
<b>Abbildung 21b:</b> RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie BCPAP	80
<b>Abbildung 21c:</b> RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie 8505C	80
<b>Abbildung 21d:</b> RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie C643	81
<b>Abbildung 21e:</b> RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie FTC133	81
<b>Abbildung 22a:</b> NIS Protein Level in TPC1	82
<b>Abbildung 22b:</b> NIS Protein Level in BCPAP	83
<b>Abbildung 22c:</b> NIS Protein Level in 8505C	83
<b>Abbildung 22d:</b> NIS Protein Level in C643	83
<b>Abbildung 22e:</b> NIS Protein Level in FTC133	84
<b>Abbildung 23a:</b> Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi in der Zelllinie TPC1	85
<b>Abbildung 23b:</b> Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi in der Zelllinie BCPAP	86
<b>Abbildung 23c:</b> Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi in der Zelllinie 8505C	86



<b>Abbildung 23d:</b> Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi in der Zelllinie C643	87
<b>Abbildung 23e:</b> Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi in der Zelllinie FTC133	87

### **Tabellen:**

<b>Tabelle 1:</b> Schematische Darstellung der in dieser Studie verwendeten Zelllinien mit Angabe des zellulären Ursprungs und des Mutationsstatus.	36
<b>Tabelle 2:</b> Darstellung des PCR-Protokolls zur Vervielfältigung von mRNA Sequenzen	48
<b>Tabelle 3:</b> Darstellung des PCR Protokolls zur Vervielfältigung von miRNA Sequenzen	49
<b>Tabelle 4:</b> Effekt von Panobinostat auf den Zellindex	58
<b>Tabelle 5:</b> Effekt von SAHA auf den Zellindex	60
<b>Tabelle 6:</b> Effekt von TSA auf den Zellindex	61
<b>Tabelle 7:</b> Expression des NIS-Gens	64
<b>Tabelle 8:</b> Expression von HMGA2	
<b>Tabelle 9:</b> Expression von TTF1	69
<b>Tabelle 10:</b> Schematische Darstellung der TTF1 Expression in Schilddrüsenkarzinom Gewebeproben	70
<b>Tabelle 11:</b> Expression von H19	73
<b>Tabelle 12:</b> Schematische Darstellung der lncRNA H19 Expression in Schilddrüsenkarzinom Gewebeproben	75
<b>Tabelle 13:</b> Expression von miRNA Let7b	79
<b>Tabelle 14:</b> Expression von miRNA Let7f	82
<b>Tabelle 15:</b> Expressionslevel des NIS Proteins im Western Blot	84

## Abkürzungsverzeichnis:

AK	Antikörper
ADP	Adenosindiphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ATC	Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	engl.: B-Zell Lymphom 2
CRC	Kolorektales Karzinom
CTCL	Kutanes C-Zell Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DTC	Differenzierte Schilddrüsenkarzinome
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	engl. fetal bovine serum
FDA	engl. Food and Drug Administration
FDG	Fluorodeoxyglucose
FNAC	Feinnadel-Aspiration und Zytologie
FTC	Follikuläres Schilddrüsenkarzinom
FVPTC	Follikuläre Variante der papillären Schilddrüsenkarzinome
HAT	Histonacetyltransferase
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor_en
HIF-1 $\alpha$	Hypoxie-induzierter-Faktor-1-alpha
HMGA	engl. High mobility group AT-hook 2
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
lncRNA	engl. long non-coding RNA
LT <sub>4</sub>	Levothyroxin 4
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MIBG	Metajodbenzylguanidin
min	Minuten

mRNA	engl.: messenger ribonucleic acid
miRNA	engl.: micro RNA
MTC	Medulläres Schilddrüsenkarzinom
NIS	Natrium Iodid Symporter
ncRNAs	engl.: non-coding RNA
pAK	polyklonaler Antikörper
PBS	engl. Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDTC	Schlecht differenziertes Schilddrüsenkarzinom
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PPAR- $\gamma$	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter Rezeptor gamma
PPFP	PAX8-PPARG Fusionsprotein
PTC	Papilläres Schilddrüsenkarzinom
PTEN	engl. Phosphatase and Tensin homolog
PTMC	Papilläre Mikrokarzinome der Schilddrüse
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAIT	Radiojodtherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RTCA	engl. Real Time Cell Analysis
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUMO	Small Ubiquitin-related Modifier
TBS	engl. Tris-buffered saline
TBST	engl. Tris-buffered saline with Tween 20
TKIs	Tyrosinkinaseinhibitoren
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
TTF1	engl. Thyroid Transcription Factor 1
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTC	Undifferenziertes Schilddrüsenkarzinom
VEGF	engl. Vascular Endothelial Growth Factor
ZL	Zelllinie/Zelllinien

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Schilddrüsenkarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das Schilddrüsenkarzinom, der häufigste Tumor der endokrinen Organe, macht etwa 1% aller diagnostizierten malignen Tumoren aus. In den letzten drei Jahrzehnten ist die Inzidenz von Schilddrüsenkarzinomen weltweit angestiegen (Pellegriti et al. 2013; Trocchi et al. 2012). Der Inzidenzanstieg beruht in erster Linie auf dem vermehrten Vorkommen von papillären Schilddrüsenkarzinomen (PTC, s. 1.1.2.1. *Differenzierte Schilddrüsenkarzinome*), ohne signifikanten Anstieg anderer Subtypen des Schilddrüsenkarzinoms (Pellegriti et al. 2013). Nachdem im Jahr 2014 in Deutschland etwa 4280 Frauen und 1840 Männer an einem Schilddrüsenkarzinom erkrankt sind, wurden für das Jahr 2018 bei den Frauen 4500 und bei den Männern 2200 Neuerkrankungen prognostiziert. Das mittlere Erkrankungsalter beträgt bei Frauen 51 Jahre, bei Männern 55 Jahre. Das Lebenszeitrisiko am Schilddrüsenkarzinom zu erkranken war 2014 für Frauen mit 0,8% doppelt so hoch wie für Männer mit 0,4%. Während die Erkrankungsraten bei beiden Geschlechtern in Deutschland im Zeitraum von 1999 bis 2014 erheblich angestiegen sind, sind die Sterberaten jeweils leicht gesunken (Robert-Koch-Institut 2017).

### 1.1.2 Histologische Einteilung, Ätiologie und Prognose

Schilddrüsenkarzinome sind eine heterogene Gruppe maligner Tumoren, die sich in ihrer Klinik und in ihrer Prognose zum Teil wesentlich unterscheiden. Die meisten entstehen aus Schilddrüsenfollikelzellen. Hierzu zählen papilläre Schilddrüsenkarzinome (PTC), follikuläre Schilddrüsenkarzinome (FTC), schlecht differenzierte Schilddrüsenkarzinome (PDTC) und anaplastische Schilddrüsenkarzinome (ATC). Andere entstehen aus parafollikulären C-Zellen (MTC). Selten sind bösartige Lymphome oder Sarkome, die aus dem Mesenchym der Schilddrüse entstehen (Dralle et al. 2013). Im Folgenden werden die unterschiedlichen Schilddrüsenkarzinome vorgestellt.

#### 1.1.2.1 *Differenzierte Schilddrüsenkarzinome*

Differenzierte Schilddrüsenkarzinome entstehen aus Schilddrüsenfollikelzellen und stellen mit einem Anteil von 95% die am häufigsten anzutreffenden Karzinome der Schilddrüse dar (Cabanillas et al. 2016; Peiling Yang und Ngeow 2016). Zu ihnen zählen die papillären Karzinome (PTC, s.o.), welche mit etwa 80% die mit Abstand am

häufigsten auftretende Entität unter den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (DTC) ausmachen. Auch die follikulären Karzinome (FTC) gehören zu den DTC und stellen mit einer Frequenz von etwa 10% die zweithäufigste Entität dar (Schneider und Chen 2013; Peiling Yang und Ngeow 2016). Die häufig vorkommenden PTC haben mit Überlebensraten von über 90% die günstigste Prognose unter den Schilddrüsenkarzinomen. Frauen sind von PTC etwa vier Mal häufiger betroffen als Männer. Bei Erkrankungen an FTC beträgt das Geschlechterverhältnis von Frauen zu Männern sogar 5:1. Sowohl PTC als auch FTC lassen sich in verschiedene Subtypen aufteilen, die sich anhand ihres klinischen Erscheinungsbildes sowie in ihrer Prognose und Therapie zum Teil erheblich unterscheiden (Dralle et al. 2013). Obwohl das Behandlungsergebnis bei DTC in der Mehrzahl der Fälle hervorragend ist, kommen teilweise unzufrieden stellende Resultate vor, wobei die Rezidivrate, trotz teils jahrelanger Remission, bei insgesamt circa 20-30% liegt (Murugan et al. 2018; Xing et al. 2013).

#### ***1.1.2.2 Schlecht differenzierte und undifferenzierte Schilddrüsenkarzinome***

Undifferenzierte, bzw. anaplastische Karzinome (ATC) sind gekennzeichnet durch ein schnelles Wachstum (hohe Mitoseraten), frühe Invasion ins umliegende Gewebe und das frühe Auftreten von Lymphknoten- sowie Fernmetastasen. Obwohl ATC lediglich etwa 0,5%-1,6% aller Schilddrüsenkarzinome ausmachen (Deeken-Draisey et al. 2018; Peiling Yang und Ngeow 2016), sind auf sie >90% der durch Schilddrüsenkarzinome verursachten Todesfälle zurückzuführen (Dralle et al. 2013; Denaro et al. 2013). 2013 beschrieben Schneider und Chen et al., dass ATC sowohl de novo, aber auch durch Dedifferenzierungsprozesse aus DTC entstehen kann (Schneider und Chen 2013). Neueste Daten suggerieren jedoch, dass ATC bereits in frühen Tumorstadien von PTC differieren und somit beide Entitäten unabhängig voneinander entstehen (Capdevila et al. 2018). Anaplastische Tumoren der Schilddrüse sind komplett entdifferenziert, aggressiv und therapieresistent. Die mittlere Überlebenszeit von ATC beträgt ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung etwa fünf Monate (Vu-Phan und Koenig 2014). ATC gehören damit zu den aggressivsten und tödlichsten Karzinomerkrankungen überhaupt (Schneider und Chen 2013). Eine weitere Entität primärer Schilddrüsenkarzinome sind schlecht differenzierte Schilddrüsenkarzinome (PDTC), welche nur etwa 4-7% aller Schilddrüsentumoren ausmachen. Sie sind unter morphologischen und biologischen Gesichtspunkten (Kane und Sharma 2015), sowie prognostisch zwischen DTC und ATC einzuordnen (Dralle et al. 2013).

### 1.1.2.3 Medulläres Schilddrüsenkarzinom

Medulläre Schilddrüsenkarzinome (MTC) hingegen entstehen aus neuroendokrinen, parafollikulär gelegenen C-Zellen. Sie machen 3-8% aller Schilddrüsenkarzinome aus und treten zu circa 30% familiär und zu circa 70% sporadisch auf (Schneider und Chen 2013; Damaskos et al. 2016). Im Rahmen dieser Arbeit wurden keine MTC untersucht, weshalb sie an dieser Stelle lediglich der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Im Folgenden wird nicht näher auf sie eingegangen.

### Häufigkeit der Schilddrüsenkarzinome (%)

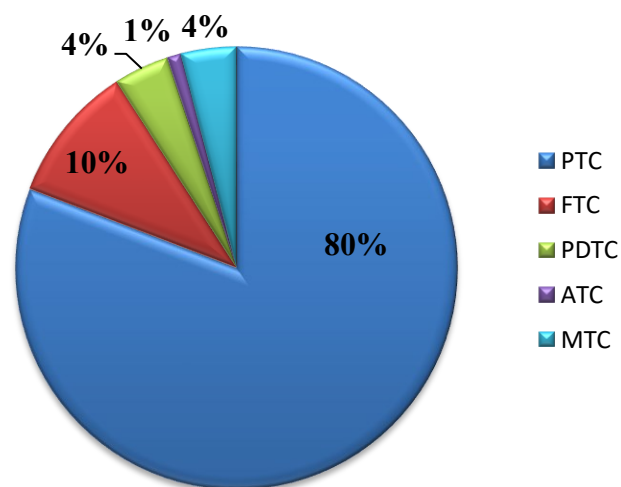


Abbildung 1: Kreisdiagramm mit Darstellung der Häufigkeiten unterschiedlicher Schilddrüsenkarzinome in %. PTC = Papilläres Schilddrüsenkarzinom; FTC = Follikuläres Schilddrüsenkarzinom; PDTTC = Schlecht differenziertes Schilddrüsenkarzinom; ATC = Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom; MTC = Medulläres Schilddrüsenkarzinom

### 1.1.3 Risikofaktoren

Als gesicherter Risikofaktor für Schilddrüsenkarzinome gilt ionisierende Strahlung aus der Umwelt. Kindliches Schilddrüsengewebe ist gegenüber Strahlenbelastung besonders empfindlich. Insbesondere erhöht sich das Risiko für Schilddrüsenkarzinome im Rahmen einer Strahlentherapie. Auch durch die Aufnahme von radioaktivem Jod erhöht sich das Risiko, so war zum Beispiel (z.B.) nach dem Reaktorunglück in Tschernobyl ein deutlicher Anstieg der Erkrankungsraten festzustellen (Robert-Koch-Institut 2017; Dal Maso et al. 2009). Für weitere lebensstil- oder ernährungsbedingte Risikofaktoren gibt es aktuell keine sicheren Beweise. Weiterhin spielen bei einem Teil der Patienten genetische Veränderungen eine Rolle (Robert-Koch-Institut 2017, Cabanillas et al. 2016) (vergleiche (vgl.) 1.1.6.1. Genetische Veränderungen in Schilddrüsenkarzinomen).

#### 1.1.4 Diagnostik

Zur Diagnostik von Schilddrüsenkarzinomen gehört im ersten Schritt eine Anamnese, die bereits Hinweise auf die Möglichkeit des Vorliegens einer malignen Schilddrüsenerkrankung oder eines erblichen Tumorsyndroms (z.B. MEN2 oder familiäres, nicht-medulläres Schilddrüsenkarzinom uvm.), welches häufig mit Schilddrüsenneoplasien einhergeht, liefern kann. Besonders die Familienanamnese erbringt häufig wichtige Informationen. Die klinische Untersuchung beinhaltet vor allem eine Palpation der Schilddrüse. Wichtige Kriterien hierbei sind deren Konsistenz sowie ihre Verschieblichkeit beim Schluckvorgang. Beim Abtasten des seitlichen Halses können vergrößerte Lymphknoten auffallen. Auffällige Befunde sollten gegebenenfalls zur Einleitung weiterer diagnostischer Maßnahmen führen (Dralle et al. 2013). Die Ultraschalluntersuchung des Halses stellt einen wesentlichen Pfeiler in der Diagnostik dar (Morris et al. 2008). Sie gibt Informationen über das Ausmaß und die Struktur von Veränderungen in der Schilddrüse. So können auffällige Befunde der klinischen Untersuchung visualisiert und Verdachtsdiagnosen ggf. erhärtet werden. Als malignitätsverdächtig gelten hierbei unscharf begrenzte, echoarme Knoten mit unregelmäßiger Berandung, Mikrokalzifikationen und zentraler Hypervaskularisierung. Der Sonografiebefund kann einen Malignitätsverdacht mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 80% bekräftigen, eine sichere Diagnose kann damit jedoch nicht gestellt werden. Zur funktionellen Unterscheidung von Knoten können <sup>99m</sup>Tc-Technetium und <sup>123</sup>I-Pertechnetat Szintigraphie eingesetzt werden (Dralle et al. 2013; Hegedüs et al. 2003). Metajodbenzylguanidin (MIBG) Szintigraphie und Fluorodeoxyglucose Positron Emission (FDG) Tomographie/Computer Tomographie (CT) sind aufgrund limitierter Aussagekraft dahingegen eher Sonderfällen vorbehalten. Im Rahmen der Diagnostik müssen bei bestimmten Fragestellungen weitere Untersuchungen durchgeführt werden, z.B. Laryngoskopie bei Stimmveränderungen. Außerdem können weitere Parameter, beispielsweise Calcium zum Ausschluss eines primären Hyperparathyreoidismus, bestimmt werden. Bei palpatorisch und/oder sonographisch verdächtigen Knoten sollte eine Untersuchung mittels Fein-Nadel Aspiration und Zytologie (FNAC) veranlasst werden, da der Befund zur Feststellung etwaiger Malignität hilfreich sein kann. Allerdings kann anhand der FNAC nicht zwischen follikulärem Adenom und Karzinom sowie der follikulären Variante eines PTC (FVPTC) unterschieden werden. So ist bei follikulären Läsionen, aber auch bei sonstigem Malignitätsverdacht und BRAF-mutierten Tumoren ein histopathologischer Befund notwendig. Bei unzureichenden Befunden der

FNAC kann ergänzend eine Biopsie durchgeführt werden, sofern nicht sowieso eine Operation als erforderlich angesehen wird (Dralle et al. 2013).

## **1.1.5 Therapie**

### ***1.1.5.1 Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome***

Ein wichtiger Pfeiler in der Therapie von DTC ist die chirurgische Entfernung des entarteten Gewebes. Das Ausmaß des operativen Eingriffs richtet sich hierbei i.d.R. nach der lokalen Tumorausbreitung, der Invasivität und dem Streuverhalten. PTC <10mm, benötigen i.d.R. keine Thyreoidektomie. Bei diesen sog. PTMC (Papilläre Mikrokarzinome der Schilddrüse) sollte in einer interdisziplinären Absprache zwischen den Vorteilen der Operation und den damit verbundenen Risiken abgewogen werden. Eine Thyreoidektomie gilt hingegen als Mittel der Wahl bei allen PTC > 10mm, sowie invasiven oder metastatischen Tumoren. Auch FTC werden häufig operativ behandelt, jedoch ist für die genaue Art des Eingriffs hier entscheidend, ob die Diagnose einer follikulären Neoplasie histopathologisch gesichert ist und ob es sich um eine einzelne oder mehrere Läsionen handelt (Dralle et al. 2013). Zu den Standardtherapieverfahren bei Patienten mit DTC gehört die Radiojodtherapie. Hierbei wird sie vor allem eingesetzt zur Ablation postoperativ verbleibenden Schilddrüsengewebes, findet aber ebenfalls Verwendung bei der Behandlung von Lokalrezidiven, Metastasen oder nicht vollständig operablen Tumoren (Dietlein et al. 2015; S Dizdarevic et al. 2019). Die Effizienz der Radiojodtherapie (RAIT) ist abhängig von einem ausreichend erhöhten TSH-Serumspiegel (TSH=Thyroidea-stimulierendes Hormon) des Patienten. Ein Serum-TSH von  $\geq 30\text{mU/L}$  steigert die Expression des Natrium-Iodid-Symporters (NIS), wodurch im Idealfall die Jodaufnahme in die Zellen erhöht wird (Luster et al. 2008). Ein solcher TSH Spiegel wird daher vor Verabreichung von  $^{131}\text{I}$  durch vorheriges Aussetzen einer Therapie mit Levothyroxin 4 über vier bis fünf Wochen oder durch ein Zeitintervall von zwei bis drei Wochen nach Thyreoidektomie angestrebt. Alternativ kann den Patienten über einen Zeitraum von etwa einer Woche rekombinantes humanes TSH (rhTSH) verabreicht werden (Dietlein et al. 2015). Voraussetzung für den Erfolg der Radiojodtherapie ist das Vorhandensein eines funktionsfähigen Natrium-Jodid-Symporters in der Membran der Schilddrüsenfollikelzellen (Luster et al. 2008).



### **1.1.5.2 Therapie schlecht differenzierter (PDTC) und undifferenzierter Schilddrüsenkarzinome (UTC)**

Im Gegensatz zu differenzierten Karzinomen, gehen die entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinome PDTC und ATC mit einem hohen metastatischen Potential und fehlendem Ansprechen auf eine Radiojodtherapie einher. Die Resistenz gegenüber Radiojod beruht hauptsächlich auf einer Dysfunktion des Natrium-Iodid-Symporters (NIS), aufgrund einer Suppression des NIS-Gens sowie eines fehlerhaften Einbaus von NIS in die zytosolische Membran (Damanakis et al. 2016). Bei undifferenzierten, anaplastischen Karzinomen muss eine für jeden Patienten individuelle, aus chirurgischen und radioonkologischen Aspekten bestehende Therapieoption gefunden werden. Diese richtet sich stark nach der zum Diagnosezeitpunkt festgestellten Tumorausbreitung und sollte in einer interdisziplinären Tumorkonferenz festgelegt werden (Dralle et al. 2013). Idealerweise sollten ATC in Tumorzentren mit Erfahrung in der Behandlung von ATC behandelt werden. Etablierte Therapieverfahren sind üblicherweise Operation und externe Bestrahlung. In der näheren Vergangenheit wurde zunehmend an selektiv gegen molekulare Bestandteile gerichteten Therapieoptionen ("targeted therapies") für die Therapie von ATC geforscht. Beispiele sind Substanzen gegen die Serin/Threonin-Kinase BRAF, die Mitogen aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK) oder Agonisten des Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor (PPAR $\gamma$ ) (Cabanillas et al. 2016). Diese personalisierten und gezielten Therapieansätze gegen bestimmte molekulare Bausteine, werden durch ein zunehmendes Verständnis genetischer und epigenetischer Veränderungen in ATC entwickelt (Smith und Nucera 2015). Eine gezielte molekulare Therapie, beispielsweise mit Tyrosinkinaseinhibitoren spielt mittlerweile in der Therapie aller Schilddrüsenkarzinome, auch PDTC und ATC eine wichtige Rolle. Zur Behandlung von DTC und PDTC sind 2014 die TKIs Sorafenib und Lenvatinib zugelassen worden (Valerio et al. 2017). Obwohl viele der bisher untersuchten "targeted therapies" in DTC bereits erfolgreich eingesetzt werden konnten, zeigten die meisten davon bisher keine gute Wirksamkeit in ATC. Hierfür wird unter anderem (u.a.) das unterschiedliche molekulare Profil der Karzinome verantwortlich gemacht. Nichtsdestotrotz stellt der Gebrauch von individuell auf molekulare Veränderungen angepasster Therapeutika in präklinischen Modellen derzeit einen vielversprechenden Weg für die Therapie von ATC dar. Weitere Forschung zur Optimierung kombinierter gezielter Therapien für Patienten mit ATC ist erforderlich, um die Prognose dieser tödlichen Erkrankung zu verbessern (Smith und Nucera 2015).

Die Therapie von PDTC ist abhängig von der lokalen Tumorausbreitung sowie von der bereits erfolgten metastatischen Streuung in Lymphknoten und Organstrukturen. Wenn möglich, sollte eine komplette Resektion des Tumors mit postoperativer Radiojodtherapie angestrebt werden. Auch Lymphknotenmetastasen sollten bestenfalls komplett chirurgisch entfernt werden (Dralle et al. 2013).

## **1.1.6 Pathophysiologie**

### **1.1.6.1 Genetische Veränderungen in Schilddrüsenkarzinomen**

Karzinome entstehen unter anderem aus einer Ansammlung genetischer Mutationen. Das Verständnis der Entstehung einer Krankheit ermöglicht die Entwicklung neuer, gegebenenfalls besserer Therapieansätze. Für den einzelnen Patienten können daraus gegebenenfalls prognostische Informationen abgeleitet werden. Im Folgenden soll ein Überblick über die typischen genetischen Veränderungen von Karzinomen der Schilddrüsenfollikelzellen gegeben werden (*vgl. Abbildung 2*).

Für PTC typisch sind Mutationen und Translokationen in BRAF, RET, RAS und NTRK1, die alle Teil der gleichen Signalkaskade sind (Vu-Phan und Koenig 2014).

BRAF gehört zu einer Familie von RAF Proteinen, die als Serin/Threonin Kinasen im Mitogen aktivierten Protein Kinase (MAPK) Signalweg fungieren. Mitglieder der MAPK Kaskade beeinflussen zelluläre Prozesse wie Zellvermehrung, -differenzierung und -überleben (Avruch et al. 2001). BRAF Mutationen in Tumorgewebe resultieren in unregulierter Kinaseaktivität und erhöhter MEK Aktivierung (Wan et al. 2004). In vielen verschiedenen Tumoren finden sich unterschiedliche BRAF Mutationen, in über 90% der Fälle liegt jedoch eine sog. BRAFV600E Mutation vor. Diese führt zu einer von RAS unabhängigen, permanenten Aktivierung von BRAF. Mutationen von BRAF können mit aggressiveren Tumoren korrelieren, was beispielsweise anhand von verstärktem Wachstum, Metastasierungsverhalten und Rezidivrisiko deutlich wird. Klinisch relevant ist außerdem das schlechtere Ansprechverhalten auf eine Radiojodtherapie (Cantwell-Dorris et al. 2011).

RET ist eine Rezeptortyrosinkinase auf der Zelloberfläche, welche Umgebungsreize an RAS und den nachgeschalteten MAPK Signalweg überträgt (Marotta et al. 2011). RET Mutationen sind genetische Rearrangements, die sogenannte RET/PTC hervorbringen, woraus eine permanente RET Tyrosinkinaseaktivität resultiert. Diese finden sich in etwa 15% aller PTC. Die Zellen reagieren weniger sensibel auf TSH-Signale und die

Proliferationsrate erhöht sich, während sich die schilddrüsen-spezifische Genexpression sowie die Zellmorphologie verändern (Vu-Phan und Koenig 2014).

Chromosomale Rearrangements, die das NTRK1-Gen involvieren, kommen nur bei etwa 5% aller PTC vor. Hierdurch entstehen Fusionsproteine, ähnlich wie beim RET/PET (s.o.). Aufgrund ihrer Seltenheit ist die klinische Relevanz dieser Mutation beim PTC noch nicht ausreichend erforscht.

FTC unterscheiden sich von PTC durch ihre follikuläre Organisationsstruktur und das Fehlen PTC typischer Kerneigenschaften. Charakteristisch für FTC sind Mutationen von RAS sowie Translokationen von PAX8-PPAR $\gamma$  (Vu-Phan und Koenig 2014).

Die drei RAS-Proteine H-RAS, N-RAS, und K-RAS regulieren zelluläre Schlüsselprozesse mit Einfluss auf Größe, Differenzierung, Überleben, Adhäsion und Migration. Nachgeschaltete Effektoren von RAS sind z.B. der oben erwähnte RAF/MAPK Signalweg und die PI3K/AKT-Kaskade (s.u.). Mutationen mit konstitutiver RAS Aktivierung sind möglicherweise die bekanntesten Mutationen der gesamten Tumorbilogie. Bezogen auf die Schilddrüse, kommen RAS-Mutationen in etwa 40% aller FTC und 15-20% der PTC, vor. RAS-Mutationen führen u.a. zur Entstehung TSH-unabhängiger Zellproliferation und genomischer Instabilität, wobei deren klinischer Stellenwert noch unklar ist. Zudem konnte eine Korrelation zu aggressiverem Wachstums- und Metastasierungsverhalten sowie höherer Sterblichkeit gezeigt werden, wohingegen RAS Mutationen aber häufig auch in gutartigen follikulären Adenomen und unaggressiven FVPTC (Follikuläre Variante der PTC) ohne Tendenz zur Metastasenbildung nachweisbar sind (Vu-Phan und Koenig 2014).

Die andere vorrangige Mutation in FTC ist PAX8-PPAR $\gamma$ , die in ca. 35% der Fälle vorliegt. Auch in FVPTC, sowie selten in gutartigen follikulären Adenomen ist diese Mutation zu finden. PAX8 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Entwicklung der Schilddrüse eine entscheidende Rolle spielt und in der reifen Drüse die Expression vieler schilddrüsen-spezifischer Gene steuert. PPAR $\gamma$  ist ein zellulärer Transkriptionsfaktor, der eine essentielle Rolle in der Adipogenese spielt. In der Schilddrüse ist er in sehr geringen Mengen exprimiert und erfüllt dort keine bekannte Funktion. Durch eine chromosomale Translokation entsteht ein PAX8-PPAR $\gamma$  Fusionsprotein (PPFP). Der onkogene Mechanismus sowie die prognostische Bedeutung von PPFP sind nur unzureichend verstanden. Die Wirkung insgesamt scheint komplex, so gibt es Daten, die eine tumorsuppressive Funktion von PPFP durch Hemmung von Neovaskularisation suggerieren. Dennoch verursacht PPFP in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien verstärkte

Zellteilung und verminderte Apoptose (Vu-Phan und Koenig 2014; Raman und Koenig 2014).

Zusätzlich kann in Schilddrüsenkarzinomen aufgrund genetischer oder epigenetischer Veränderungen im PTEN (engl. Phosphatase and Tensin homolog) -Signalweg oder auch in der katalytischen Untereinheit von PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), eine verstärkte AKT (auch: Protein-Kinase-B) Aktivierung beobachtet werden. PTEN ist eine Phosphatase, die als negativer Regulator von PI3K fungiert. Aktiviertes PI3K phosphoryliert AKT, welches schließlich an der Regulierung einer Reihe zellulärer Prozesse, wie Proteinsynthese, Überleben und Proliferation beteiligt ist. AKT ist in vielen Tumoren übermäßig aktiv, wodurch PTEN mittels seines negativ regulatorischen Einflusses auf die AKT Signalübertragung eine wichtige tumorsuppressive Wirkung zukommt. (Vu-Phan und Koenig 2014).

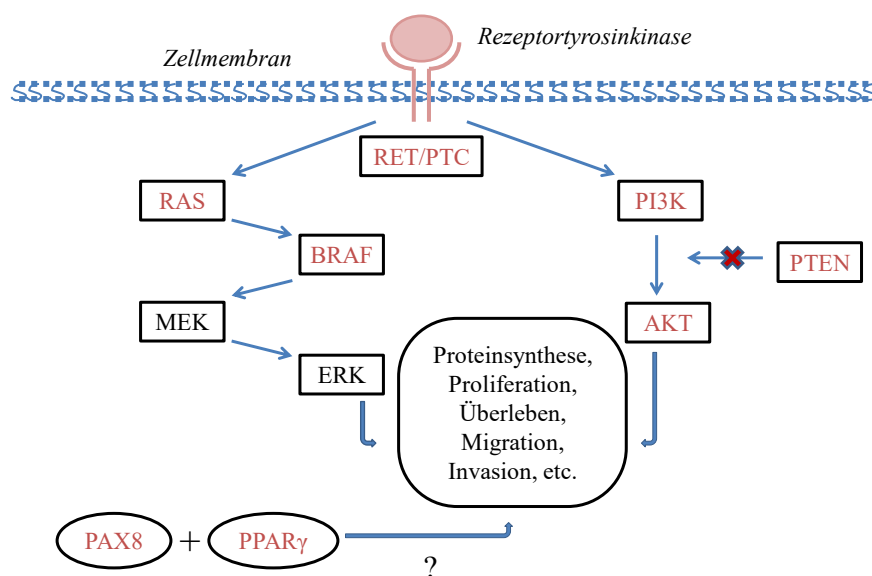


Abbildung 2: Genmutationen und Signalwege in Schilddrüsenkarzinomen. Vereinfachte Darstellung der RAS/MAPK und des PI3K/AKT Signalwegs. Proteine mit häufigen Mutationen sind rot hervorgehoben. Der Pathomechanismus durch PAX8/PPAR $\gamma$  ist noch nicht ausreichend verstanden, deshalb ist der Pfeil mit einem Fragezeichen markiert. Abbildung vereinfacht gestaltet nach einer Vorlage aus Vu-Phan und Koenig 2014.

Einige der oben bereits aufgeführten Mutationen kommen auch in ATC vor. RAS Mutationen sind zu 27%, BRAF Mutationen zu 25%, PTEN zu 11% und die katalytische Untereinheit von PI3K, zu 12% zu finden. Auch RET Genamplifikationen sollen nachgewiesen worden sein, nicht jedoch das Vorkommen von RET/PTC Genfusionen. Das Auftreten dieser Genveränderungen in Kombination mit exklusiv für ATC

assozierten Mutationen, macht eine schrittweise Ansammlung von Mutationen und Entdifferenzierungen in der Entstehung eines ATC wahrscheinlich. TP53 ist ein in vielen Tumorerkrankungen mutierter Tumorsuppressor. In 55% der Fälle ist ein ATC mit einer TP53 Mutation vergesellschaftet. Man geht davon aus, dass der Erwerb einer TP53 Mutation den Krankheitsprozess in Richtung Anaplasie lenkt. In physiologischem Zustand fungiert TP53 als Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit von zellulären Stressfaktoren die Expression vieler Gene reguliert. Somit nimmt es Einfluss auf Apoptose, Zellzyklusprogress, Seneszenz und viele weitere Prozesse der Zelle. Der Verlust dieser Funktion verhindert den regulären Eintritt der Zelle in die Seneszenz oder die Apoptose. Leider ist der Verlust der TP53 Funktion bisher nur schwer wiederherzustellen (Vu-Phan und Koenig 2014).

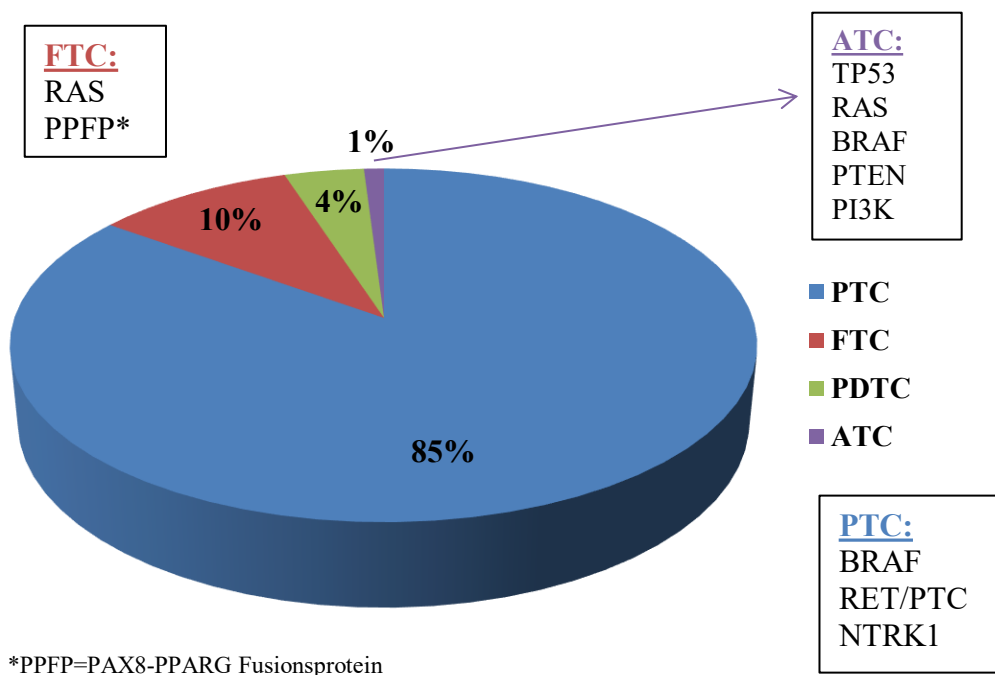


Abbildung 3: Kreisdiagramm mit den häufigsten Mutationen und Genfusionen in den dargestellten Schilddrüsenkarzinomen. Wiederkehrende Mutationen in PDTC sind nicht dargestellt. ATC=Anaplastisches Schilddrüsenkarzinom; FTC=Follikuläres Schilddrüsenkarzinom; PDTC=Schlecht differenziertes Schilddrüsenkarzinom; PTC=Papilläres Schilddrüsenkarzinom (modifiziert nach einer Abbildung aus: Vu-Phan und Koenig 2014)

### **1.1.6.2 Epigenetische Veränderungen in Schilddrüsenkarzinomen**

Zusätzlich zu genetischen Mutationen ist in vergangenen Jahren zunehmend die Bedeutung epigenetischer Ereignisse in der Entwicklung und der Progression menschlicher Tumorentstehung deutlich geworden (Esteller 2007). Der Begriff Epigenetik bezieht sich auf chromosomale Veränderungen, die die Nukleotidsequenz nicht involvieren. Epigenetische Veränderungen haben das Potential zur Veränderung der Genexpression und können vererbt werden. Epigenetische Modulationen umfassen vier Hauptmechanismen: DNA-Methylierung, Chromatinremodeling, nicht-kodierende (engl. non-coding) RNAs und posttranslationale Histonveränderungen. Die letzte Kategorie umfasst kovalente Modifizierungen an Histonen, u.a. Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitinierung. Durch die Änderung des strukturellen Status des Chromatins greifen posttranslationale Histonveränderungen regulierend in biologische Prozesse wie DNA-Replikations- und Reparaturprozesse, Gentranskription und Genomstabilität ein. Über diese Vorgänge scheinen epigenetische Prozesse auch Einfluss auf die Entstehung von Karzinomerkrankungen nehmen zu können (Russo et al. 2013). Der Effekt dieser Veränderungen ist enorm, aber potenziell reversibel, was sie zu einem interessanten therapeutischen Angriffspunkt zur Umkehr maligner Transformationen macht (Vu-Phan und Koenig 2014).

Histone sind die Hauptproteinkomponente der Chromosomenstruktur, indem sie als Spule dienen, um welche jeweils kurze DNA-Abschnitte gebunden liegen. Es gibt eine Vielzahl posttranslationaler Histonmodifikationen, wie ADP Ribosylierung, Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung und SUMOylierung (SUMO = engl. Small Ubiquitin-related Modifier). Durch Änderung der DNA Konformation beeinflussen diese Modifikationen den transkriptionellen Zugang zu Genen. So kann eine Histonacetylierung durch Verminderung der Dichte der Chromatinstruktur die Gentranskription aktivieren, die -deacetylierung hingegen stoppen (vgl. Abb. 4 in Abschnitt: 1.1.11 Histondeacetylasen und Histondeacetylaseinhibitoren). Eine umfassende Dysregulierung von Histonmodifikationen ist ein Bestandteil der Karzinomentstehung allgemein. Wie genau an bestimmten Stellen des Genoms Histonmodifikationen zur Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen beitragen, ist nicht genau bekannt (Vu-Phan und Koenig 2014). Verschiedene Studien belegen, dass die Deacetylierung von Histonen eine wichtige Rolle in der Entstehung von ATC einnimmt, indem zum Beispiel die Überexpression von HDAC dysregulierend in den ERK1/2-MEK1/2 und den PI3K-AKT Signalweg eingreifen (Smith und Nucera 2015).

Das Transkriptom der Säugetiere beinhaltet viele RNA Moleküle, die nicht für Gene kodieren (ncRNAs = engl.: non-coding RNAs). Schätzungen zufolge ist das Verhältnis nicht-kodierender RNA-Transkripte zu mRNAs 10:1. Einige dieser spielen eine Rolle in epigenetischen Prozessen. Long non-coding RNAs (lncRNAs) können an spezifische genomische Strukturen binden und epigenetische Veränderungen an der Chromosomenstruktur inszenieren (Vu-Phan und Koenig 2014). Die Rolle bestimmter ncRNAs wie die microRNAs (miRNAs) Let7b und Let7f sowie die lncRNA H19 werden im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht (vgl. 1.1.10. *Nicht-kodierende Ribonukleinsäuren*).

### 1.1.7 Natrium Iodid Symporter

Der Natrium-Iodid-Symporter (NIS) gehört, nach einer Einteilung des „Online Mendelian Inheritance in Men“ (OMIM), mit etwa 60 anderen Mitgliedern pro- wie eukaryotischen Ursprungs zur Familie der „solute carrier family 5“ (SLC5A). Ein im humanen Genom auf Chromosom 19p12–13.2 lokalisiertes Gen codiert für den 643 Aminosäuren großen humanen NIS (hNIS). Die Sekundärstruktur weist 13 Transmembrandomänen auf, Das NH<sub>2</sub>- Ende zeigt nach extra-, das COOH-Ende nach intrazellulär (Hingorani 2010). Den transmembranären Na<sup>+</sup>- Gradienten nutzend, befördert er in einem aktiven Symport ein Iod und zwei Na<sup>+</sup>-Ionen aus dem Blut in die Follikelzelle (Hingorani 2010; Kelkar et al. 2016). Der elektrochemische Na<sup>+</sup>- Gradient über die Membran wird durch die Aktivität einer Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase aufrechterhalten. Das auf diese Weise in die Zelle gelangte Iod wird an der apikalen Membran der Follikelzelle mittels „pendrin“ in das Lumen des Schilddrüsenfollikels befördert. Aufgrund der Aktivität des NIS ist es möglich, dass Schilddrüsenewebe Iod in 20-40fach höherer Konzentration speichert als es im Blutplasma vorliegt. Im Lumen der Schilddrüsenfollikel stellt Iod einen wichtigen Baustein bei der Synthese der Schilddrüsenhormone T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> dar. Die besondere Eigenschaft der Schilddrüsen-Follikelzellen Iod zu speichern und zu konzentrieren ermöglicht erst eine effektive Therapie von DTC mit Radiojod. Mittlerweile ist Radiojod ein fester Bestandteil in der Therapie von Schilddrüsenkarzinomen geworden (vgl. 1.1.5.1. *Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome*). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Behandlung mit Radiojod bei Karzinompatienten die Mortalität gesenkt und das Gesamtüberleben sogar bei metastasiertem Karzinomleiden verlängert werden kann. Dahingegen haben Patienten mit einem nur geringen Radiojod-Uptake i.d.R. eine deutlich schlechtere Prognose. Die Transkription von NIS wird in erster Linie beeinflusst durch die Ausschüttung und

Wirkung des Thyroidea-stimulierenden-Hormons (TSH), durch dessen Wirkung der zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) Signalweg in Gang gesetzt wird. Dies wiederum löst weitere Signalkaskaden aus, z.B. den Proteinkinase A (PKA) Signalweg. Der TSH-cAMP-PKA Signalweg spielt eine tragende Rolle bei der Differenzierung und Proliferation des Schilddrüsengewebes sowie der NIS Expression, wobei der genaue Mechanismus dessen Wirkung auf die Expression von NIS bisher ungeklärt ist. TSH bindet an den TSH-Rezeptor (TSH-R) an der basolateralen Membran der Follikelzellen. Dadurch wird cAMP vermittelt die NIS-Biosynthese in Gang gesetzt. NIS ist physiologischerweise an der basolateralen Seite der Schilddrüsenfollikelzellen lokalisiert (Hingorani 2010).

### **1.1.8 HMGA2**

Die HMGA Familie besteht aus drei Proteinen: HMGA1a, HMGA1b und HMGA2. Die beiden ersten Proteine sind ein Produkt desselben Gens und entstehen jeweils durch unterschiedliche Splicing Mechanismen (Chiappetta et al. 2008). Die High Mobility Group A (HMGA) Proteine sind kleine, chromatinassoziierte nicht-Histon Proteine, die als architektonische Transkriptionsfaktoren agieren. Die Interaktion von HMGA Proteinen mit DNA führt zu Veränderungen in der Chromatinstruktur, wodurch diesen Proteinen eine regulatorische Funktion bei der Expression einer Vielzahl von Zielgenen zukommt. Das onkogene Potential von HMGA2 wurde erstmals von Ashar et al. (1995) und Schoenmakers et al. (1995) beschrieben. Die HMGA2 Expression ist typischerweise während der Embryonalentwicklung hoch, wohingegen sie in differenzierten Zellen und Geweben quasi nicht nachweisbar ist. Für einige Malignome, beispielsweise der Brust, der Lunge und des Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle, konnte bereits eine starke Assoziation zur Überexpression von HMGA2 nachgewiesen werden (Belge et al. 2008). HMGA Proteine stellen ein einzigartiges Beispiel von Genen dar, die sowohl in gutartigen wie bösartigen Neoplasien vorkommen, jedoch mit unterschiedlichen Mechanismen. So stellen Umstellungen dieser Gene ein typisches Merkmal der meisten gutartigen mesenchymalen Tumoren dar. Im Gegensatz hierzu ist die HMGA Überexpression typisch für Malignome und hierbei sogar verantwortlich für den neoplastischen Phänotyp. Weiterhin geht sie mit einer schlechten Prognose durch verkürztes Überleben und Metastasen einher (Chiappetta et al. 2008). Belge et al. konnten zeigen, dass HMGA2 in den meisten Schilddrüsenkarzinomen signifikant überexprimiert vorliegt. Nimmt man die Histologie als diagnostischen Goldstandard, konnte anhand der HMGA2 Expression mit einer Sensitivität von 95,9% eine maligne



Neubildung nachgewiesen werden. Somit ist HMGA2 sowohl alleinstehend, als auch in der Kombination mit anderen Parametern ein vielversprechender Marker, der potentiell die präoperative Diagnosestellung und Therapie unklarer Knoten in der Schilddrüse verbessern kann (Belge et al. 2008). Interessanterweise findet sich in differenzierten Schilddrüsenkarzinomen eine Diskrepanz der HMGA2 Expression auf mRNA Ebene im Vergleich zur Proteinebene. Sowohl in FTC als auch in PTC lässt sich ein deutlicher Anstieg der HMGA2 spezifischen mRNA Level feststellen, der immunhistochemische Proteinnachweis ist hingegen negativ. Der Grund für die Diskrepanz ist unklar. Es ist anzunehmen, dass posttranskriptionale Mechanismen eine Rolle spielen, die entweder die mRNA Translation inhibieren oder die HMGA2 Protein Degradierung beeinflussen. Eine Hypothese ist die Induktion verschiedener microRNAs (miRs), die HMGA2 als Zielstruktur haben (vgl. 1.1.10.1. *miRNA let-7*). Andererseits könnte auch die ungenügende Sensitivität der Immunhistochemie im Vergleich zur RT-PCR Grund dafür sein, dass die HMGA2 Proteinlevel nicht dargestellt werden (Chiappetta et al. 2008).

#### **1.1.9 TTF1**

Thyroid transcription factor-1 (TTF1), auch bekannt als NKX2-1 ist ein in Schilddrüse, Lunge und zentralem Nervensystem vorkommender Transkriptionsfaktor (Bingle 1997). In der Schilddrüse ist er essentiell für die Organogenese. Er steuert Schilddrüsenfunktionen durch die Regulierung der Expression von organspezifischen Genen in den Schilddrüsenfollikelzellen, eingeschlossen Thyreoglobulin, Thyreoperoxidase, TSH-Rezeptor und NIS (Bingle 1997; Endo et al. 1997). Die meisten differenzierten follikulären Schilddrüsenneoplasien exprimieren TTF1 sowohl auf mRNA- wie auch auf Proteinebene, was TTF1 zu einem verlässlichen Abstammungsmarker sowohl für Schilddrüsen- wie auch für Lungengewebe macht. Dennoch zeigen einige Subtypen von Schilddrüsen- und Lungenkarzinomen niedrige oder negative TTF1-Expression (Kato et al. 2000; Nakamura et al. 2002). Eine Suppression von TTF1 führt zu einem Verlust der normalen Organfunktion, was auch den Jod Metabolismus involviert. Vor allem in undifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen ist TTF1 i.d.R. supprimiert, was im Einklang mit dem Nichtansprechen dieser Tumoren auf Radiojodtherapie steht (Kondo et al. 2009).

#### **1.1.10 Nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (ncRNAs)**

Über 90% des Genoms in Säugetieren wird transkribiert, aber nur 2% werden translatiert. Dem verbleibenden Großteil der transkribierten Gene fehlt eine Proteinkodierende Funktion und er verbleibt untranslatiert. Daher werden sie zur Gruppe der

nicht kodierenden RNAs (ncRNAs) zusammengefasst. Ausgehend von der Größe der ncRNAs werden sie weiterhin unterteilt in „short ncRNAs“ und „long ncRNAs“. Zur Gruppe der short ncRNAs gehören u.a. MicroRNAs (miRNAs), die auch die am intensivsten untersuchten ncRNAs in menschlichen Karzinomen sind. Zur Gruppe der long ncRNAs zählen, mit vielen anderen, zum Beispiel „promoter associated long noncoding RNA (paRNA)“ (Murugan et al. 2018).

#### **1.1.10.1 MicroRNA Let7**

MicroRNAs (miRNA) sind eine wichtige Klasse kleiner regulatorischer RNAs mit einer Länge von etwa 22nt, welche posttranskriptionelle Gen-Stillegungen regulieren (Hutvágner et al. 2001; Hutvágner und Zamore 2002). Die post-transkriptionelle Regulierung von miRNAs ist essentiell während embryonaler Entwicklungsstadien sowie für die korrekte Funktion reifer Gewebe (Fuziwara und Kimura 2017). MiRNAs regulieren zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Apoptose, Überleben, Wachstum, Seneszenz und Migration durch Beeinflussung von mRNAs, die in einer Reihe von Signalwegen eine Rolle spielen. Über 2000 menschliche, reife miRNA Sequenzen konnten bislang in einer miRNA Datenbank verzeichnet werden (Kozomara und Griffiths-Jones 2014). Über die Hälfte menschlicher mRNAs könnten durch miRNA-vermittelte Regulation beeinflusst sein (Friedman et al. 2009). Dass Deregulationen der miRNA Expression in pathogene Prozesse wie Karzinomentstehung involviert sind, scheint demnach hochwahrscheinlich. Eine übergreifende Herunterregulierung der miRNA Expression wurde in Tumorgewebe beobachtet. In einer Studie von Lu et al. konnte gezeigt werden, dass 129 von 217 analysierten miRNAs in soliden humanen Tumoren, im Vergleich zum gesunden Gewebe, unterdrückt waren (Lu et al. 2005). Zudem zeigten schlechter differenzierte Tumorproben eine geringere miRNA Expression als besser differenzierte (Fuziwara und Kimura 2017). Die Differenzierung von Schilddrüsenzellen ist charakterisiert durch die Expression Iod-metabolisierender Gene wie NIS, TPO, TG und Schilddrüsentranskriptionsfaktoren wie TTF1, PAX8 und TTF2, um Schilddrüsenhormone herstellen zu können. Das Expressionsmuster von miRNAs könnte den Differenzierungsgrad der Zellen bestimmen. Einige Gewebe exprimieren spezifische miRNAs, die sowohl die Zellfunktion als auch deren Differenzierung kontrollieren. Beispiele sind miR-122 in der Leber und miR-1/miR-133/miR206 in Herz- und Skelettmuskel. Obwohl Schilddrüsenzellen keine charakteristische miRNA exprimieren, ist in ihnen dennoch eine Sammlung von miRNAs exprimiert, welche mit dem Differenzierungsgrad assoziiert sind. Die gesunde Schilddrüse exprimiert acht miR-

let-7 Isoformen, sowie einige weitere Gruppen von miRNAs. Alle diese miRNAs sind interessanterweise in Schilddrüsenkarzinomen runterreguliert, was darauf hinweist, dass diese miRNAs zur Aufrechterhaltung der Schilddrüsenfollikelzellfunktion und -differenzierung notwendig sind (Fujiwara und Kimura 2017, Swierniak et al. 2013). Die Wiederherstellung der let-7f Expression in einer PTC Zelllinie induzierte die Expression verschiedener Schilddrüsendifferenzierungsgene und Zellproliferationsarrest (Ricarte-Filho et al. 2009). In Karzinomen übt die Deregulation von miRNAs einen pro-onkogenen Effekt aus, indem die Überexpression einer bestimmten miRNA die Translation eines Tumorsuppressor Proteins hemmen kann, wohingegen die Herunterregulierung anderer miRNAs die Expression eines Onkogens erhöhen kann (Esquela-Kerscher und Slack 2006).

Die let-7 Familie und miR-15/miR-16 sind klassische Tumorsuppressor miRNAs, welche die Proto-Onkogene RAS und BCL2 posttranskriptionell regulieren. In gesundem Schilddrüsenewebe sind let-7 miRs hoch exprimiert, während sie in Schilddrüsenkarzinomen herunterreguliert sind (Swierniak et al. 2013; Marini et al. 2011). Auch die Expression des Onkogens HMGA2 wird nachgewiesenermaßen von den miRNAs let7b und let7f beeinflusst. Der NIS ist eine Zielstruktur der miRNA let7f (Damanakis et al. 2016).

#### ***1.1.10.2 Long non-coding RNA H19***

LncRNAs bestehen aus >200nt und haben eine Länge von 200bp bis zu 100kb. Forschungen im Gebiet der lncRNAs haben derzeit einen hohen Stellenwert in der Karzinomforschung, da neuere Erkenntnisse genmodulatorische Funktionen der lncRNAs nachgewiesen haben. Vornehmlich sind sie in der epigenetischen Regulation verschiedener Gene auf unterschiedlichen Ebenen involviert. Sie greifen so in multiple zelluläre Prozesse wie Autophagie, Zelldifferenzierung, Zellzyklusregulation, Proliferation, Migration, Invasion sowie Apoptose und mesenchymale Stammzelldifferenzierung ein (Murugan et al. 2018). Das aktuelle Wissen über lncRNAs zeigt deren Einfluss auf eine Vielzahl menschlicher Erkrankungen, wie auch auf Malignome (Huarte 2015). Anhand ihrer zellulären Funktion können lncRNAs, ähnlich wie Protein-kodierende Gene, in tumorsuppressive und onkogene lncRNAs eingeteilt werden (Murugan et al. 2018). Die lncRNA H19 wurde in vielen menschlichen Malignomen überexprimiert und mit onkogenen Eigenschaften nachgewiesen. Auch in Schilddrüsenkarzinomzelllinien wird H19 im Vergleich zu normalem Schilddrüsenewebe vermehrt exprimiert. Liu et al. konnten speziell in PTC Zelllinien

eine Assoziation der Überexpression von H19 mit verstärkter Proliferation, Migration und Invasion zeigen. Die Reduktion von H19 in diesen Zelllinien führte entsprechend neben vermindertem Zellüberleben, Migration und Invasion sowohl *in vitro* wie *in vivo* zu einem Wachstumsstopp (Liu et al. 2016b).

#### **1.1.11 Histondeacetylasen und Histondeacetylaseinhibitoren**

Histonacetylierungen und -deacetylierungen sind assoziiert mit transkriptioneller Aktivierung und Hemmung. Die Bindung von Acetylgruppen neutralisiert positive Ladungen der Histonmoleküle, wodurch die Dichte der Chromatinstruktur aufgelockert wird und die Transkriptionsmaschinerie binden kann. Das Gegenteil ist der Fall, wenn die Histone deacetyliert werden. Hierdurch verdichtet sich die Chromatinstruktur und die DNA wird für die Transkription unzugänglicher. Alternativ kann die Acetylierung dazu dienen, dass hier Proteine binden, die eine Öffnung der Chromatinstruktur verursachen und somit das Binden der Transkriptionsmaschinerie ermöglichen (*siehe Abb. 4*) (Russo et al. 2013). Es besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Histonacetylierungen, katalysiert durch sogenannte Histonacetyltransferasen (HAT) und -deacetylierungen, welche durch Histondeacetylasen (HDAC) katalysiert werden. In Zellen von Säugetieren wurde eine Vielzahl Proteine mit Funktionen von HAT und HDAC gefunden, und nach strukturellen Gemeinsamkeiten in Gruppen eingeteilt (Yang 2004). HDAC lassen sich in fünf Hauptgruppen (I, IIA/B, III, IV, V) einteilen, die sich z.B. nach der Lokalisation der Enzyme in Zellkompartimenten oder der funktionellen Abhängigkeit von Co-Enzymen richten (Russo et al. 2013). HDAC der Klassen I und II besitzen ein Zink Molekül als wesentlichen Bestandteil ihrer katalytischen Aktivität (Ruijter et al. 2003; Thiagalingam et al. 2003).

Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) sind Verbindungen, deren Funktion auf der Bindung dieser Zinkstelle des HDAC Enzyms beruht, wodurch dessen Aktivität gehemmt und die Acetylierungslevel der Histone wiederhergestellt werden (Souza und Chatterji 2015). Bereits die Tatsache, dass epigenetische Veränderungen, im Gegensatz zu Mutationen im Genom, pharmakologisch modifizierbar sind, rechtfertigt das Interesse der medizinischen Gemeinschaft an der Epigenetik. Mitglieder der Substanzklasse der HDACi können anhand ihrer chemischen Struktur in Hydroxamsäurederivate, kurzkettige Fettsäuren, Benzoesäureamide, zyklische Tetrapeptide und weitere Komplexe eingeteilt werden. Eine andere Einteilungsmöglichkeit richtet sich nach ihrer Spezifität gegenüber den unterschiedlichen Klassen der HDAC. Da sich durch die Deacetylierung die Chromatinstruktur verdichtet, wäre durch den Effekt von HDACi

zunächst mit einer Erhöhung der Transkriptionsrate zu rechnen. Es zeigt sich jedoch, dass in Abhängigkeit vom affektierten Gen die einzelnen Substanzen sowohl aktivierende wie auch hemmende Einflüsse auf die Transkriptionsrate haben können. Dies reflektiert die Komplexität der beeinflussten Vorgänge, die sich in Abhängigkeit vom entsprechenden Signalweg, Protein, Chaperon o.ä. darstellen. Aktuelle klinische Studien verschiedener Substanzen dieser Klasse an unterschiedlichen Karzinomentitäten erbringen vielversprechende Ergebnisse. So stellen HDACi facettenreiche Medikamente dar, die in verschiedenste tumorfördernde Signalwege eingreifen und präferentiell transformierte Zellen zerstören, indem sie beispielsweise Apoptose oder einen Zell-Zyklus-Arrest induzieren, wobei sie gesunden Zellen gegenüber kaum toxische Wirkungen zeigen. Diese Eigenschaft liegt vor allem an der vorliegenden Überexpression von HDAC in vielen Tumorgeweben begründet (Russo et al. 2013). Die Behandlung von Schilddrüsenkarzinomzelllinien mit HDAC Inhibitoren verändert die Expressionslevel von Schlüsselgenen. Sie erhöhen die Transkriptionslevel schilddrüsenpezifischer Differenzierungsmarker wie NIS, TPO und PAX8, wodurch ihnen eine mögliche Funktion zur Wiederherstellung von Radiojodavidität oder zur Redifferenzierung zukommt (Vu-Phan und Koenig 2014).

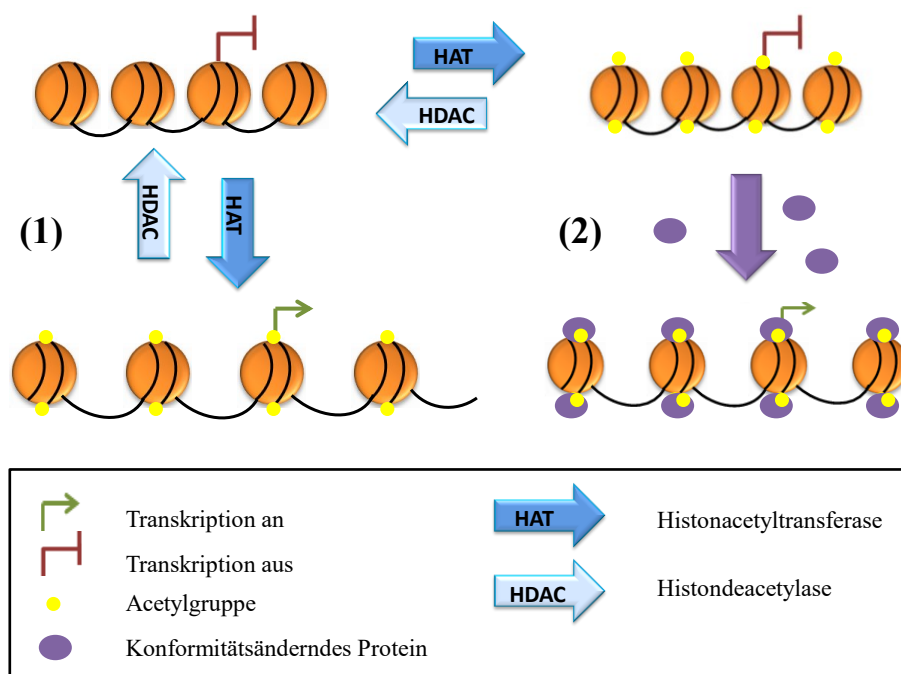


Abbildung 4: Schematische Darstellung von Mechanismen der Beeinflussung der Gentranskription durch Histonacetylierung/-deacetylierung. Die Acetylierung von Histonen führt zur Lockerung der Chromatinstruktur entweder direkt (1) oder durch Bindung konformitätsverändernder Proteine (2). Beides kann zur Erhöhung der Transkriptionsrate führen. Modifiziert nach Russo et al. 2013

#### **1.1.11.1 Panobinostat**

Panobinostat (LBH589), auch bekannt unter dem Handelsnamen Farydak®, ist ein Hydroxamsäurederivat mit potentiell antineoplastischer Aktivität. Die chemische Summenformel ist  $C_{21}H_{23}N_3O_2$ , das Molekulargewicht beträgt 349,434 g/mol. Panobinostat inhibiert selektiv HDAC durch Induktion von Hyperacetylierung von Histonproteinen, woraus eine geänderte Proteinexpression im Zellzyklus, Zellzyklusarrest in der G2/M Phase oder Apoptose resultieren können. Zudem scheint Panobinostat die Expression von mit Angiogenese zusammenhängenden Genen wie Hypoxie-induzierter-Faktor-1-alpha (HIF-1 $\alpha$ ) und VEGF (engl.: Vascular Endothelial Growth Factor) zu modulieren, wodurch die Chemotaxis und Invasion von Endothelzellen geschädigt wird (Pubchem, 2006, online).

#### **1.1.11.2 SAHA/Vorinostat**

Der HDACi SAHA (engl.: Suberoylanilide hydroxamic acid), auch geläufig als Zolinza®, inhibiert HDACs der Klasse I und II und findet bei der Behandlung hämatologischer Tumoren, aber auch bei Karzinomen der Prostata, des Kolons, fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinomen und einigen anderen Tumorentitäten bereits Verwendung (Golabek et al. 2015). Vorinostat, ein synthetisches Hydroxamsäurederivat mit antineoplastischer Aktivität, besitzt die Summenformel  $C_{14}H_{20}N_2O_3$  und hat ein Molekulargewicht von 264,325 g/mol. Mittels Bindung an die katalytische Domäne von HDACs kann die funktionelle Hydroxamgruppe das Zink Ion im katalytischen Zentrum der HDAC komplexieren und somit die Deacetylierung hemmen. Dies führt zu einer Ansammlung von sowohl hyperacetylierten Histonen wie auch Transkriptionsfaktoren. Die Hyperacetylierung der Histone führt zur Hochregulierung der Cyclin-abhängigen Kinase p21, was einen G1 Arrest induziert. Die Hyperacetylierung weiterer nicht-Histon Proteine wie p53,  $\alpha$ -Tubulin und Hitzeschockprotein 90 (HSP90) führt zu weiteren anti-proliferativen Effekten. SAHA induziert zudem Apoptose und sensibilisiert Tumorzellen zu Zelltodvorgängen. Es kann die Blut-Hirn-Schranke überwinden (Pubchem, 2005, online).

#### **1.1.11.3 Trichostatin A**

Trichostatin A (TSA) ist ein natürliches Derivat einer Dienhydroxamsäure, welche aus der Bakteriumspezies *Streptomyces* isoliert wurde. Trichostatin A hat ein Molekulargewicht von 302,374 g/mol und die Summenformel ist  $C_{17}H_{22}N_2O_3$ . Es inhibiert spezifisch und reversibel HDAC, wodurch Histone, die die Chromatinstruktur modulieren, hyperacetyliert werden. Der Anstieg des Histonacetylierungsstatus

verhindert Tumorzellwachstum, fördert die Differenzierung von Gewebe und verursacht Apoptose in transformierten Zellen sowohl in vitro als auch in tumortragenden Tieren (Pubchem, 2005, online).

### **1.1.12 Zielsetzung und Fragestellungen**

Ziel dieser Arbeit war es, die Effekte auf das Zellwachstum sowie das Redifferenzierungspotential der HDACi Panobinostat, SAHA und Trichostatin A in Schilddrüsenkarzinomzellen zu untersuchen. Untersucht wurden zwei papilläre (TPC1 und BCPAP) Zelllinien, eine schlecht differenzierte (8505C) Zelllinie, eine anaplastische (C643) Zelllinie sowie eine follikuläre (FTC133) Zelllinie. Außerdem standen verschiedene Tumorgewebe (16 PTC, 8 FTC, 12 ATC) zur Verfügung. In diesen konnte ohne vorherige HDACi Behandlung die Expression potentiell für die Karzinogenese relevanter Gene analysiert werden.

### **Folgende Fragen sollten beantwortet werden:**

F1: Welchen Effekt hat die Behandlung mit HDACi auf das Wachstum etablierter Schilddrüsenkarzinomzellen?

F2: Inwiefern ist es möglich in Schilddrüsenzellen, die durch Entdifferenzierungsprozesse keinen funktionsfähigen NIS mehr exprimieren, die NIS Expression durch den Einsatz von HDACi wiederherzustellen?

F3: Kann die Behandlung mit HDACi nicht nur die NIS mRNA, sondern auch ein funktionsfähiges NIS Protein wiederherstellen? Sind die behandelten Zellen anschließend in der Lage Radiojod aufzunehmen?

F4: Wie verhält sich die Expression von HMGA2 in Zelllinien unterschiedlicher Schilddrüsenkarzinome unter dem Einfluss von HDACi?

F5: In welchem Zusammenhang stehen HMGA2 und miRNAs der Let7 Familie?

F6: Welche Rolle spielt die lncRNA H19 in Schilddrüsenkarzinomen?

F7: Wie präsentiert sich die Expression des Thyroid Transcription Factor 1 (TTF1) in Geweben unterschiedlicher Schilddrüsenkarzinome? Wie wirken sich HDACi auf die Expression des Differenzierungsmarkers TTF1 aus?



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

Gerät	Typ	Firma
Mikroskop	TMS	Nikon Metrology NV, Alzenau, Deutschland
	TMS-F	Nikon Metrology NV, Alzenau, Deutschland
	DM-IL LED	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	Plan Optik AG, Elsoff, Deutschland
Sterilbank	Sterilbank Bio-II-A	Telstar, Industrial, S.L., Terrassa, Spanien
	Work Bench, Hera Safe Typ: HS 12	Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Wasserbad	TW20	Julabo GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5415 R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	GS-15R	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
	Biofuge pico	Heraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Vortexer	Combi-Spin FVL-2400N	Biosan, Gelsenkirchen, Deutschland
	Vortex Mixer 7-2020	neoLab GmbH, Heidelberg, Deutschland

Rollenmischer	RM5-40	CAT, M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Pipetten	Handbetrieben, verschiedene Volumina	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	akkubetrieben; Pipetboy accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Abzug	SCALA Secuflow Tischabzug	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen, Deutschland
Brutschrank	Inkubator	Haraeus Instruments, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Cycler	C1000™ Thermal Cycler Model No.: CFX96™ Optics Module	Bio-Rad Lbt., Inc., Düsseldorf, Deutschland
	FlexCycler Block: Block assembly T48	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Blottinggerät	Trans-Blot SD Cell	Bio-Rad Lbt., Inc., Düsseldorf, Deutschland
Kamera	Fusion	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop Lite	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
xCELLigence	xCELLigence RTCA	ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA (USA)
Emax, precision microplate reader	S/N E10643	Molecular Devices, LLC, San José, CA (USA)
Kühlschränke	-80°C: CVK-UB 2	Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan
	-20°C: Liebherr Comfort	Liebherr International AG, Bulle FR, Schweiz
	Kühl-Gefrier(-20°C)- Combi KGS 3213-5	Liebherr International AG, Bulle FR, Schweiz
	Gefrierschrank (-20 °C)	Liebherr International AG, Bulle

		FR, Schweiz
	Gefrierschrank (-20 °C)	Köttermann GmbH & Co. KG, Uetze, Deutschland
Eismaschine	Eismaschine	Manitowoc Ice, Inc. Manitowoc, WI (USA)
Software	RTCA 1.2.1.	ACEA Biosciences Inc., San Diego, CA (USA)
	REST 2009	Qiagen, Hilden, Deutschland
	FUSION-CAPT 15.15	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
	Microsoft Office	Microsoft, Redmond, Washington (USA)

### 2.1.2 Primer, Antikörper, Kits, Chemikalien, Reagenzien, Medien, Puffer, Lösungen und Gebrauchsmaterialien

<b>Primer</b>	<b>Produktname</b>	<b>Firma</b>
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
NKX2	Hs_NKX2-1_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
SLC5A5	Hs_SLC5A5_1_SG QuantiTect Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
HMGA2	qHsaCED0021425	BioRad Lbt., Inc., Düsseldorf, Deutschland
H19	PPH05814B-200	Qiagen, Hilden, Deutschland

<b>miRNA Primer</b>	<b>Produktname</b>	<b>Firma</b>
RNU6-2	Hs_RNU6-2_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Let7-b	Hs_let-7b_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland
Let7-f	Hs_let-7f_1 miScript Primer Assay	Qiagen, Hilden, Deutschland

<b>Antikörper</b>	<b>Produktname/ Bestellnummer</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>
anti NIS	clone FP5A/MS-1653-P1	Maus, mAK	1:500	Neomarkers, Inc., USA
anti-Maus	HRP konjugiert/P0447	Ziege, pAK	1:2000	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
anti-GAPDH	anti-GAPDH Antibody/ab9485	Kaninchen, pAK	1:2000	Abcam, Cambridge Großbritannien

### 2.1.3 Kits

Name	Verwendung	Bestandteile	Firma
NucleoSpin® miRNA (50 preps)	RNA- Isolierung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Binding Buffer MX</li> <li>- Wash Buffer MW1</li> <li>- Wash Buffer MW2</li> <li>- RNase freies Wasser</li> <li>- NucleoSpin® RNA Columns (blue rings)</li> <li>- NucleoSpin® RNA Columns (green rings)</li> <li>- Collection Tubes (1,5mL)</li> <li>- Collection Tubes (2mL)</li> <li>- Collection Tubes (2mL, Lid)</li> </ul>	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
SuperScript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR	cDNA- Herstellung	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oligo(dT)20 (50µM)</li> <li>- Random hexamers (50ng/µl)</li> <li>- 10X RT buffer 200mM Tris-HCl (pH 8,4), 500mM KCl</li> <li>- 25mM MgCl<sub>2</sub></li> <li>- 0,1M DTT</li> <li>- 10mM dNTP mix</li> <li>- SuperScript™ III RT (200U/µl)</li> <li>- RNase OUT™ (40U/µl)</li> <li>- E.coli RNase H (2U/µl)</li> <li>- DEPC-treated water</li> <li>- Total HeLa RNA (10ng/µl)</li> <li>- Sense Control Primer (10µM)</li> </ul>	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland

		- Antisense Control Primer (10 $\mu$ M)	
miScript II RT Kit	cDNA Herstellung aus miRNA	- 5x miScript HiSpec Buffer - 10x Nucleics Mix - RNase freies Wasser - miScript Reverse Transcriptase Mix	Qiagen, Hilden, Deutschland
GoTaq® qPCR Master Mix	PCR	- 25 $\times$ 1ml GoTaq® qPCR Master Mix, 2X - 5 $\times$ 100 $\mu$ l CXR Reference Dye - 10 $\times$ 13ml Nuclease-Free Water	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
miScript SYBR Green PCR Kit (2000)	PCR	- 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix - 10x miScript Universal Primer - RNase freies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay Kit	BCA- Proteinbestim mung	Pierce® BCA Protein Assay Reagent A, enthält: Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in 0,1M Natriumhydroxid  Pierce® BCA Protein Assay Reagent B, enthält: 4% Kupfersulfat Albumin Standard	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland

		Ampules, 2mg/mL, 10 × 1mL Ampullen, enthält: Bovine Serum Albumin (BSA) 2mg/mL in 0,9% Saline und 0,05% Natriumazid.	
--	--	---	--

#### 2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Typ	Firma
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
FBS Superior	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup> , low endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Trypan Blue Solution (0,4%)	Sigma Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution 0,05%/0,02% (w/v) in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Sample Reducing Agent 10x	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol, Absolute, Molecular Biology Grade	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
TWEEN 20	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
TBS	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, Deutschland

### 2.1.5 Zellkulturmedium

Zellkulturmedium	Bestandteile	Firma
RPMI 1640 with Stable Glutamine	- 500mL RPMI 1640 with Stable Glutamine - 10% FBS Superior - 10U/mL Penicillin - 100µg/mL Streptomycin	Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland

### 2.1.6 Puffer, Lösungen, Gele, Marker

Name	Bestellnummer	Firma
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	34578	Thermo Fisher Scientific Dreieich, Deutschland
MOPS SDS Running Buffer 20x	NP0001	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NuPAGE LDS Sample Buffer 4x	NP0007	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NuPAGE Transfer Buffer 20x	NP0006-1	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NuPAGE Antioxidant	NP0005	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NuPAGE Sample Reducing Agent	NP0004	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
NuPAGE 4-12% Bis-Tris Protein Gels, 1.0mm, 12 well	NP0322BOX	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland
MagicMark XP Western Protein Standard	LC5602	Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland



ProSieve QuadColor Protein Marker	830550	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
HEPES Puffer	Art. 9105.2	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Typ	Firma
Haemacytometer Deckgläser 20x26mm	Plan Optik AG, Elsoff, Deutschland
96 Low Profile PCR Plate	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Adhesive PCR Seal	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
E-Plate 96 VIEW	OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15mL	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 50mL	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland
25cm <sup>2</sup> TC Flasche T25	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland
75cm <sup>2</sup> TC Flasche T75	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland
175cm <sup>2</sup> TC Flasche T175	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Pipettenspitzen bis 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serological Pipette 2mL - 50mL	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland
Filterpapier, Extra Thick 7,5x10cm	Bio-Rad Lbt, Inc., Düsseldorf, Deutschland
Amersham 0,2µm Nitrocellulose	Amersham Biosciences Corp., Freiburg, Deutschland
6-well Platten	Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg,

	Deutschland
<sup>131</sup> I	Nuklearmedizin, Universitätsklinikum Marburg

### 2.1.8 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden fünf Zelllinien (ZL) unterschiedlichen histopathologischen Ursprungs und Mutationsstatus untersucht. Zwei dieser ZL stammen ab von papillären (TPC1 und BCPAP), eine von einem anaplastischen (C643), eine von einem schlecht differenzierten (8505C) Schilddrüsenkarzinom und die letzte aus der Lymphknotenmetastase eines follikulären (FTC133) Schilddrüsenkarzinoms. Die ZL TPC1, C643 und FTC133 wurden freundlicherweise von Prof. A. Zielke (Diakonieklinikum Stuttgart, Stuttgart, Deutschland) zur Verfügung gestellt; wohingegen die ZL BCPAP und 8505C beim DSMZ (Leibniz Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) erworben wurden. Der Mutationsstatus der Zelllinien ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Zellen wurden in der hauseigenen Tumorzellbank aufbewahrt und bis zu ihrer Kultivierung in flüssigem Stickstoff bei 196°C kryokonserviert.

**Tabelle 1: Schematische Darstellung der in dieser Studie verwendeten Zelllinien mit Angabe des zellulären Ursprungs und des Mutationsstatus.**

Zelllinie	TPC1	BCPAP	8505C	C643	FTC133
<b>Ursprung</b>	PTC	PTC/PDTC	PDTC	ATC	FTC
<b>TP53</b>		Mutiert	Mutiert	Mutiert	Mutiert
<b>HRAS</b>	Stille Mutation			Mutiert	
<b>RET/PTC</b>	Mutiert				
<b>BRAF</b>		Mutiert, V600	Mutiert, V600		
<b>PTEN</b>				Mutiert	Mutiert
<b>TERT promoter</b>	Mutiert	Mutiert	Mutiert	Mutiert	Mutiert
<b>weitere:</b>	STAG2, CDKN2A		NF2	VTCN1	NF1; MSH-6, FLCN

(Cellosaurus cell line, 2020, online)

### 2.1.9 Sammlung von Tumorproben

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Universitätsklinik Marburg wurden nach unterschriebener Einverständniserklärung der betreffenden Patienten zwischen 1998-2012 im Rahmen von Schilddrüsenresektionen an der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie Gewebeproben entnommen und nach ihrer Gewinnung in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  im klinikseigenen Labor steril tiefgefroren. Zwischen 1998-2012 wurden u.a. 16 PTC, 8 FTC und 12 ATC Gewebeproben asserviert und anschließend weiterführende Untersuchungen gemäß positivem Votum der Ethikkommission an diesen durchgeführt:

- "Neue Therapiestrategien zur Behandlung schlecht und undifferenzierter Schilddrüsenkarzinome - Evaluation immunmodulatorischer und redifferenzierender Therapien" - AZ Studie 123/19;
- "Prätherapeutische Prüfung der Effizienz von Selumetinib und weiteren zielgerichteten Therapeutika zur Redifferenzierung metastasierter und radiojodrefraktärer Schilddrüsenkarzinome" AZ Studie 92/15;
- "Evaluation innovativer Therapiestrategien bei anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen anhand eines neuartigen in-vivo Xenotransplantationsmodells" AZ 166/09

## 2.2 Methoden

In den im Folgenden beschriebenen Versuchsreihen kamen u.a. verschiedene in vitro Verfahren zum Einsatz, welche in diesem Kapitel näher erläutert werden. Hierzu gehören:

- (1) Zellwachstumsanalyse mittels xCELLigence in fünf Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien nach Behandlung mit HDACi zur Evaluierung der Effekte der verwendeten Substanzen auf das Wachstumsverhalten der Zellen.
- (2) RT-qPCR zur Evaluation der Expressionsmuster verschiedener für die Pathophysiologie und Eigenschaften von Schilddrüsenkarzinomen relevanter Gene.
- (3) Untersuchung der NIS Expression auf Proteinebene mittels Western Blot.
- (4) Evaluation der Auswirkungen der HDACi Behandlung auf die Radiojodaufnahmekapazität der Schilddrüsenzellen mittels eines Radiojodaufnahmeversuchs.

### 2.2.1 Zellkultur

Die im Folgenden beschriebenen zellkulturellen Methoden wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Abweichungen davon werden gesondert erwähnt.

Die Zellen wurden nach dem Auftauen in eine Zellkulturflasche 75cm<sup>2</sup> TC Flasche (Sarstedt, AG und Co. KG, Nürnberg, Deutschland) überführt. Alle Zelllinien wurden in mit 10U/mL Penicillin und 100µg/mL Streptomycin (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland) und 10% fetal bovine serum (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) versetztem RPMI 1640 with Stable Glutamine Medium (Capricorn Scientific GmbH, Ebsdorfergrund, Deutschland) unter Standardbedingungen (37°C; 5% CO<sub>2</sub>, wasserdampfgesättigte Atmosphäre) kultiviert. Sie wurden routinemäßig auf Kontamination mit Mycoplasmen untersucht. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt.

Zum Passagieren der Zellen wurden diese zunächst mit PBS Dulbecco w/o Ca<sup>2+</sup>, w/o Mg<sup>2+</sup>, low endotoxin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen und anschließend für einige Minuten im Brutschrank bei 37°C mit 0,05%/0,02% (w/v) Trypsin/EDTA (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) inkubiert. Zum Beenden der Trypsin/EDTA-Reaktion wurde RPMI 1640 Medium zugegeben. Die sich nun in der Zellkulturflasche befindliche Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1000Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand des Zentrifugats abgesaugt, das Pellet mit RPMI 1640 Medium resuspendiert und je nach Größe des Pellets 1:2 oder 1:3 verdünnt in eine neue Kulturflasche überführt.

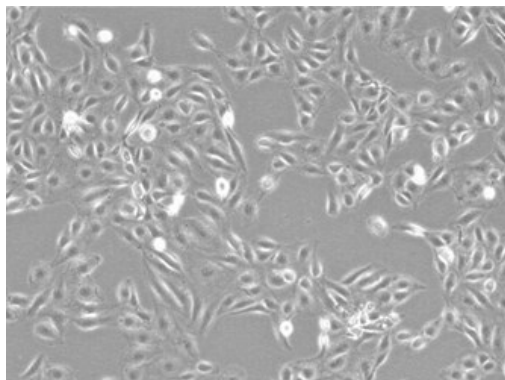


Abbildung 5a: TPC1, Vergrößerung 10x

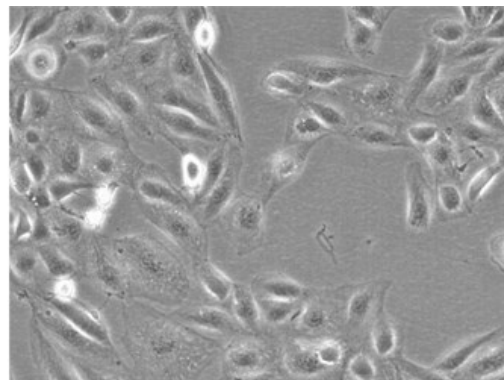
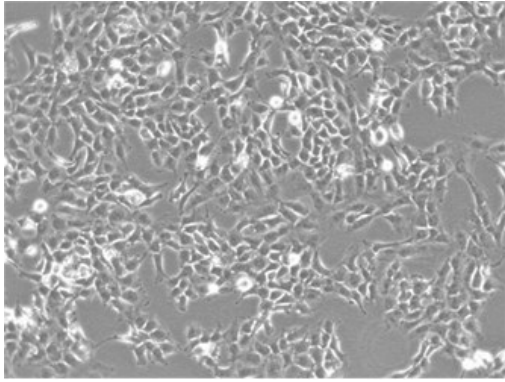
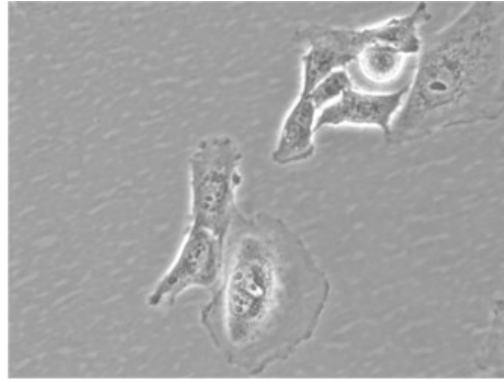


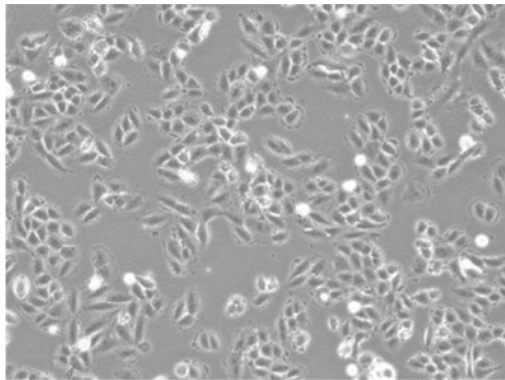
Abbildung 5b: TPC1 Vergrößerung 40x



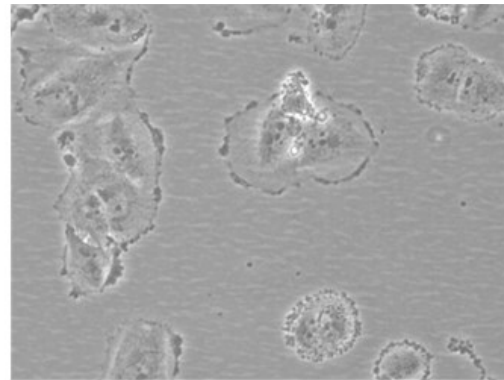
**Abbildung 6a: BCPAP, Vergrößerung 10x**



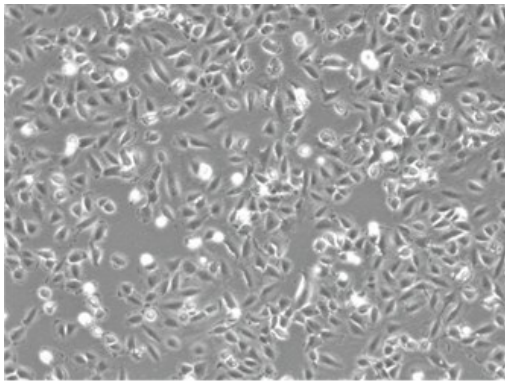
**Abbildung 6b: BCPAP, Vergrößerung 40x**



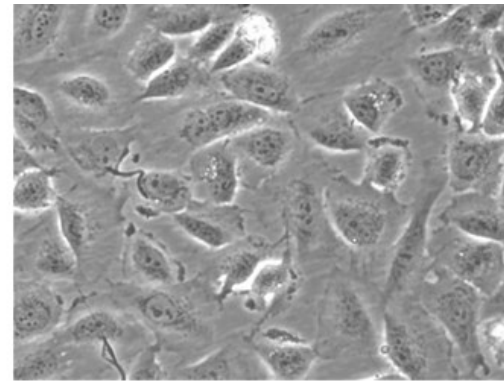
**Abbildung 7a: C643, Vergrößerung 10x**



**Abbildung 7b: C643, Vergrößerung 40x**



**Abbildung 8a: 8505C, Vergrößerung 10x**



**Abbildung 8b: 8505C, Vergrößerung 40x**

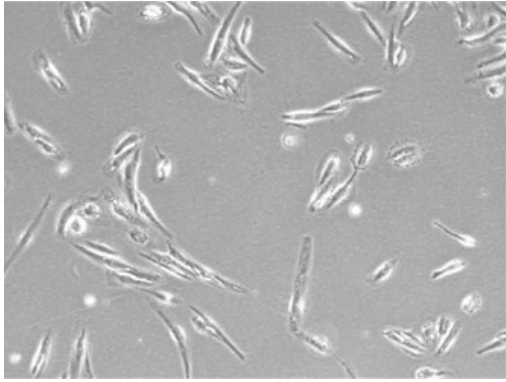


Abbildung 9a: FTC133, Vergrößerung 10x

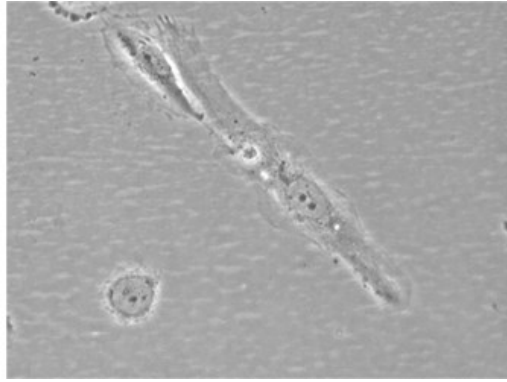


Abbildung 9b: FTC133, Vergrößerung 40x

### 2.2.2 Zellzahlermittlung

Für einige der im Folgenden beschriebenen Versuche war es nötig, die genaue Zellzahl zu ermitteln. Dazu wurden die sich in Kultur befindlichen Zellen, analog zum Vorgang der Zellpassage (vgl.: 2.2.1 Zellkultur), aus ihren Flaschen gelöst und abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1mL RPMI 1640 Medium resuspendiert. 100µL der Zellsuspension wurden zu 900µL PBS/Trypanblau gegeben (800µL PBS + 100µL Trypanblau). Die vier Quadranten einer Neubauer-Zählkammer wurden einzeln ausgezählt und anschließend der Mittelwert berechnet. Die so ermittelte Zellzahl „x“ in einer Neubauer-Zählkammer entspricht per Definition  $x \cdot 10^4$  Zellen/mL. Da die Zellsuspension vorher 1:10 mit PBS/Trypanblau verdünnt wurde (s.o.), ergibt sich also die Zellzahl  $x \cdot 10^4 \cdot 10 = x \cdot 10^5$  Zellen/mL.

### 2.2.3 Prinzip der Zellproliferationsmessung mittels xCELLigence

Der xCELLigence ist ein Verfahren mithilfe dessen indirekt Aussagen über die Zahl, Vitalität und Morphologie von Zellen getroffen werden können. Das Verfahren beruht auf der Messung von Impedanz (Wechselstromwiderstand), mit der nichtinvasiv die Vitalität der kultivierten Zellen gemessen werden kann. Die Messungen werden in speziellen Mikrotiterplatten durchgeführt, deren Vertiefungen fingerartig ineinandergreifende, mit Gold beschichtete Mikroelektroden beinhalten. Mit steigender Anzahl auf dem Boden der Plattenvertiefungen haftender Zellen erhöht sich die Impedanz, die in Abhängigkeit von der Zeit anhand eines einheitslosen und damit relativen Wertes, dem Zellindex (s.u.), angegeben wird. Durch das kontinuierliche Monitoring der Lebensfähigkeit der Zellen ist es möglich den Effekt zytotoxischer Substanzen genau zu observieren (Ke et al. 2011).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Zellproliferationsmessung zur Findung der niedrigsten inhibitorischen Konzentration der Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) Panobinostat, SAHA und TSA pro Zelllinie verwendet.

#### 2.2.3.1 Durchführung der Zellproliferationsmessung mittels xCELLigence

Die Zellproliferationsmessung wurde mittels RTCA-System xCELLigence durchgeführt. Auf einer goldbeschichteten 96-well Platte (E-Plate 96 VIEW, OLS OMNI Life Science, Bremen, Deutschland) wurden zunächst in jedes well 100µL RPMI 1640 Medium vorgelegt und im Anschluss daran ein Ausgangswert bestimmt. In jedes well wurden nun weitere 100µL Zellsuspension zugegeben. Die im Folgenden aufgeführte Zellzahl ist nicht bei jeder Zelllinie gleich, bedingt durch Unterschiede in der Wachstumsgeschwindigkeit als auch in der Größe und Morphologie der Zellen.

Entsprechendes gilt für Zellzahlangaben weiter unten im Text (vgl. z.B.: 2.2.4.1 *Aussäen der Zellen*; 2.2.7.1 *Durchführung der Proteinbestimmung*). Die Zellzahl pro well für die einzelnen ZL war wie folgt:

- TPC1:  $6 \cdot 10^3$  Zellen/well
- BCPAP:  $6 \cdot 10^3$  Zellen/well
- C643:  $6 \cdot 10^3$  Zellen/well
- FTC133:  $3 \cdot 10^3$  Zellen/well
- 8505C:  $3 \cdot 10^3$  Zellen/well

Die Platte wurde in das xCELLigence Messgerät gestellt, wo die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24h anwachsen konnten. Anschließend wurde der Zellindex normalisiert und die Zellen mit den HDACi Panobinostat, SAHA und TSA für mindestens 80 Stunden behandelt. Die Normalisierung des Zellindex beschreibt die Festlegung des aktuellen Zellwachstums zu einem bestimmten Zeitpunkt als 1.0 (100%). Alle im Anschluss daran bestimmten Werte können nun in Relation zu diesem Wert angegeben werden (Kho et al. 2015). Hier wurde der Zellindex zum Zeitpunkt der Behandlung der Zellen mit den HDACi normalisiert. Dazu wurde zunächst das Medium aus den wells abgezogen und verworfen. Die wells wurden anschließend erneut mit je 200µL frischem Medium befüllt, jeweils versetzt mit einem der genannten HDACi der Konzentration 10µM, 1µM, 100nM, 10nM oder 1nM. Laut Atadja et al. liegt die IC<sub>50</sub> von Panobinostat je nach gehemmter HDAC Klasse zwischen 2,5-531nM, die von SAHA zwischen 27,1-12522 nM (Atadja 2009). TSA hatte zytotoxische Effekte in Zellen des Blasenkarzinoms in einer Konzentration von 250-500nM (Wang et al. 2017b). Jede Konzentration, sowie eine unbehandelte Kontrolle für jede Zelllinie, wurde in Dreifachbestimmung getestet. Zum Zeitpunkt der Behandlung wurde die Impedanzmessung gestartet und später mittels RTCA-Software Version 1.2.1 ausgewertet. In den weiteren Versuchen wurden die Zellen anschließend lediglich mit denen im xCELLigence ermittelten Konzentrationen behandelt (vgl. 3.1.4 *Zusammenfassung der Ergebnisse der xCELLigence Versuchsreihe*).



## 2.2.4 Isolierung totaler RNA aus Zellen

Mithilfe des Kits NucleoSpin® miRNA 50 preps (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wurde aus mit HDACi behandelten Zellen totale RNA isoliert. Von jeder der fünf Zelllinien wurde die RNA aus Zellen zweier unbehandelter Kontrollen, sowie je zwei Proben mit Panobinostat [10nM], SAHA [10µM] und TSA [1µM] behandelter Zellen isoliert. Das genaue Vorgehen wird im Folgenden erläutert.

### 2.2.4.1 Aussäen der Zellen

Für jede Zelllinie wurde in acht kleinen Kulturflaschen (25cm<sup>2</sup>) 5mL RPMI 1640 Medium vorgelegt und jeweils

TPC1:	6*10 <sup>5</sup> Zellen
BCPAP:	6*10 <sup>5</sup> Zellen
C643:	8*10 <sup>5</sup> Zellen
8505C:	6*10 <sup>5</sup> Zellen
FTC133:	9*10 <sup>5</sup> Zellen

ausgesät. Das in den kommenden Abschnitten beschriebene Procedere ist beispielhaft für die acht Kulturflaschen einer Zelllinie und wurde für die anderen Zelllinien gleichermaßen durchgeführt: Nach 24h erfolgte bei allen Flaschen ein Mediumwechsel. Die Zellen in jeweils zwei der Flaschen wurden entsprechend der im xCELLigence ermittelten Konzentrationen mit Panobinostat [10nM], SAHA [10µM] und TSA [1µM] behandelt. Die zwei unbehandelten Flaschen dienten als Kontrolle. Alle Kulturflaschen wurden nachfolgend im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 48h inkubiert.

### 2.2.4.2 Ablösen der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturflaschen dem Brutschrank entnommen und die Zellen unter sterilen Bedingungen aus jeder einzelnen Flasche wie folgt abgelöst: Das Medium wurde mit einer Pipette abgezogen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Alsdann wurden die Kulturflaschen mit jeweils 5mL PBS gewaschen und dieses hiernach auch in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Auf die Zellen wurde 1mL Trypsin/EDTA gegeben und die Flaschen erneut für zwei Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde zum Stoppen des Trypsinisierungsvorganges 5mL RPMI 1640 Medium zugegeben und die gesamte Zellsuspension in oben genanntes Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde nun bei 1000Upm und 4°C für 5 Minuten

zentrifugiert und danach der Überstand über dem entstandenen Pellet abgesaugt. Protokollgemäß wurde das Pellet mit 800µL TRIzol® resuspendiert und in ein 1,5mL Eppendorf Cup überführt.

### **2.2.4.3 RNA-Aufreinigung**

Den Anweisungen im Protokoll folgend wurden die Proben für 15s gevortext und im Anschluss bei Raumtemperatur (18-25°C) für 5min inkubiert. Dann wurde in jedes Cup 160µL Chloroform zugegeben, erneut für 15s gevortext und für weitere 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Cups für 15min bei 12.000Upm und 4°C zentrifugiert. Hierbei entstand ein Drei-Phasen-Gemisch, wovon 400µL der oberen, wässrigen Phase in ein neues 2mL Sammelröhrchen pipettiert wurden. Zu dem klaren Überstand wurden jeweils 1000µL ‚Buffer MX‘ zugegeben und mittels 5s vortexen miteinander vermischt. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur. In neuen 2mL Sammelröhrchen wurden NucleoSpin® RNA Columns (blue ring) platziert. Auf jede dieser Säulen wurden nun 700µl von einer der Proben pipettiert und das Sammelröhrchen mitsamt der Säulen und der Probe für 30s bei 11.000Upm zentrifugiert. Der Durchfluss durch die Säulenmembran wurde verworfen, das restliche Probenmaterial auf die Säule gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Nun wurden die 2mL Sammelröhrchen inklusive des Durchflusses verworfen und die NucleoSpin® RNA Column in ein jeweils frisches 2mL Sammelröhrchen gelegt. Zur weiteren Aufreinigung der RNA wurde die Kieselerde-Membran der NucleoSpin® RNA Columns mit zwei unterschiedlichen Puffern gewaschen. Auf jede Säulenmembran wurden zunächst 600µL ‚Buffer MW1‘, dann 700µL ‚Buffer MW2‘ pipettiert. Nach jeder Zugabe von Pufferlösung erfolgte eine Zentrifugation der Säulen bei 11.000Upm für 30s, der Durchfluss wurde hiernach jedes Mal verworfen. Im nunmehr vorletzten Schritt wurden schließlich 250µl ‚Buffer MW2‘ auf die Membran pipettiert und die Säule bei 11.000Upm für 2min zentrifugiert, um die Membran komplett zu trocknen. Zur Eluierung der RNA wurden die NucleoSpin® RNA Columns in ein neues, 1,5mL fassendes Sammelröhrchen transferiert. Um eine möglichst hohe RNA-Konzentration in jeder Probe zu erhalten wurden nun lediglich 30µL RNase free H<sub>2</sub>O auf die Säulenmembran gegeben, alle Proben für 1min bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich für 30s bei 11.000Upm zentrifugiert. Die Säulen wurden verworfen. Der Gehalt an RNA wurde mithilfe des Spektralphotometers NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) bestimmt und die gewonnenen RNA-Proben schließlich bei -80°C verwahrt.

## 2.2.5 cDNA Herstellung

### 2.2.5.1 Durchführung der cDNA Herstellung aus totaler RNA

Zur Herstellung von cDNA aus der gewonnenen RNA wurde das Kit „SuperScript™ III First Strand Synthesis System for RT-PCR“ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) verwendet. Alle im Kit befindlichen Komponenten waren bis zu ihrer Nutzung bei -20°C gelagert. Vor ihrer Verwendung wurden die Komponenten jeweils gemixt und kurz zentrifugiert, um verbleibende Flüssigkeit von der Wand der Tubes zu sammeln. Die im Folgenden genannten Mengenangaben beziehen sich auf die Herstellung von cDNA aus einer RNA Probe, mit allen verbleibenden Proben wurde analog verfahren.

**Schritt 1:** Ein 0.2ml Eppendorf Cup wurde befüllt mit:

- $x^{(*)}$   $\mu$ l RNA (entsprechend 500ng RNA)
  - 1  $\mu$ l Oligo(dT)<sub>20</sub> (50 $\mu$ M)
  - 1  $\mu$ l Random hexamers (50ng/ $\mu$ l)
  - 1  $\mu$ l 10mM dNTP Mix
  - $x^{(*)}$   $\mu$ l DEPC-behandeltes Wasser
- = 10 $\mu$ l Gesamtvolumen

(\*x entspricht hier jeweils dem Volumen der angegebenen Substanz, z.B. RNA, Wasser etc. die benötigt wird um das entsprechende Gesamtvolumen zu erstellen.)

Der Ansatz von 10 $\mu$ l wurde für 5min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde er auf Eis gelegt.

**Schritt 2:** Für den cDNA Synthese Mix wurden folgende Komponenten in einem 1,5mL Eppendorf Cup zusammenpipettiert, die Mengenangaben wurden entsprechend der Anzahl der verwendeten Proben „y“ (hier: y=1) angepasst:

- $y$  \* 2 $\mu$ L 10X RT buffer
  - $y$  \* 4 $\mu$ L 25mM MgCl<sub>2</sub>
  - $y$  \* 2 $\mu$ L 0,1M DTT
  - $y$  \* 1 $\mu$ L RNase OUT
  - $y$  \* 1 $\mu$ L SuperScript™ III RT
- = 10 $\mu$ L cDNA Synthese Mix

10µl des cDNA Synthese Mix wurden in das oben beschriebene 0.2mL Cup pipettiert und der gesamte Mix (20µL/tube) vermischt und für einige Sekunden zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben für zehn Minuten bei 25°C und dann für 50min bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Inkubation für fünf Minuten bei einer Temperatur von 85°C beendet. Die Proben wurden auf Eis platziert.

**Schritt 3:** Die Reaktionsansätze wurden erneut durch kurze Zentrifugation gesammelt, dann wurde zu jedem Ansatz 1µL RNase H zugegeben. Im Anschluss folgte eine erneute Inkubation für 20 Minuten bei 37°C.

**Schritt 4:** Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **2.2.5.2 Durchführung der cDNA Herstellung aus miRNA**

Zur Herstellung von cDNA aus miRNA wurde das „miScript II RT Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) benutzt. Bis unmittelbar vor der Nutzung des Kits wurde es gemäß den Vorgaben bei -20°C aufbewahrt. Verbleibende Reagenzien wurden im Anschluss wieder eingefroren. Als Probenmaterial wurden die zuvor gewonnenen RNA-Proben verwendet (vgl.: 2.2.4 *Isolierung totaler RNA aus Zellen*), die auch miRNA beinhalten. Für jede Probe wurde ein eigenes 0,2mL Eppendorf Cup vorbereitet, in welches entsprechend des Protokolls folgende Reagenzien zusammenpipettiert wurden:

- 4µL 5x HiSpec Buffer
- 2µL 10x Nucleics Mix
- x<sup>(\*)</sup>µL RNase freies Wasser
- 2µl Reverse Transcriptase Mix
- x<sup>(\*)</sup>µL Template RNA (entsprechend 500ng)  
= 20µL cDNA Synthese Mix

(\*x entspricht hier jeweils dem Volumen der angegebenen Substanz, z.B. RNA, Wasser etc., die benötigt wird um das entsprechende Gesamtvolumen zu erstellen.)

Im Anschluss an die Zugabe der Template RNA wurde jedes Cup geschüttelt um die einzelnen Komponenten zu mixen, dann für einige Sekunden zentrifugiert, um an den Wänden rückständige Flüssigkeit zu sammeln. Nun wurden die Proben für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Darauf folgte eine weitere Inkubation bei 95°C für fünf Minuten, um den Reverse Transcriptase Mix zu inaktivieren und die Reaktion zu stoppen. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurde die fertige cDNA bei -20°C eingefroren.

### 2.2.6 Prinzip der Real-Time Polymerase Chain Reaction

Mit der in vitro Technik PCR können bestimmte DNA Abschnitte gezielt vervielfältigt werden. Der zu amplifizierende Bereich liegt auf einem DNA Strang, welcher Matrize genannt wird. Kurze, einzelsträngige DNA Moleküle, sogenannte Primer, dienen als Starthilfe. Sie sind komplementär zu den Enden der Zielsequenz auf dem Matrizenstrang und lagern sich dort an. Unter passenden Reaktionsbedingungen kann nun eine DNA Polymerase die Primer entlang der Matrize verlängern, sodass ein doppelsträngiger DNA-Strang entsteht.

Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, welches in der Regel in 25-35 Zyklen durchgeführt wird. Während des ersten und zweiten Zyklus entstehen noch Produkte undefinierter Länge, da die DNA-Polymerase den zur Matrize komplementären Strang so lange synthetisiert, bis sie durch den Beginn des nächsten Zyklus unterbrochen wird oder von alleine aufhört. Ab dem dritten Zyklus haben alle neu entstehenden Produkte die gesuchte Länge und ab dem vierten Zyklus vervielfältigt sich die Anzahl der Produkte exponentiell. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten:

**Schritt 1:** Die DNA Stränge müssen denaturiert werden, damit sich im folgenden Schritt die Primer anlagern können (= "annealing"). Die Denaturierung geschieht bei einer Temperatur zwischen 95-100°C.

**Schritt 2:** Die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer ist spezifisch für den jeweiligen Primer und liegt zwischen 37-65°C.

**Schritt 3:** In diesem letzten Schritt eines jeden Zyklus synthetisiert eine hitzestabile DNA Polymerase bei 72°C entlang der DNA Matrize eine Verlängerung des Primers.

Zu den obligaten Reagenzien einer PCR gehören also der zu amplifizierende DNA-Abschnitt und die dazu komplementären Primer. Weiterhin werden für die Verlängerung des DNA Stranges eine hitzestabile Form der DNA Polymerase sowie Desoxynukleotidtriphosphate (dNTP) als deren Bausteine benötigt. Eine Pufferlösung sorgt für einen konstanten pH-Wert während der Reaktion. Sie enthält  $Mg^{2+}$ -Ionen, die mit den dNTP einen löslichen Komplex eingehen, welcher ausschlaggebend für den dNTP Einbau ist (Newton und Graham 1997).

Bei der hier verwendeten Real-Time PCR kann im Anschluss an jeden Zyklus der PCR die Menge der entstandenen Produkte mittels einer Fluoreszenzmessung quantifiziert werden. Dabei finden fluoreszierende DNA-Farbstoffe, wie der bei dieser Arbeit benutzte Sybr-Green Farbstoff (Qiagen, Hilden, Deutschland) Verwendung, die in die

DNA interkalieren. Mit steigender Anzahl der Produkte steigt auch die Fluoreszenz der Farbstoffe, was eine Quantifizierung der entstandenen Produkte ermöglicht.

### 2.2.6.1 Durchführung der RT-PCR

Zur Durchführung der PCR wurde das „GoTaq® qPCR Master Mix“ Kit (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Zunächst wurde eine Standardreihe angelegt. Dazu wurde in fünf 0,2mL Eppendorf Cups jeweils 3µL Nuclease-freies H<sub>2</sub>O vorgelegt. 3µL einer cDNA-Probe wurden anschließend in das erste der Eppendorf Cups zugegeben und mittels vortexen und kurzer Zentrifugation gut mit dem vorgelegten H<sub>2</sub>O vermischt. Daraus ergaben sich 6µL einer 1:2 verdünnten Probe. Von dieser wurden wiederum 3µL in das folgende Eppendorf Cup überführt und auf o.g. Weise gemischt, sodass eine 1:4 verdünnte Probe entstand. Die gleiche Art und Weise fortführend wurde auch eine 1:8, 1:16 und eine 1:32 verdünnte Probe erstellt. Zur weiteren Kontrolle wurde je eine Negativkontrolle angesetzt.

Die qPCR wurde auf einer 96-well Platte für jede Probe in Doppelbestimmung durchgeführt. In jedes benötigte ‚well‘ wurden 10µL GoTaq qPCR Master Mix, x<sup>(\*)</sup>µL Primer und x<sup>(\*)</sup>µL Nuclease-freies H<sub>2</sub>O vorgelegt, sodass ein Ansatz von 19µL/well entstand (\*x entspricht hier jeweils dem Volumen der angegebenen Substanz, z.B. RNA, Wasser etc., die benötigt wird um das entsprechende Gesamtvolumen zu erstellen.).

Im Anschluss wurde je 1µL der Probe bzw. der Standardreihe zupipettiert. Das Gesamtvolumen pro well betrug also 20µL. Die 96-well Platte wurde mit durchsichtiger Klebefolie zugeklebt und somit nach außen hin luftdicht verschlossen. Mittels zentrifugieren der Platte bei 1000Upm für 1min wurden die Reagenzien am Boden der wells gesammelt. Anschließend wurde die Platte sofort in den Cyclyer gestellt und die PCR entsprechend dem Protokoll inkubiert:

Tabelle 2: Darstellung des PCR-Protokolls zur Vervielfältigung von mRNA Sequenzen

Phase	Anzahl der Zyklen	Dauer pro Zyklus	Temperatur
Aktivierung/Reaktionsstart	1	2min	95°C
Denaturierung	40	15s	95°C
Anlagerung der Primer	40	60s	60°C
Dissoziation	1	0,5°C/s	60-95°C

Analog zum eben beschriebenen Verfahren wurde auch die PCR der miRNA Sequenzen durchgeführt. Hierfür wurde das miRNA PCR Kit „miScript SYBR Green PCR Kit (2000)“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Zyklen dieser PCR waren wie folgt:

**Tabelle 3: Darstellung des PCR Protokolls zur Vervielfältigung von miRNA Sequenzen**

<b>Phase</b>	<b>Anzahl der Zyklen</b>	<b>Dauer pro Zyklus</b>	<b>Temperatur</b>
Aktivierung/Reaktionsstart	1	15min	95°C
Denaturierung	60	15s	94°C
Anlagerung der Primer	60	30s	55°C
		30s	70°C
Dissoziation	1	5s	65°C
		60s	95°C

### **2.2.7 Prinzip der Proteinbestimmung mithilfe des Bicinchoninsäure-Assay**

Unter Proteinbestimmung versteht man allgemein Methoden zur Quantifizierung von Proteinmengen. Ein kolorimetrisches Verfahren zur Proteinbestimmung stellt der sogenannte Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) dar, wobei die Verfärbung der zu untersuchenden Proteinlösung mit der Verfärbung bekannter, geeichter Proteinkonzentrationen verglichen wird.

Peptidbindungen, sowie Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin reduzieren unter bestimmten Bedingungen  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$ .  $\text{Cu}^+$  wiederum bildet mit BCA einen Farbkomplex, der bei einem Absorptionsmaximum von 562nm gemessen werden kann (Proteinbestimmung (o.J.), online).

#### **2.2.7.1 Durchführung der Proteinbestimmung**

Zur Proteinbestimmung wurde mit „Pierce BCA Protein Assay Kit“ (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland) gearbeitet. Im Folgenden wird das Vorgehen Schritt für Schritt erläutert:

**Schritt 1:** Aussäen der Zellen:

Die Zahl der in Kultur gehaltenen Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (vgl.: 2.2.2 Zellzahlermittlung). Für jede Zelllinie wurde in acht mittleren Kulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) 10mL RPMI 1640 Medium vorgelegt und jeweils

TPC1:	1,5*10 <sup>6</sup> Zellen
BCPAP:	1,5*10 <sup>6</sup> Zellen
C643:	2,0*10 <sup>6</sup> Zellen
8505C:	1,5*10 <sup>6</sup> Zellen
FTC133:	0,5*10 <sup>6</sup> Zellen

ausesät. Das in den kommenden Abschnitten beschriebene Procedere ist beispielhaft für die acht Kulturflaschen einer Zelllinie und wurde für die anderen Zelllinien gleichermaßen durchgeführt: Nach 24h erfolgte bei allen Flaschen ein Mediumwechsel. Die Zellen in jeweils zwei der Flaschen wurden entsprechend der im xCELLigence ermittelten Konzentrationen mit Panobinostat [10nM], SAHA [10µM] und TSA [1µM] behandelt. Die zwei übrigen Flaschen dienten als Kontrolle. Alle Kulturflaschen wurden nachfolgend im Brutschrank bei 37°C und 5-prozentiger CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 48h inkubiert.

**Schritt 2:** Ablösen der Zellen & Erstellen der Proteinlysate:

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kulturflaschen dem Brutschrank entnommen und die Zellen unter sterilen Bedingungen aus jeder einzelnen Flasche wie folgt abgelöst: Das Medium wurde mit einer Pipette abgezogen und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Alsdann wurden die Kulturflaschen mit jeweils 10mL PBS gewaschen und dieses hiernach auch in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Auf die Zellen wurde 2mL Trypsin/EDTA gegeben und die Flaschen erneut für zwei Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde zum Stoppen des Trypsinisierungsvorganges 10mL RPMI 1640 Medium zugegeben und die gesamte Zellsuspension in o.g. Zentrifugenröhrchen gegeben. Dieses wurde nun bei 1000Upm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand über dem entstandenen Pellet danach abgesaugt. Das Pellet wurde danach in 50µL HEPES Buffer resuspendiert und in ein 1,5mL Eppendorf Cup überführt. Jedes der so entstandenen Eppendorf Cups wurde nun dreimal für 15s gevortext und anschließend bei 4°C und 13.000Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde



in je ein frisches 1,5mL Eppendorf Cup überführt und als fertiges Proteinlysate bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwahrt.

**Schritt 3:** Proteinbestimmung mit „Pierce BCA Protein Assay Kit“:

Die Proteinlysate wurden aufgetaut und mit HEPES Buffer im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Anschließend wurde protokollgemäß eine Standardreihe angesetzt:

Standardreihe:

- Standard A: 300 $\mu\text{L}$  Stocklösung à 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard B: 125 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung + 375 $\mu\text{L}$  Stocklösung à 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard C: 325 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung + 325 $\mu\text{L}$  Stocklösung à 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard D: 175 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung + 175 $\mu\text{L}$  von Standard B à 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard E: 325 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung + 325 $\mu\text{L}$  von Standard C à 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard F: 325 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung + 325 $\mu\text{L}$  von Standard E à 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard G: 325 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung + 325 $\mu\text{L}$  von Standard F à 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard H: 400 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung + 100 $\mu\text{L}$  von Standard G à 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Standard I: 400 $\mu\text{L}$  Verdünnungslösung --> Blank

Nach dem erstellten Pipettierschema wurden in jedes well 25 $\mu\text{L}$  der jeweiligen Probe bzw. der Standards vorgelegt. Aus Reagent A (BCA) und Reagent B (Kupferlösung) des Kits wurden nun 200 $\mu\text{L}$ /well Working Reagent (WR) angesetzt. Das Verhältnis von Reagent A zu Reagent B war hierbei 50:1.

Bsp.-Rechnung: Volumen des WR für 20 benötigte wells:

$$V_{\text{WR}} = 20\text{wells} * 200\mu\text{L WR} = 4000\mu\text{L} = 4\text{mL WR}$$

$$V_{\text{Reagent B}} = V_{\text{WR}}/50 = 4000\mu\text{L}/50 = 80\mu\text{L Reagent B}$$

$$V_{\text{Reagent A}} = V_{\text{WR}} - V_{\text{Reagent B}} = 4000\mu\text{L} - 80\mu\text{L} = 3920\mu\text{L Reagent A}$$

Es wurden je 200 $\mu\text{L}$  des WR zu den vorgelegten Proben und Standards zugegeben und dann die Platte bei  $37^{\circ}\text{C}$  zugedeckt für 30 min inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Absorption bei 562nm gemessen.

## 2.2.8 Prinzip des Western Blot

Western Blot ist ein in der Forschung häufig eingesetztes Verfahren zur Trennung und Identifizierung von Proteinen. Zunächst wird ein Proteingemisch mittels Gelelektrophorese anhand des Molekulargewichts aufgetrennt. Anschließend werden die voneinander getrennten Proteine auf eine Membran transferiert, wo für jede Proteinfraction eine einzelne Bande entsteht. Diese Membran wird dann mit Antikörpern bestückt, die für die gesuchten Proteine spezifisch sind. Ungebundene Antikörper werden wieder abgewaschen, sodass lediglich proteingebundene Antikörper verbleiben. Sie können anschließend durch Entwicklung des Films sichtbar gemacht werden. Da die Antikörper spezifisch an das gesuchte Protein binden, sollte nur eine Bande sichtbar sein. Die Breite der Bande entspricht der Menge an Protein, welche anhand eines Vergleichs mit einem Standard festgestellt werden kann (Mahmood und Yang 2012).

### 2.2.8.1 Durchführung des Western Blot

#### **Schritt 1:** SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE):

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine zunächst mit dem anionischen Natriumdodecylsulfat (SDS) inkubiert, welches die Proteine durch Reduktion von Disulfidbrücken denaturiert. Weiterhin werden ihre Ladungen durch die negative Ladung von SDS maskiert. Somit können die Proteine anschließend entsprechend ihrer Molmasse aufgetrennt werden. Die entstehenden Banden werden mit einem Protein-Standard Gemisch, d.h. mit Proteinen bekannter molekularer Masse verglichen, wodurch die Molmasse der untersuchten Proteine festgestellt werden kann. Bei dieser Form der Elektrophorese durchlaufen die Proben zunächst ein Sammel- und dann ein Trenngel, wobei das Sammelgel einen saureren pH-Wert, größere Poren und eine geringere Leitfähigkeit hat. Im Sammelgel werden die SDS-Proteinkomplexe zunächst konzentriert und später im Trenngel aufgetrennt.

Für die Elektrophorese wurden zunächst die bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Proteinlysate langsam auf Eis aufgetaut. Hiernach wurde jeweils

- das Probenvolumen entsprechend  $20\mu\text{g}$  Protein
  - $5\mu\text{L}$  NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)
  - $2\mu\text{L}$  NuPAGE Reducing Agent
  - destilliertes  $\text{H}_2\text{O}$
- =  $20\mu\text{L}$  Gesamtvolumen

in ein Eppendorf Cup pipettiert. Die Proben wurden nun zunächst kurz zentrifugiert, dann für 10min bei 70°C erhitzt und im Anschluss umgehend auf Eis gestellt. Um 1X SDS Running Buffer herzustellen wurden in einem 1L Messzylinder zu 50mL MOPS SDS Running Buffer 950mL destilliertes H<sub>2</sub>O gegeben. 200mL davon wurden mit 500µL NuPAGE Antioxidant versetzt und in die innere Kammer der Elektrophoreseapparatur gegeben. 600mL des restlichen Running Buffers wurden in die äußere Kammer gefüllt. Als Gel wurde ein bei 4°C gelagertes NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Polyacrylamid) der Firma Invitrogen, Thermo Fisher Scientific verwendet. Die Flüssigkeit wurde abgegossen, der Kamm vorsichtig entnommen und die Kammern anschließend mithilfe einer Pipette 3x mit 1X SDS Running Buffer gespült. Das Gel wurde dann in die Kammern eingespannt und fixiert. Die Gelkammern wurden nun mittels Loading Tips mit den vorbereiteten Proben beladen. Die beiden äußeren Kammern wurden dabei mit Proteinmarkern versehen. Es wurde für 1h eine Spannung von 200V angelegt.

**Schritt 2:** Semi-dry-blotting:

Während der Elektrophorese wurden vier Block Filterpapier (Nitrocellulose) und eine Western Blot-Membran für fünf Minuten im frisch angesetzten Transferpuffer aus:

- 5mL NuPAGE Transfer Buffer (20X)
- 100µL NuPAGE Antioxidant
- 10mL Methanol
- 84,9mL destilliertes H<sub>2</sub>O
- = 100mL Gesamtvolumen

ingelegt/äquilibriert. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Kammer entfernt und der Semi-dry-Blot aufgebaut. Zwei Lagen des Filterpapiers wurden nun auf das Blottinggerät gelegt und die zugeschnittene Nitrocellulose-Membran auf dem Filterpapier positioniert. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und nach oben hin mit den anderen beiden Lagen Filterpapier abgedeckt. Während des gesamten Aufbaus wurde darauf geachtet, dass keine Blasen zwischen den einzelnen Schichten bestehen blieben. Wenn nötig, wurden diese mithilfe eines Glasstabes aus dem Aufbau entfernt. Der Deckel wurde geschlossen und für den Blottingprozess eine Spannung von 30V für 30min angelegt. Zur Überprüfung des Blottings wurde danach die Membran mit

Ponceau S eingefärbt, das Gel wurde verworfen. Nach Abwaschen der gefärbten Membran mit destilliertem H<sub>2</sub>O wurden nach erfolgreichem Blotting die übertragenen Proteinbanden sichtbar. Die Membran wurde dann bis zur kompletten Entfärbung in TBST (engl. Tris-buffered saline with Tween 20) geschwenkt.

**Schritt 3:** Blocking:

Nach erfolgreichem Blottingprozess wurde nun die Membran für 1h in frisch angesetzter Blockinglösung aus 50mL TBS + 750µL Western Blocking Reagenz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) blockiert und somit unspezifische Bindungsstellen auf der Membran abgesättigt.

**Schritt 4:** primärer Antikörper:

Während der Blottingprozedur wurde der primäre AK: anti NIS 1:500, mouse monoclonal (AB-1 bzw. clone FP5A) Konz: 0,2mg/dl in 10mL TBST + 75µL Western Blocking Reagenz verdünnt. Die Inkubation der Membran mit dem primären Ak erfolgte über Nacht auf einem Rollenmischer bei 4°C.

**Schritt 5:** sekundärer Antikörper:

Nach der Inkubation mit dem primären AK wurde die Membran 3x für je 5min in TBST gewaschen und anschließend mit dem sekundären AK: Polyklonale Ziegen Anti-Mouse Immunglobulins/HRP 1:2000 für 1h bei Raumtemperatur auf einem Rollenmischer inkubiert.

**Schritt 6:** Detektion:

Zur Detektion wurde eine Super Signal West Pico Lösung im Verhältnis 1:1 vorbereitet und auf die Membran gegeben. Die Substrate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Luminol reagieren unter Anwesenheit von HRP (Meerettich Peroxidase). Bei dieser Reaktion entsteht Licht, welches in einer Dunkelkammer (Fusion, Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) detektiert werden kann. Die Belichtungszeit kann hierbei je nach dem von der Membran kommenden Signal variieren.

Um nachzuweisen, dass in allen Spuren die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, wurde zum Abschluss des Western Blots die Membran mit einem GAPDH-Ak inkubiert, die Detektion wiederholt und somit anhand GAPDH als Referenzprotein die Blottingqualität überprüft.

### 2.2.9 In-vitro Radiojoduptake

Für die Analyse des Radiojod Uptake wurden je  $4 \times 10^5$  Zellen/well jeder ZL in 6-well Platten ausgesät. Direkt nach der Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA, wurde 1Mbq I<sup>131</sup> zugegeben und die Platten für 24h und 48h in komplettem Zellkulturmedium (vgl.: 2.2.1 Zellkultur) mit 0,4x10<sup>3</sup>mmol/L Magnesiumsulfat (0.5% natürliches Magnesium) inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für fünf Minuten trypsinisiert. Die Suspension wurde mit 3mL PBS gespült, gesammelt und bei 900Upm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5mL PBS resuspendiert. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen zur Messung des aufgenommenen radioaktiven I<sup>131</sup> letztlich in einen Gamma counter gegeben. Die unbehandelten Zellen dienten als Kontrolle der Messung.

### 2.2.10 Statistische Analyse

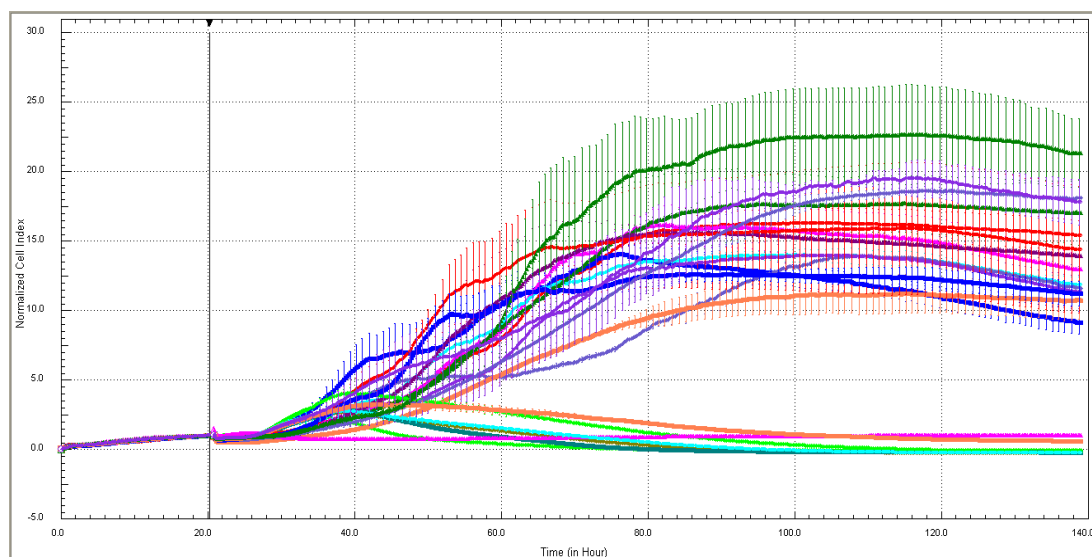
Die PCR Daten wurden mittels Bio-Rad CFX Manager gesammelt und anschließend mittels Relative Expression Software Tool (REST) 2009, Version 2.0.13 ausgewertet. Mithilfe von Excel (Microsoft Office, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) wurden die Ergebnisse der Versuche gesammelt und graphisch dargestellt. Die Signifikanz wurde anhand des T-Test für gepaarte Stichproben errechnet, wobei ein *p*-Wert < 0,05 als signifikant angesehen wurde.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Einflüsse auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzellen durch HDACi

Wie im Abschnitt 2.4 beschrieben wurde der Effekt der Behandlung mit den HDACi Panobinostat, SAHA und TSA auf die Zellproliferation von Schilddrüsenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Entitäten und Mutationsstatus untersucht. Ziel des Versuches war die Bestimmung der niedrigsten inhibitorischen Konzentrationen. Dazu wurden zwei Zelllinien (ZL) papillären Ursprungs TPC1 und BCPAP, eine schlecht differenzierte Zelllinie, 8505C, eine anaplastische Zelllinie, C643 und eine ZL follikulären Ursprungs, FTC133, untersucht. Sie wurden hierzu mit Panobinostat, SAHA und TSA in jeweils fünf Konzentrationen, 1nM, 10nM, 100nM, 1µM und 10µM, jeweils in Dreifachbestimmung behandelt und der Effekt im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollreihe gemessen.

Die Wachstumskurven wurden über einen Zeitraum von mindestens 100 Stunden aufgezeichnet (s. Abb. 10). Zwecks besserer Übersicht wurde aus diesen Daten lediglich ein Messwert alle sechs Stunden genutzt, wie in den Abbildungen 11-13 dargestellt ist.



**Abbildung 10:** Beispielhafte Darstellung von Rohdaten der ZL TPC1, Echtzeit Zellwachstumsanalyse (Real Time Cell Viability Analysis) mittels xCELLigence, TPC1 Zellen behandelt mit Panobinostat, SAHA, TSA jeweils 1nM-10µM, jeweils in dreifacher Ausfertigung, Y-Achse: Normalisierter Zellindex; X-Achse: Zeit in Stunden, Vertikale Balken: Standardabweichung.

### **3.1.1 Einfluss von Panobinostat auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien**

Bei der Behandlung der papillären ZL TPC1 mit Panobinostat in fünf Konzentrationen von 10µM-1nM, zeigte sich eine signifikante Wachstumshemmung der Zellen unter den Konzentrationen 10µM, 1µM, 100nM und 10nM. 1nM Panobinostat zeigte keine ausreichende Hemmung des Zellwachstums.

Auch Zellen der zweiten ZL BCPAP (PTC) wurden mit Panobinostat 10µM, 1µM, 100nM, 10nM und 1nM behandelt. Das Zellwachstum wurde gleichermaßen inhibiert durch die Konzentrationen 10µM, 1µM, 100nM, 10nM. Lediglich Panobinostat 1nM zeigte keinen ausreichenden Effekt auf die BCPAP Zellen. 10nM Panobinostat war die niedrigste Konzentration, die zu einer Wachstumshemmung von BCPAP Zellen führte. Analog zu den Ergebnissen der ZL TPC1 und BCPAP, wurde auch das Wachstum der schlecht differenzierten ZL 8505C durch Panobinostat effektiv gehemmt bis zu einer Konzentration von 10nM, womit auch in diesem Fall Panobinostat 10nM die niedrigste wirksame Konzentration war.

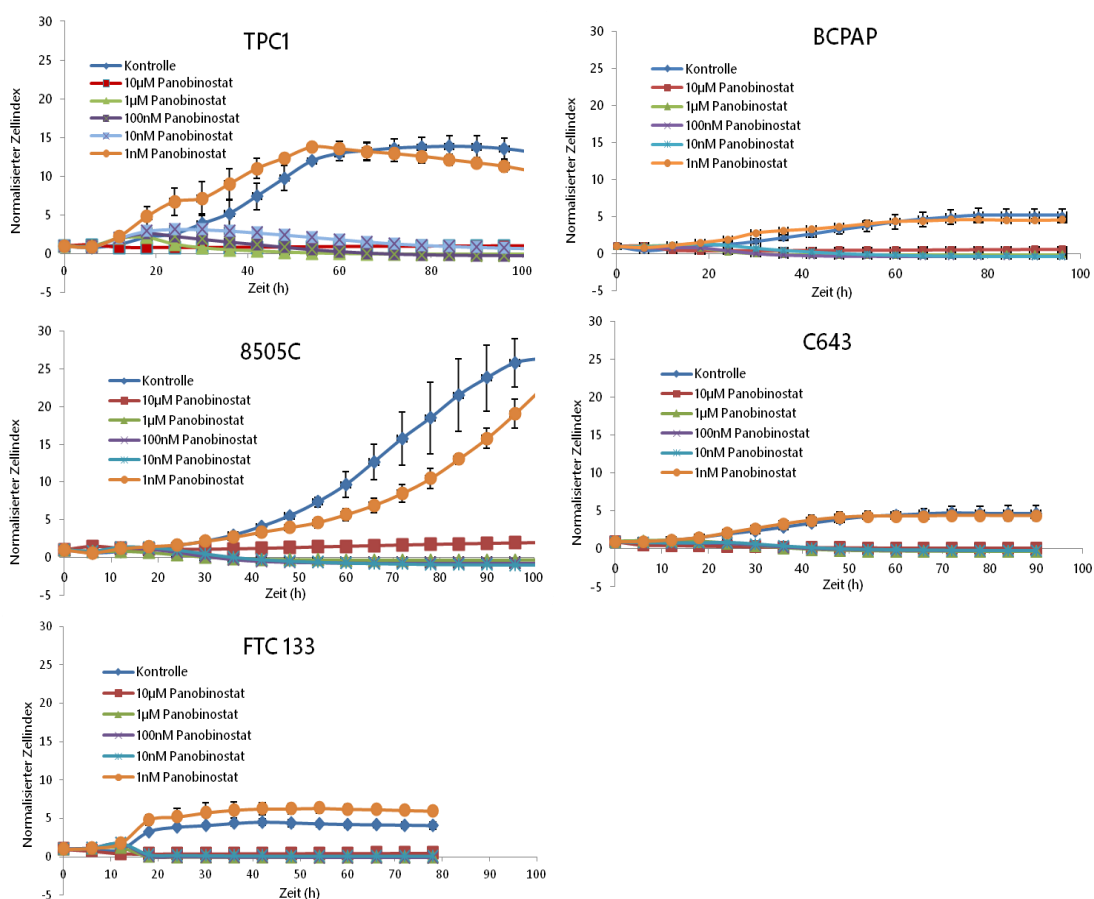
Panobinostat hatte auch in der ZL anaplastischen Ursprungs C643 einen wachstumshemmenden Effekt in den Konzentrationen 10µM, 1µM, 100nM, 10nM. 1nM Panobinostat zeigte keinen messbaren Effekt.

Die Zellen der FTC Zelllinie FTC133 wurden durch Panobinostat 10µM, 1µM, 100nM und 10nM in ihrem Wachstum gehemmt. Panobinostat 1nM war hingegen nicht ausreichend wirksam.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass in allen getesteten Zelllinien unabhängig vom Tumortyp oder vorliegenden Mutationen der Zellen, Panobinostat bereits in einer niedrigen Konzentration von 10nM eine effektive inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Zellen hatte. 1nM Panobinostat war in keiner ZL wirksam. Die untenstehende Tabelle 4 und die Abbildung 11 veranschaulichen diese Ergebnisse.

**Tabelle 4: Effekt von Panobinostat auf das Zellwachstum anhand der Impedanzmessung. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien. Die Wirkung von Panobinostat ist unabhängig vom Tumortyp. ↓= Abfall des Zellindex; - = Zellindex nicht beeinflusst.**

Zelllinie	Tumortyp	Zellindex				
		Pano 10 $\mu$ M	Pano 1 $\mu$ M	Pano 100nM	Pano 10nM	Pano 1nM
TPC1	PTC	↓	↓	↓	↓	-
BCPAP	PTC	↓	↓	↓	↓	-
8505C	PDTC	↓	↓	↓	↓	-
C643	ATC	↓	↓	↓	↓	-
FTC133	FTC	↓	↓	↓	↓	-



**Abbildung 11: Echtzeit Zellwachstumsanalyse (Real Time Cell Viability Analysis) von mit Panobinostat behandelten Schilddrüsenkarzinomzellen. Die Zellen der ZL TPC1, BCPAP, 8505C, C643, FTC133 wurden auf Gold-beschichteten 96-well Platten ausgesät. Nach etwa 24h wurden sie mit Panobinostat von 10 $\mu$ M-1nM behandelt und der Zellindex normalisiert. Das Zellwachstum wurde über mindestens 80h konstant aufgezeichnet. Gezeigt werden der Mittelwert +/- Standardabweichung der Analyse in dreifacher Ausführung pro ZL.**



### 3.1.2 Einfluss von SAHA auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien

Die Zelllinien TPC1 (PTC), BCPAP (PTC), 8505C (PDTC), C643 (ATC), und FTC133 (FTC) wurden mit SAHA jeweils in fünf Konzentrationen 10 $\mu$ M; 1 $\mu$ M; 100nM; 10nM; 1nM behandelt.

SAHA führte bei TPC1 Zellen lediglich in der Konzentration 10 $\mu$ M zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums. Die niedrigeren Konzentrationen 1 $\mu$ M, 100nM, 10nM und 1nM führten nicht zu einem entsprechenden Abfall der Wachstumskurve.

Auch bei BCPAP Zellen inhibierte SAHA 10 $\mu$ M das Zellwachstum, die anderen Konzentrationen zeigten keine ausreichende Wirksamkeit. SAHA 1nM zeigte bei BCPAP Zellen keine auswertbaren Ergebnisse.

Bei der Behandlung der ZL 8505C mit SAHA zeigte sich eine zellwachstumshemmende Wirkung bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M SAHA. Niedrigere Konzentrationen, 1nM-1 $\mu$ M, waren hingegen nicht ausreichend wirksam um das 8505C Zellwachstum zu stoppen. Somit war 10 $\mu$ M in unserer Versuchsreihe die einzige Konzentration von SAHA, die 8505C Zellwachstum stoppen konnte.

Auch C643 Zellen wurden in ihrem Wachstum durch SAHA in der höchsten verwendeten Konzentration, 10 $\mu$ M, gehemmt, 1nM-1 $\mu$ M zeigten keine messbare Wirkung bezüglich des Überlebens der C643 Zellen.

Wie bei den vorigen ZL auch, konnte durch SAHA eine Hemmung des Wachstums von FTC133 Zellen durch SAHA 10 $\mu$ M erzielt werden. Die niedrigeren Konzentrationen 1 $\mu$ M, 100nM, 10nM und 1nM waren nicht effektiv.

Es zeigte sich, dass SAHA über verschiedene Entitäten von TC übergreifend das Zellwachstum effektiv inhibierte, allerdings erst in einer verhältnismäßig hohen Konzentration von 10 $\mu$ M. Spezifische pathophysiologische Eigenschaften der Zellen schienen hierbei keinen Einfluss auf die Wirkung von SAHA zu haben. Dies zeigen die folgende Tabelle 5 und Abbildung 12.

Tabelle 5: Effekt von SAHA auf das Zellwachstum anhand der Impedanzmessung. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien. Die Wirkung von SAHA ist unabhängig vom Tumortyp. ↓ = Abfall des Zellindex; - = Zellindex nicht beeinflusst; n.a. = nicht auswertbare Daten

Zelllinie	Tumortyp	Zellindex				
		SAHA 10µM	SAHA 1µM	SAHA 100nM	SAHA 10nM	SAHA 1nM
TPC1	PTC	↓	-	-	-	-
BCPAP	PTC	↓	-	-	-	n.a.
8505C	PDTC	↓	-	-	-	-
C643	ATC	↓	-	-	-	-
FTC133	FTC	↓	-	-	-	-

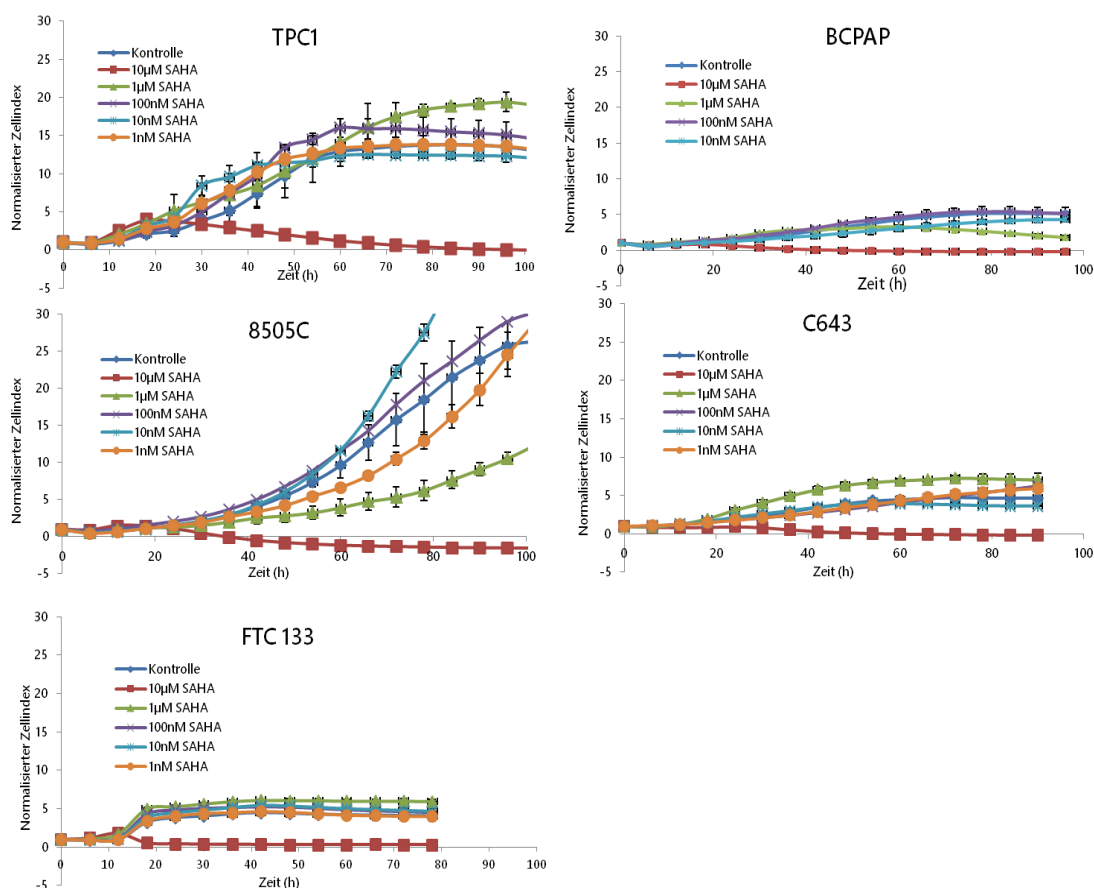


Abbildung 12: Echtzeit Zellwachstumsanalyse (Real Time Cell Viability Analysis) von mit SAHA behandelten Schilddrüsenkarzinomzellen. Die Zellen der ZL TPC1, BCPAP, 8505C, C643, FTC133 wurden auf Gold-beschichteten 96-well Platten ausgesät. Nach etwa 24h wurden sie mit SAHA von 10µM -1nM behandelt und der Zellindex normalisiert. Das Zellwachstum wurde über mindestens 80h konstant aufgezeichnet. Gezeigt werden der Mittelwert +/- Standardabweichung der Analyse in dreifacher Ausführung pro ZL.

### 3.1.3 Einfluss von TSA auf das Zellwachstum von Schilddrüsenkarzinomzelllinien

TPC1 Zellen wurden mit TSA in den fünf Konzentrationen von TSA 1nM-TSA 10 $\mu$ M behandelt. TSA führte in den Konzentrationen 10 $\mu$ M und 1 $\mu$ M zu einer Hemmung des TPC1 Zellwachstums. Keine ausreichende Wirksamkeit zeigten die Konzentrationen 100nM, 10nM und 1nM.

Bei der Behandlung der BCPAP Zellen zeigte sich eine Hemmung des Zellwachstums gleichermaßen unter TSA 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M und 100nM, wohingegen 10nM und 1nM TSA unwirksam waren. Die niedrigste noch wirksame Konzentration zur Hemmung des Zellwachstums von BCPAP war TSA 100nM.

Die Zellen der PDTC ZL 8505C wurden durch TSA 10 $\mu$ M, 1 $\mu$ M und 100nM gleichermaßen im Wachstum gehemmt. Unwirksam waren bei dieser ZL hingegen TSA 10nM und 1nM, womit die niedrigste wirksame TSA Konzentration 100nM war.

TSA hemmte das Wachstum der Zellen der ZL C643 in den Konzentrationen 10 $\mu$ M und 1 $\mu$ M. TSA 100nM, 10nM sowie 1nM führten nicht zu einem Abfall der Wachstumskurve. Die niedrigste auf C643 Zellen inhibitorisch wirksame Konzentration war somit 1 $\mu$ M.

Der wachstumsinhibierende Effekt von TSA in FTC133 Zellen war bei TSA in den Konzentrationen 10 $\mu$ M und 1 $\mu$ M zu beobachten, wohingegen TSA 100nM, 10nM und 1nM das Wachstum dieser Zellen nicht stoppen konnten.

Wie schon für Panobinostat und SAHA oben gezeigt, war auch TSA in der Lage, zelllinienübergreifend und somit unabhängig von unterschiedlichen zellulären Eigenschaften Zellwachstum in Schilddrüsenkarzinomen in vitro zu hemmen. Schematisch zeigen dies Tabelle 6 und die Abbildung 13.

**Tabelle 6: Effekt von TSA auf das Zellwachstum anhand der Impedanzmessung. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien. Die Wirkung von TSA ist unabhängig vom Tumortyp.**  
 ↓ = Abfall des Zellindex; - = Zellindex nicht beeinflusst.

Zelllinie	Tumortyp	Zellindex				
		TSA 10 $\mu$ M	TSA 1 $\mu$ M	TSA 100nM	TSA 10nM	TSA 1nM
TPC1	PTC	↓	↓	-	-	-
BCPAP	PTC	↓	↓	↓	-	-
8505C	PDTC	↓	↓	↓	-	-
C643	ATC	↓	↓	-	-	-
FTC133	FTC	↓	↓	-	-	-

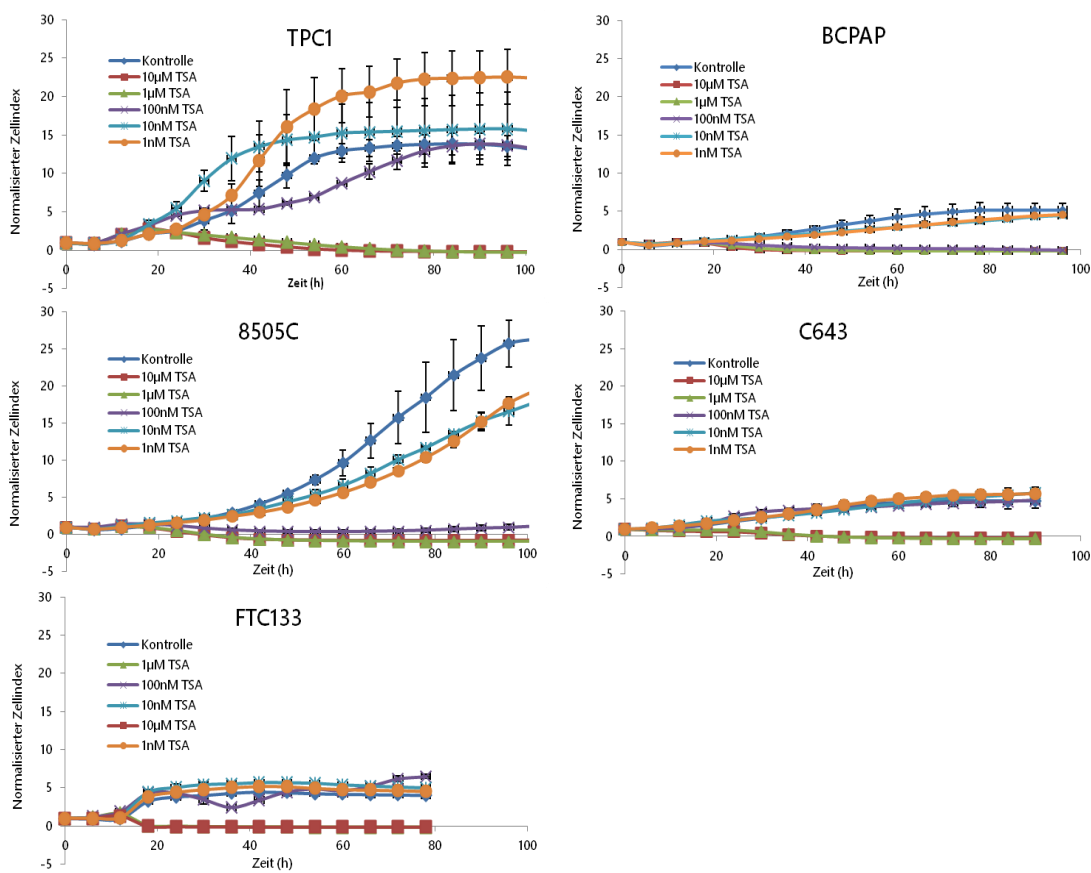


Abbildung 13: Echtzeit Zellwachstumsanalyse (Real Time Cell Viability Analysis) von mit TSA behandelten Schilddrüsenkarzinomzellen. Die Zellen der ZL TPC1, BCPAP, 8505C, C643, FTC133 wurden auf Gold-beschichteten 96-well Platten ausgesät. Nach etwa 24h wurden sie mit TSA von 10µM -1nM behandelt und der Zellindex normalisiert. Das Zellwachstum wurde über mindestens 80h konstant aufgezeichnet. Gezeigt werden der Mittelwert +/- Standardabweichung der Analyse in dreifacher Ausführung pro ZL.

### 3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der xCELLigence Versuchsreihe

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bei den drei verwendeten Substanzen Panobinostat, SAHA und Trichostatin A jeweils in Abhängigkeit von der Konzentration ein starker Abfall der Wachstumskurven darstellte. Dies geschah unabhängig vom Tumortyp, Herkunft und der jeweiligen Mutationen der Zellen. Die effektivste der getesteten Substanzen war Panobinostat. Die niedrigste, bei allen Zelllinien gleiche, inhibitorisch wirksame Konzentration von Panobinostat betrug 10nM, bei SAHA 10µM und bei TSA 1µM. Diese Konzentrationen wurden als niedrigste, bestwirksame Konzentrationen ermittelt und für die Behandlung der Zellen bei den folgenden Versuchen festgelegt. Als einzige Ausnahmen sind die ZL BCPAP (PTC) und 8505C (PDTTC) zu nennen, bei welchen TSA bereits in einer Konzentration von 100nM zu einer

Hemmung des Zellwachstums führte. Der besseren Vergleichbarkeit halber wurden in den folgenden Versuchen alle ZL mit  $1\mu\text{M}$  TSA behandelt.

### 3.2 Ergebnisse der qRT-PCR

Mittels qRT-PCR wurde bei allen fünf ZL, TPC1 und BCPAP (beide PTC), 8505C (PDTC), C643 (ATC), FTC133 (FTC), die Genexpression der Gene SLC5A5 (Natrium-Iodid-Symporter), TTF1 (Thyroid Transcription Factor), HMGA2 und lncRNA H19 quantifiziert. Als Haushaltsgen diente GAPDH. Weiterhin wurden unter Verwendung eines entsprechenden miRNA PCR Kits auch die miRNA Let7f und miRNA Let7b gegen das Haushaltsgen RNU6\_2 quantifiziert. Alle Zelllinien wurden hierfür mit denen im xCELLigence ermittelten Konzentrationen von 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 24h sowie über 48h behandelt. Die Behandlung über 24h führte nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen, weshalb im Folgenden nur die Ergebnisse nach 48h Behandlung aufgeführt sind.

#### 3.2.1 Expression von NIS (SLC5A5)

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien zeigten in unbehandelter Form kaum messbare Expressionslevel des SLC5A5 Gens. Die 48h Behandlung mit dem Pan-deacetylase Inhibitor Panobinostat (10nM) induzierte in allen ZL eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Überexpression von NIS. Der gleiche Effekt war unter dem Einfluss der HDACi SAHA (10µM) zu beobachten, welche ebenfalls zelllinienübergreifend eine signifikante Überexpression von NIS hervorriefen. Auch 1µM TSA führte in allen ZL zu diesem Ergebnis. Die NIS Überexpression erfolgte unabhängig vom jeweiligen Mutationsstatus, von der Herkunft und dem Tumortyp der unterschiedlichen ZL. Die folgende Tabelle 7 und Abbildung 14 veranschaulichen diese Ergebnisse.

Tabelle 7: Expression des NIS-Gens. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien sowie der Expression des NIS nach 48h Behandlung mit HDACi in den angegebenen Konzentrationen. Die Expression von NIS ist unabhängig vom Tumortyp.

↑ = Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ )

Zelllinie	Tumortyp	NIS Expression		
		10nM Pano	10µM SAHA	1µM TSA
TPC1	PTC	↑	↑	↑
BCPAP	PTC	↑	↑	↑
8505C	PDTC	↑	↑	↑
C643	ATC	↑	↑	↑
FTC133	FTC	↑	↑	↑

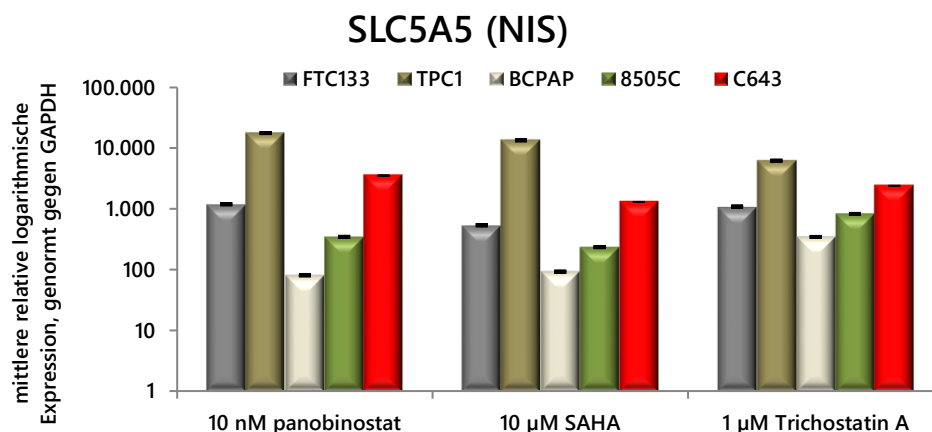


Abbildung 14: RT-qPCR von SLC5A5 (NIS) in den Zelllinien TPC1, BCPAP, 8505C, C643 und FTC133 nach jeweiliger Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### 3.2.2 Expression von HMGA2

Die Expression von HMGA2 in den unterschiedlichen Zelllinien wurde nach 48 Stunden Behandlung mit HDACi untersucht. Hierbei zeigte sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Herunterregulierung von HMGA2 sowohl unter Panobinostat 10nM, als auch unter SAHA 10µM bzw. TSA 1µM in allen Zelllinien gleichermaßen, und damit unabhängig von den unterschiedlichen Tumortypen und Mutationsmuster in den Zelllinien (*s. auch Tabelle 8*). Die einzige Ausnahme hiervon bildete die ZL TPC1 unter TSA 1µM, wo sich eine um etwa das Fünffache gesteigerte Expression (signifikant;  $p < 0,05$ ) nachweisen ließ (*Abb. 15*).

Tabelle 8: Expression von HMGA2. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien sowie der Expression von HMGA2 nach 48h Behandlung mit HDACi in den angegebenen Konzentrationen. Die Expression von HMGA2 ist unabhängig vom Tumortyp.

↑ = Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); ↓ = Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ )

Zelllinie	Tumortyp	HMGA2 Expression		
		10nM Pano	10µM SAHA	1µM TSA
TPC1	PTC	↓	↓	↑
BCPAP	PTC	↓	↓	↓
8505C	PDTC	↓	↓	↓
C643	ATC	↓	↓	↓
FTC133	FTC	↓	↓	↓

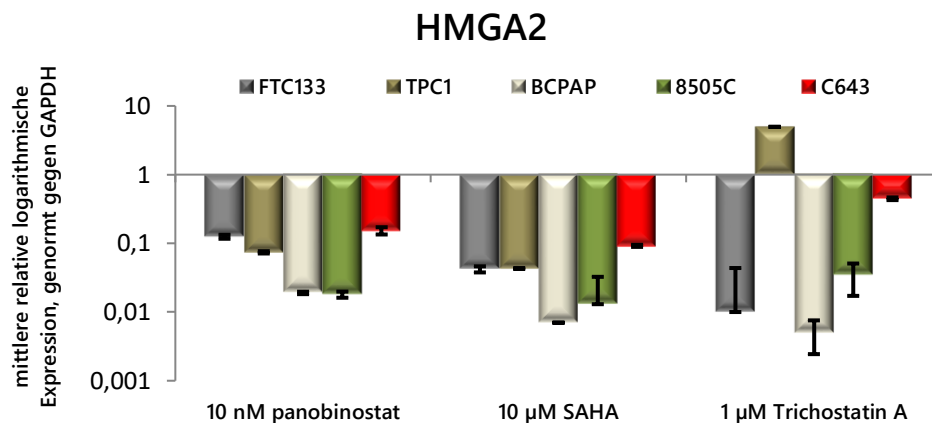


Abbildung 15: RT-qPCR von HMGA2 in den Zelllinien TPC1, BCPAP, 8505C, C643 und FTC133 nach jeweiliger Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### 3.2.3 Expression von TTF1

Die Expression des Transkriptionsfaktors TTF1 wurde unter dem Einfluss von 48h Behandlung mit HDACi getestet. Hier zeigten sich in Bezug auf den Tumortyp variable Ergebnisse.

#### TTF1 in TPC1:

Nach 48h Behandlung mit Panobinostat 10nM zeigte sich eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Überexpression von TTF1 in TPC1 (PTC) Zellen. 10µM SAHA induzierte ebenfalls eine TTF1 Überexpression. Unter 1µM TSA zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung des TTF1 Gens (Abb. 16a).

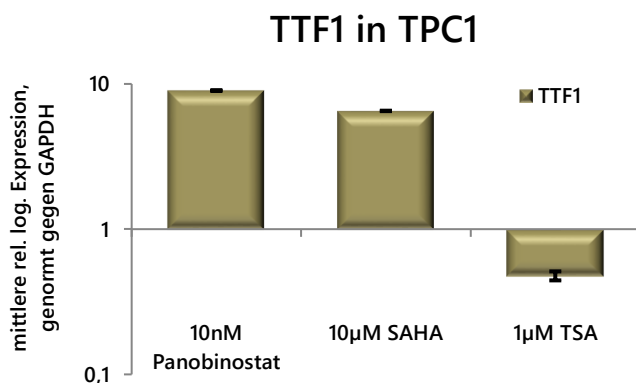


Abbildung 16a: RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie TPC1 (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.



### TTF1 in BCPAP:

In BCPAP (PTC) Zellen wurde das TTF1 Gen durch 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA signifikant ( $p < 0,05$ ) herunterreguliert (*Abb. 16b*).

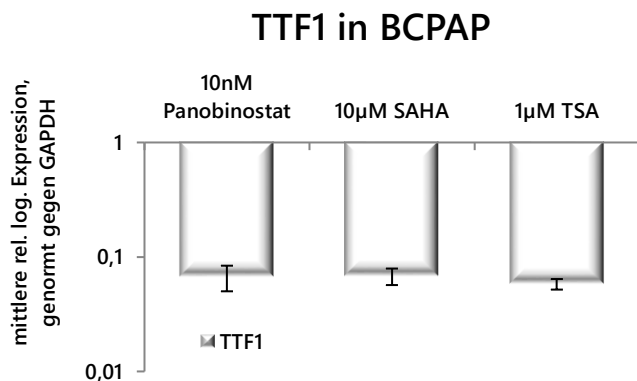


Abbildung 16b: RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie BCPAP (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### TTF1 in 8505C:

Eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Supprimierung von TTF1 zeigte sich auch in Zellen der ZL 8505C (PDTC), sowohl nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M Trichostatin A (*Abb. 16c*).

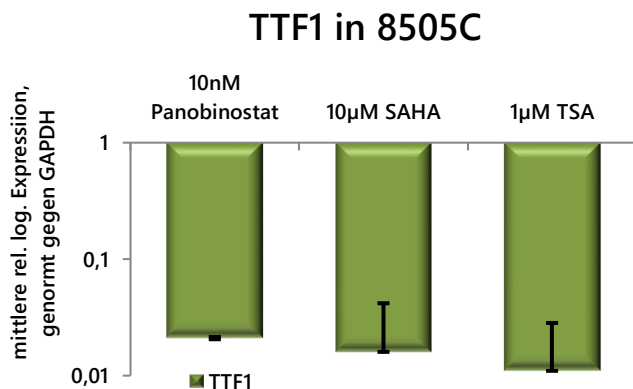


Abbildung 16c: RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie 8505C (PDTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### TTF1 in C643:

10nM Panobinostat führten in C643 (ATC) Zellen zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Überexpression von TTF1. Die TTF1-Expression blieb stabil unter 10 $\mu$ M SAHA, sowie unter 1 $\mu$ M TSA. (Abb. 16d)

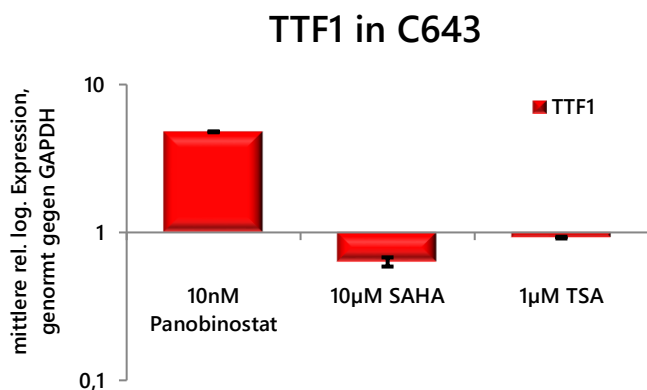


Abbildung 16d: RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie C643 (ATC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### TTF1 in FTC133:

Auch in der ZL FTC133 (FTC) wurde die TTF1 Expression unter Einfluss von HDACi gemessen. Wie die Abb. 16e zeigt, war TTF1 unter 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA signifikant ( $p < 0,05$ ) supprimiert.

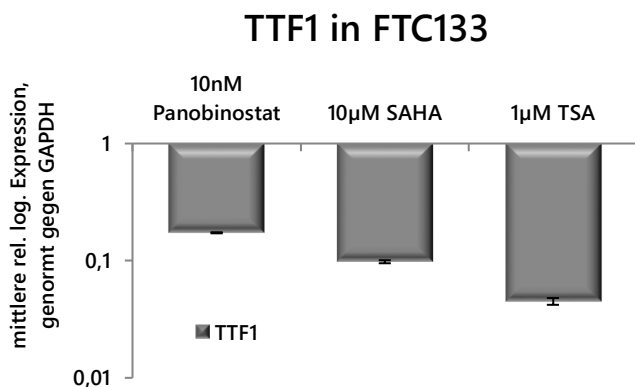


Abbildung 16e: RT-qPCR von TTF1 in der Zelllinie FTC133 (FTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

Zusammengefasst zeigte sich in den ZL BCPAP, 8505C und FTC133 eine signifikante TTF1 Suppression unter allen verwendeten HDACi, trotz der unterschiedlichen Tumorentitäten. In den ZL TPC1 und C643 zeigte sich hingegen ein buntes Expressionsmuster von TTF1, teils über-, teils unterexprimiert in TPC1, überexprimiert oder stabil in C643. Dies veranschaulicht die Tabelle 9.

Tabelle 9: Expression von TTF1. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien sowie der TTF1 Expression nach 48h Behandlung mit HDACi in den angegebenen Konzentrationen.

↑ = Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); ↓ = Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ); – = Expression stabil

Zelllinie	Tumortyp	TTF1 Expression		
		10nM Pano	10 $\mu$ M SAHA	1 $\mu$ M TSA
TPC1	PTC	↑	↑	↓
BCPAP	PTC	↓	↓	↓
8505C	PDTC	↓	↓	↓
C643	ATC	↑	–	–
FTC133	FTC	↓	↓	↓

### 3.2.3.1 Expression von TTF1 in Gewebe primärer Schilddrüsenkarzinome

Die Expression von TTF1 wurde in Gewebeproben von zwölf ATC, acht FTC und 16 PTC ermittelt. Nur in sieben der zwölf ATC Proben konnte eine TTF1 Expression nachgewiesen werden. Im Detail zeigte sich, verglichen mit normalem, dem Tumorgewebe angrenzenden Schilddrüsengewebe als Kontrolle, bei vier Proben (02\_02; 4\_09; 3\_06; 2\_08) eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Überexpression von TTF1, in einer Probe war die Expression stabil (03\_03) und zwei Proben zeigten eine signifikant erniedrigte Expression (6\_12; 4\_14) (Abb. 17a).

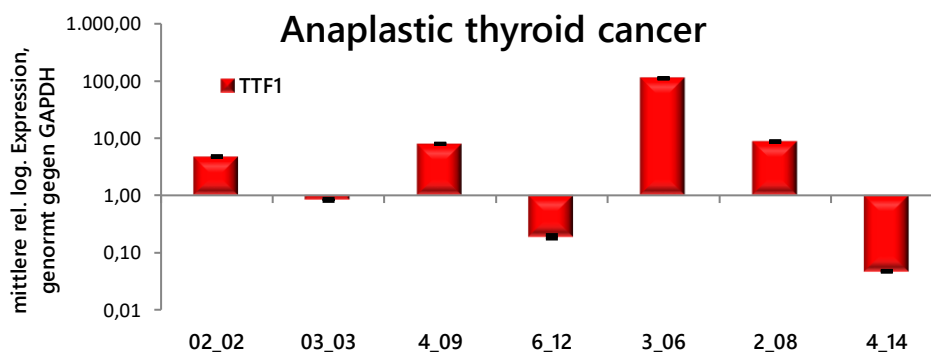


Abbildung 17a: RT-qPCR von TTF1 in ATC Gewebeproben. TTF1 mRNA konnte nur in den sieben dargestellten Proben nachgewiesen werden. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu normalem Tumorgewebe aus der jeweils dem Tumor angrenzenden Region, welches als 1.0 gesetzt wurde. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

In allen acht untersuchten FTC Gewebeproben ließ sich eine im Vergleich zu gesundem Gewebe signifikant erniedrigte ( $p < 0,05$ ) TTF1 Expression nachweisen (Abb. 17b).

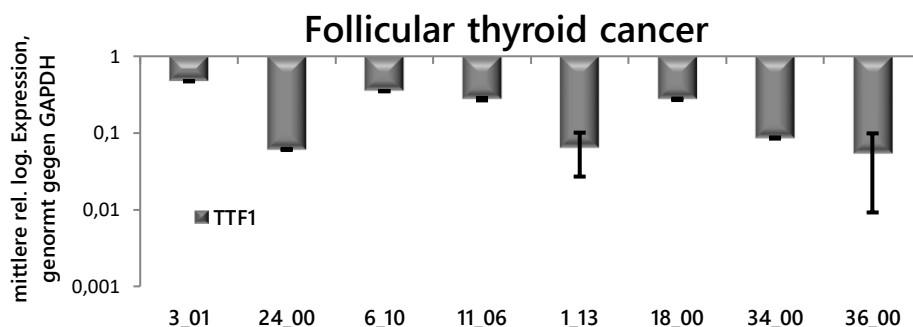


Abbildung 17b: RT-qPCR von TTF1 in FTC Gewebeproben. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu normalem Tumorgewebe aus der jeweils dem Tumor angrenzenden Region, welches als 1.0 gesetzt wurde. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

In keiner der untersuchten PTC Proben war eine messbare Expression von TTF1 ermittelbar (vgl. auch Tabelle 10).

Tabelle 10: Schematische Darstellung der TTF1 Expression in Schilddrüsenkarzinom Gewebeproben unterschiedlicher Entität, gemessen mittels RT-qPCR.

TTF1 $\uparrow$  = TTF1 Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); TTF1 $\downarrow$  = TTF1 Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ); TTF1  $\text{--}$  = TTF1 Expression stabil ( $p > 0,05$ ); TTF1 n.a. = TTF1 nicht nachweisbar

Tumortyp	TTF1 $\uparrow$	TTF1 $\downarrow$	TTF1 $\text{--}$	TTF1 n.a.	gesamt
ATC	4	2	1	5	12
PTC	0	0	0	16	16
FTC	0	8	0	0	8

### 3.2.4 Expression von lncRNA H19

Aufgrund ihrer potentiell genmodulatorischen Eigenschaften mit möglichem Einfluss auf die Entstehung und die Eigenschaften von Schilddrüsenkarzinomen, wurde die Expression der lncRNA H19 untersucht.

#### lncRNA H19 in TPC1:

10nM Panobinostat induzierte eine signifikante H19 Überexpression in der papillären Zelllinie TPC1. 10 $\mu$ M SAHA verursachte in TPC1 Zellen ebenfalls eine H19 Überexpression, genauso wie 1 $\mu$ M TSA (*Abb. 18a*).

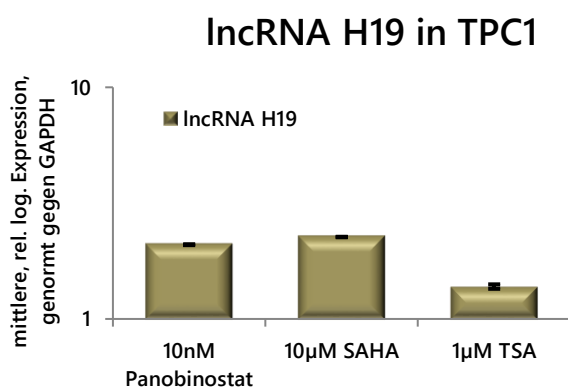


Abbildung 18a: RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie TPC1 (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

#### lncRNA H19 in BCPAP:

Die Expression von H19 wurde sowohl durch 10nM Panobinostat als auch durch 10 $\mu$ M SAHA in BCPAP (PTC) supprimiert, H19 blieb in diesen Zellen unter 1 $\mu$ M TSA jedoch stabil (*Abb. 18b*).

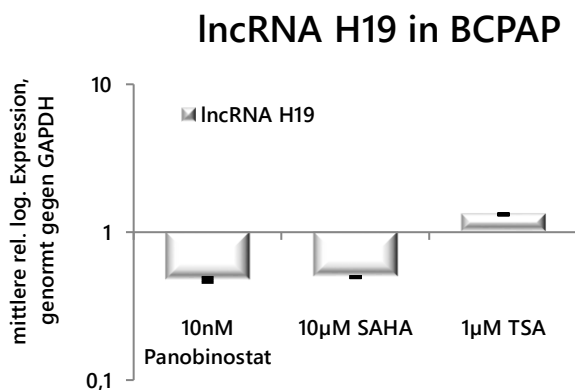


Abbildung 18b: RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie BCPAP (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### lncRNA H19 in 8505C:

In der PDTC Zelllinie 8505C verursachte 10nM Panobinostat keine signifikante Änderung der H19 Expression. 10µM SAHA und 1µM TSA führten hingegen zu einer signifikanten H19 Überexpression in 8505C (Abb. 18c).

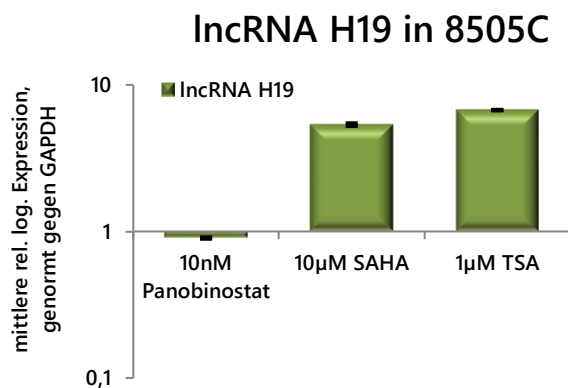


Abbildung 18c: RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie 8505C (PDTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### lncRNA H19 in C643:

Die H19 Expression in C643 Zellen (ATC) wurde durch 10nM Panobinostat signifikant hochreguliert. Auch 10µM SAHA und 1µM TSA führten zu einer H19 Überexpression in C643 Zellen (Abb. 18d).

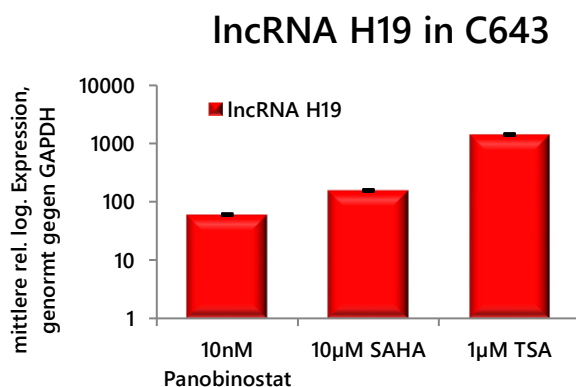


Abbildung 18d: RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie C643 (ATC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### lncRNA H19 in FTC133:

Nach der Behandlung mit den HDACi Panobinostat (10nM), SAHA (10 $\mu$ M) und Trichostatin A (1 $\mu$ M) zeigte sich in Zellen der ZL FTC133 eine signifikante Überexpression des H19 Gens (Abb. 18e).

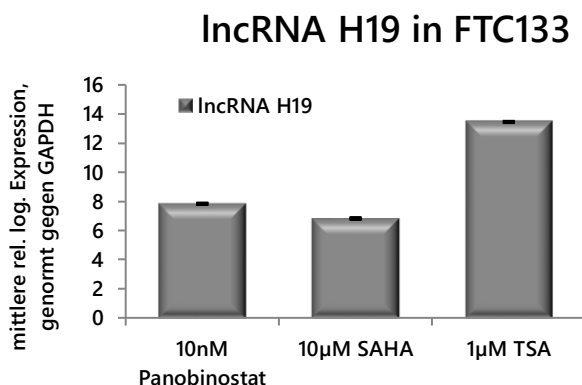


Abbildung 18e: RT-qPCR von lncRNA H19 in der Zelllinie FTC133 (FTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

Die folgende Tabelle 11 gibt einen schematischen Überblick über die Expression von lncRNA H19 in den untersuchten ZL nach der Behandlung mit HDACi. Es lässt sich festhalten, dass eine Supprimierung des H19 Gens lediglich in Zellen der ZL BCPAP unter Panobinostat und SAHA gefunden wurde. Ansonsten zeigte sich die Transkriptionsrate stabil oder signifikant gesteigert in allen ZL.

Tabelle 11: Expression von H19. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien. Expressionmuster von H19 nach 48h Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA in voneinander unabhängigen Versuchen.

↑ = Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); ↓ = Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ); - = Expression stabil

Zelllinie	Tumortyp	H19 Expression		
		10nM Pano	10 $\mu$ M SAHA	1 $\mu$ M TSA
TPC1	PTC	↑	↑	-
BCPAP	PTC	↓	↓	-
8505C	PDTC	-	↑	↑
C643	ATC	↑	↑	↑
FTC133	FTC	↑	↑	↑

### 3.2.4.1 Expression von lncRNA H19 in Gewebe primärer Schilddrüsenkarzinome

Die Expression von H19 wurde auch in Tumorproben von Patienten mit ATC, FTC und PTC untersucht und mit der Expression in tumorangrenzendem, normalem Schilddrüsen-gewebe verglichen. In sechs ATC Geweben lag H19 überexprimiert vor (7\_03; 03\_03; 6\_04; 4\_06; 2\_08; 6\_07), zwei ATC zeigten eine Herunterregulierung (6\_12; 4\_14) und in vier ATC zeigte sich eine stabile Expression (02\_02; 4\_09; 1\_02b; 3\_06) im Vergleich zum Kontrollgewebe (*Abb 19a*).

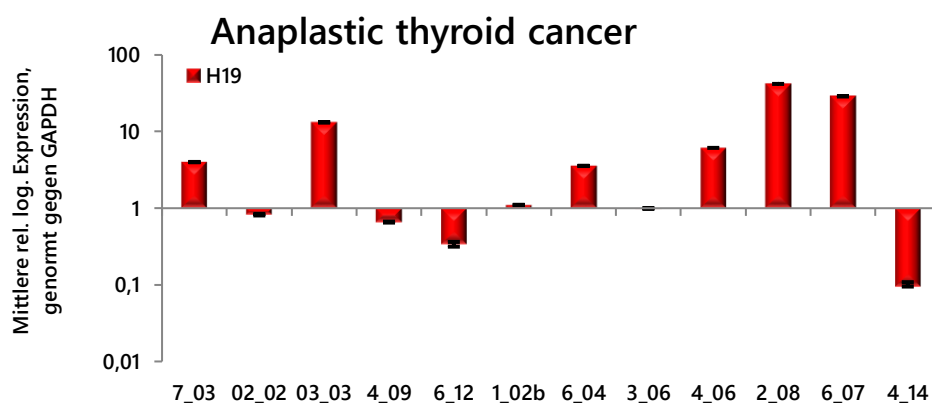


Abbildung 19a: RT-qPCR von lncRNA H19 in ATC Gewebeproben. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu normalem Tumorgewebe aus der jeweils dem Tumor angrenzenden Region, welches als 1.0 gesetzt wurde. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

In elf der 16 PTC Proben war eine H19 Expression nachweisbar, von denen wiederum fünf eine signifikante Überexpression (2\_04; 1\_04; 4\_04; 47\_00; 4\_05), zwei eine signifikante Suppression (1\_03; 74\_00) und vier eine stabile H19 Expression (9\_99; 40\_00; 2\_98; 51\_00) zeigten (*Abb 19b*).

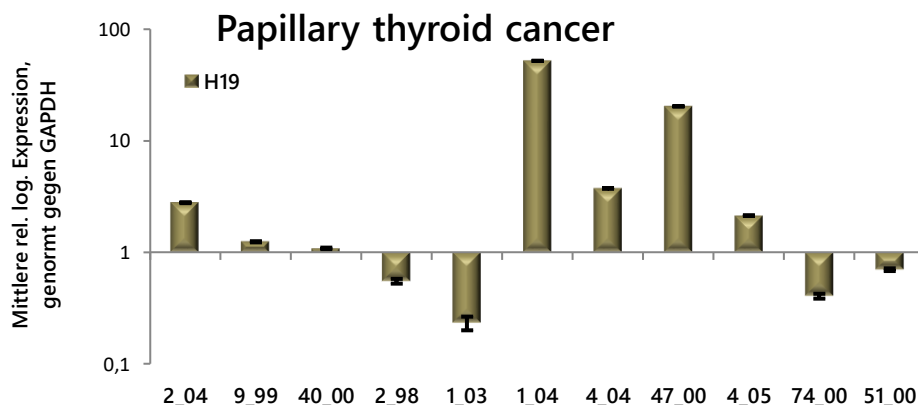


Abbildung 19b: RT-qPCR von lncRNA H19 in PTC Gewebeproben. H19 konnte nur in 11 von 16 Gewebeproben nachgewiesen werden. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu normalem Tumorgewebe aus der jeweils dem Tumor angrenzenden Region, welches als 1.0 gesetzt wurde. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.



In den FTC Gewebeproben lag H19 in fünf Fällen supprimiert vor (3\_01; 6\_10; 11\_06; 18\_00; 34\_00), in den anderen drei Fällen war die Expression stabil (24\_00; 1\_13; 36\_00) (Abb 19c).

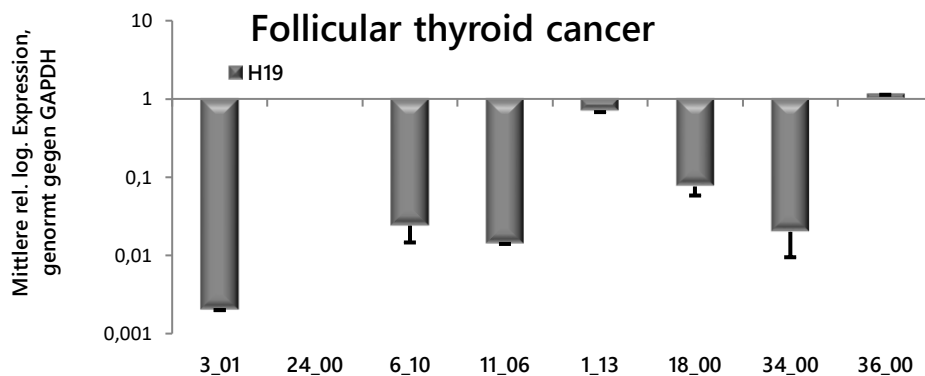


Abbildung 19c: RT-qPCR von lncRNA H19 in FTC Gewebeproben. Die mRNA Expression wurde gegen GAPDH normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu normalem Tumorgewebe aus der jeweils dem Tumor angrenzenden Region, welches als 1.0 gesetzt wurde. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

Im Gesamtbild zeigt sich die H19 Expression in den drei untersuchten Tumortypen uneinheitlich, es kann keine Korrelation zwischen Tumorentität und H19 Expression hergestellt werden. Dies veranschaulicht auch Tabelle 12.

Tabelle 12: Schematische Darstellung der lncRNA H19 Expression in Schilddrüsenkarzinom Gewebeproben unterschiedlicher Entität, gemessen mittels RT-qPCR.

H19 = lncRNA H19; H19 $\uparrow$  = H19 Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); H19 $\downarrow$  = H19 Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ); H19– = H19 Expression stabil; H19 n.a. = H19 nicht nachweisbar

Tumortyp	H19 $\uparrow$	H19 $\downarrow$	H19–	H19 n.a.	gesamt
ATC	6	2	4	0	12
PTC	5	2	4	5	16
FTC	0	5	3	0	8

### 3.2.5 Expression der miRNAs let-7b und let-7f

Aufgrund ihrer möglichen Rolle als Binder und Repressor von SCL5A5 und HMGA2 wurden auch die Expressionsmuster der beiden Mitglieder der Let7 miRNA Familie hsa-let7b-5p (Let7b) und hsa-let7f-5p (Let7f) untersucht. Die im Folgenden detailliert erläuterten stabilen bzw. hochregulierten Expressionsmuster von hsa-let7b-5p und hsa-let7f-5p könnten mit der Suppression von HMGA2 invers korrelieren. Die Expression des SCL5A5 Genprodukts entstand unabhängig von der Expression der hier untersuchten miRNAs.

#### 3.2.5.1 Expression von hsa-let7b-5p

##### hsa-let-7b-5p in TPC1:

Die Abbildung 20a zeigt, dass durch die Behandlung mit 10nM Panobinostat keine signifikante Änderung der Expression von hsa-let-7b-5p (Let7b) in der ZL TPC1 (PTC) verursacht wurde. Unter 10 $\mu$ M SAHA hingegen zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung von Let7b in TPC1. Let7b war stabil unter 1 $\mu$ M TSA.

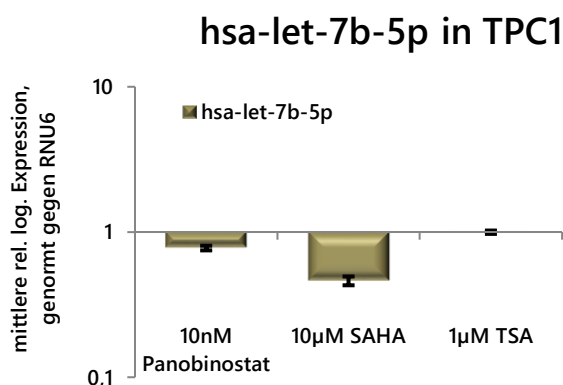


Abbildung 20a: RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie TPC1 (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7b-5p in BCPAP:

In den Zellen der ZL BCPAP (PTC) zeigte sich Let7b stabil in seiner Expression nach der Behandlung mit 10nM Panobinostat. Let7b wurde jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) überexprimiert in BCPAP durch 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA (Abb. 20b).

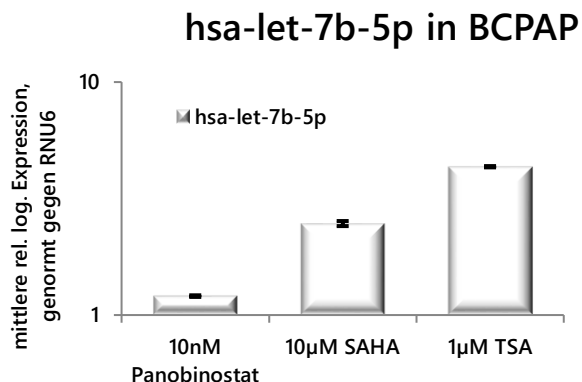


Abbildung 20b: RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie BCPAP (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7b-5p in 8505C:

Let7b zeigte eine stabile Expression nach Behandlung mit 10nM Panobinostat in 8505C Zellen (PDTC). Auch 10 $\mu$ M SAHA führte in 8505C nicht zu einer signifikanten Veränderung der Expression von Let7b. Dagegen wurde Let7b mittels 1 $\mu$ M TSA in 8505C Zellen überexprimiert nachgewiesen (Abb. 20c).

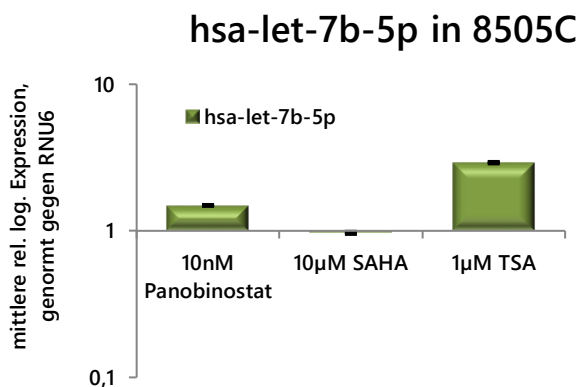


Abbildung 20c: RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie 8505C (PDTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7b-5p in C643:

Die Expression von Let7b war in der ATC ZL C643 unter der Behandlung mit den HDACi Panobinostat (10nM), SAHA (10 $\mu$ M) und TSA (1 $\mu$ M) stets stabil (*Abb. 20d*).

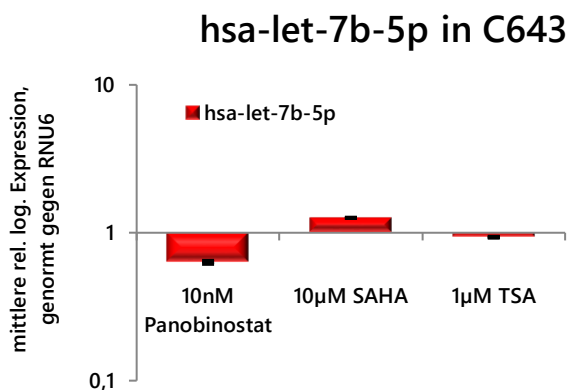


Abbildung 20d: RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie C643 (ATC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7b-5p in FTC133:

Analog zum Let7b Expressionsmuster in der ZL C643 (s.o.), zeigte sich auch in der ZL FTC133 (FTC) eine stabile Expression von Let7b sowohl unter 10nM Panobinostat, als auch unter 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA (*Abb. 20e*).

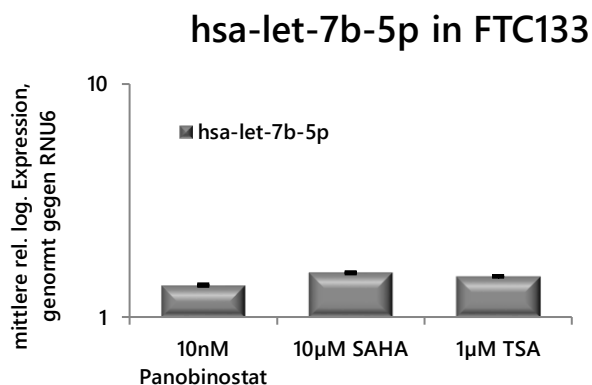


Abbildung 20e: RT-qPCR von hsa-let-7b-5p in der Zelllinie FTC133 (FTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

Die Let7b Expression war also nach der Behandlung mit verschiedenen HDACi zelllinienübergreifend weitgehend stabil. Ausnahmen hiervon bildeten lediglich die Let7b Suppression in TPC1 Zellen durch SAHA 10 $\mu$ M, sowie ihre signifikante Hochregulierung in BCPAP Zellen durch SAHA 10 $\mu$ M und in BCPAP und 8505C durch TSA 1 $\mu$ M (Tabelle 13).

Tabelle 13: Expression von miRNA Let7b. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien. Expressionmuster von hsa-let-7b-5p nach 48h Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA in voneinander unabhängigen Versuchen.

↑ = Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); ↓ = Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ); – = Expression stabil

Zelllinie	Tumortyp	Let7b Expression		
		10nM Pano	10 $\mu$ M SAHA	1 $\mu$ M TSA
TPC1	PTC	–	↓	–
BCPAP	PTC	–	↑	↑
8505C	PDTC	–	–	↑
C643	ATC	–	–	–
FTC133	FTC	–	–	–

### 3.2.5.2 Expression von hsa-let-7f-5p

#### hsa-let-7f-5p in TPC1:

Die miRNA hsa-let-7f-5p (Let7f) wurde in der TPC1 ZL (PTC) durch 10nM Panobinostat signifikant hochreguliert. 10 $\mu$ M SAHA verursachten ebenfalls eine Überexpression von Let7f. Auch 1 $\mu$ M TSA führte in TPC1 Zellen zu einer signifikanten Überexpression (Abb. 21a).

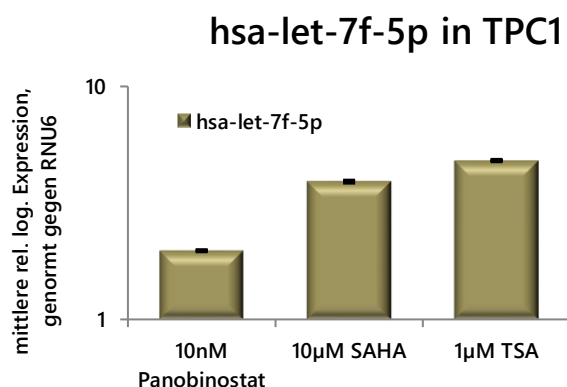


Abbildung 21a: RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie TPC1 (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7f-5p in BCPAP:

In der zweiten untersuchten papillären ZL BCPAP (PTC), zeigte sich ein ähnliches Expressionsmuster von Let7f wie bereits in TPC1. Sowohl 10nM Panobinostat, als auch 10µM SAHA und 1µM TSA induzierten jeweils eine signifikante Let7f Überexpression (Abb. 21b).

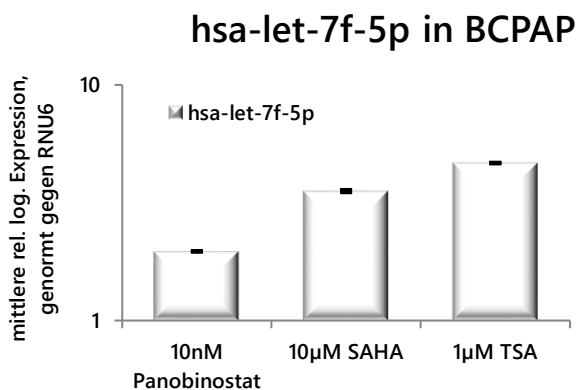


Abbildung 21b: RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie BCPAP (PTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7f-5p in 8505C:

Durch 10nM Panobinostat änderte sich in der ZL 8505C (PDTC) die Let7f Expression nicht signifikant. Auch unter 10µM SAHA blieb die Let7f Expression in 8505C Zellen stabil. Eine signifikante Let7f Hochregulierung der Expression zeigte sich hingegen durch die Behandlung mit 1µM TSA (Abb. 21c).

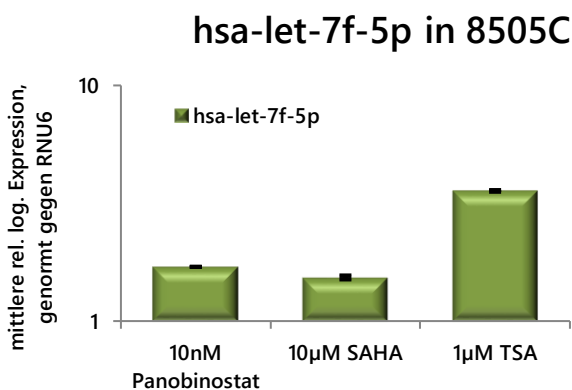


Abbildung 21c: RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie 8505C (PDTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7f-5p in C643:

In den Zellen der anaplastischen ZL C643 (ATC) blieb die Let7f Expression nach 10nM Panobinostat stabil. Let7f blieb in C643 Zellen auch stabil exprimiert nach 10 $\mu$ M SAHA sowie nach 1 $\mu$ M TSA (Abb. 21d).

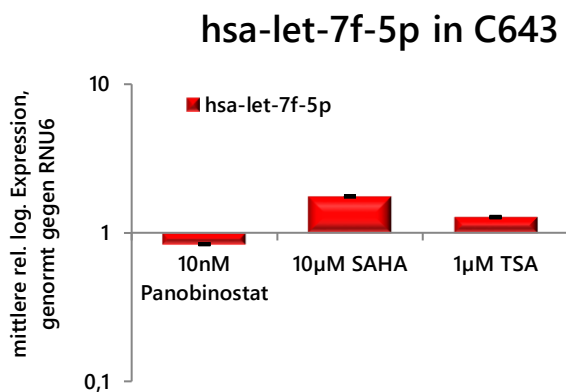


Abbildung 21d: RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie C643 (ATC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

### hsa-let-7f-5p in FTC133:

In der ZL FTC133 (FTC) zeigte Let7f ein stabiles Expressionsmuster nach der Behandlung mit 10nM Panobinostat und nach der Behandlung mit 10 $\mu$ M SAHA. 1 $\mu$ M TSA führte zu einer signifikanten Induktion des Let7f Gens (Abb. 21e).

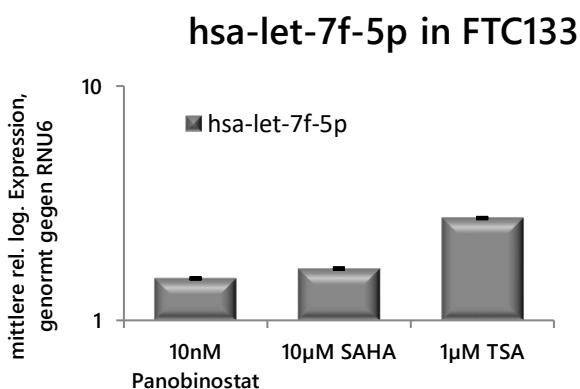


Abbildung 21e: RT-qPCR von hsa-let-7f-5p in der Zelllinie FTC133 (FTC) nach Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA über 48h. Die mRNA Expression wurde gegen RNU6 normalisiert. Die Ergebnisse sind relativ zu den unbehandelten Kontrollen, welche als 1.0 gesetzt wurden. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM von drei unabhängigen Experimenten, durchgeführt in Dreifachbestimmung.

In der Zusammenfassung zeigte Let7f über alle untersuchten ZL verteilt eine stabile oder hochregulierte Expression durch die Behandlung mit den HDACi Panobinostat, SAHA und TSA. Die Tabelle 14 verdeutlicht dies.

**Tabelle 14:** Expression von miRNA Let7f. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien. Expressionmuster von hsa-let-7f-5p nach 48h Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA in voneinander unabhängigen Versuchen.

↑ = Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); ↓ = Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ); – = Expression stabil

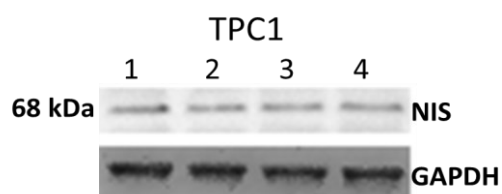
Zelllinie	Tumortyp	Let7f Expression		
		10nM Pano	10µM SAHA	1µM TSA
TPC1	PTC	↑	↑	↑
BCPAP	PTC	↑	↑	↑
8505C	PDTC	–	–	↑
C643	ATC	–	–	–
FTC133	FTC	–	–	↑

### 3.3 Ergebnisse des Western Blot

Es war Teil dieser Arbeit herauszufinden, ob die Behandlung mit HDACi die Genexpression nicht nur auf Transkriptionsebene beeinflusst, sondern die Proteinexpression von NIS verändern kann. Die Zelllinien TPC1 (PTC), BCPAP (PTC), 8505C (PDTC), C643 (ATC) und FTC133 (FTC) wurden hierfür jeweils mit Panobinostat 10nM, SAHA 10µM und TSA 1µM behandelt und für 48h inkubiert.

#### NIS Proteinlevel in TPC1:

Die NIS Proteinexpression in TPC1 (PTC) Zellen blieb im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach der Behandlung mit 10nM Panobinostat stabil. Ebenso zeigte sich keine messbare Veränderung der NIS Proteinlevel nach der Behandlung mit 10mM SAHA und 1µM TSA (*Abb 22a*).



**Abbildung 22a:** NIS Protein Level in TPC1 (PTC) nach 48h Behandlung mit HDACi. 1 = Unbehandelte Kontrolle; 2 = Panobinostat 10nM; 3 = SAHA 10µM; 4 = TSA 1µM. Die 68kDa Bande entspricht dem NIS Protein. GAPDH diente als Kontrolle.



### NIS Proteinlevel in BCPAP:

Die Substanzen Panobinostat (10nM), SAHA (10 $\mu$ M) und TSA (1 $\mu$ M) verursachten eine Re-Expression der NIS Proteinlevel in der ZL BCPAP, wie die Abb. 22b zeigt.

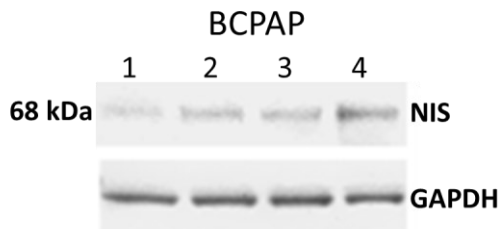


Abbildung 22b: NIS Protein Level in BCPAP (PTC) nach 48h Behandlung mit HDACi. 1 = Unbehandelte Kontrolle; 2 = Panobinostat 10nM; 3 = SAHA 10 $\mu$ M; 4 = TSA 1 $\mu$ M. Die 68kDa Bande entspricht dem NIS Protein. GAPDH diente als Kontrolle.

### NIS Proteinlevel in 8505C:

Das Proteinlevel von NIS in den Zellen der ZL 8505C (PDTC) blieb nach der Behandlung mit HDAC Inhibitoren stabil. 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA verursachten demnach keine signifikante Veränderung der NIS-Protein Expression (Abb. 22c).

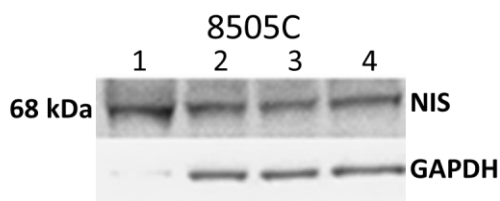


Abbildung 22c: NIS Protein Level in 8505C (PDTC) nach 48h Behandlung mit HDACi. 1 = Unbehandelte Kontrolle; 2 = Panobinostat 10nM; 3 = SAHA 10 $\mu$ M; 4 = TSA 1 $\mu$ M. Die 68kDa Bande entspricht dem NIS Protein. GAPDH diente als Kontrolle.

### NIS Proteinlevel in C643:

Der HDACi Panobinostat (10nM) induzierte in C643 Zellen (ATC) die NIS Protein Expression signifikant, wie Abb. 22d zeigt. Auch die anderen Substanzen, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA führten im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einem signifikanten Anstieg des NIS Proteinlevel.

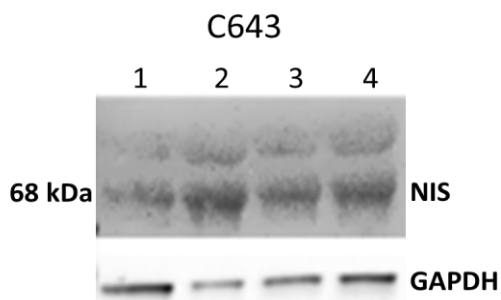


Abbildung 22d: NIS Protein Level in C643 (ATC) nach 48h Behandlung mit HDACi. 1 = Unbehandelte Kontrolle; 2 = Panobinostat 10nM; 3 = SAHA 10 $\mu$ M; 4 = TSA 1 $\mu$ M. Die 68kDa Bande entspricht dem NIS Protein. GAPDH diente als Kontrolle.

### NIS Proteinlevel in FTC133:

In der ZL FTC133 (FTC) zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle ein Anstieg der NIS Proteinlevel durch die Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA (Abb. 22e).

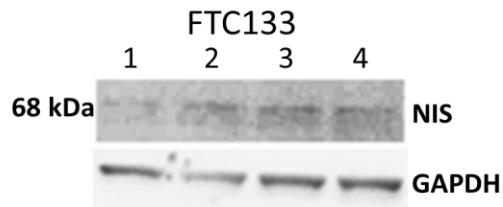


Abbildung 22e: NIS Protein Level in 8505C (PDTC) nach 48h Behandlung mit HDACi. 1 = Unbehandelte Kontrolle; 2 = Panobinostat 10nM; 3 = SAHA 10µM; 4 = TSA 1µM. Die 68kDa Bande entspricht dem NIS Protein. GAPDH diente als Kontrolle.

Die HDACi verursachten eine Reexpression und/oder eine starke Überexpression des NIS Protein in Zellen mit sehr geringer oder gar fehlender NIS Protein Expression, wohingegen sich bei Zellen mit basalem NIS Level kaum ein Effekt zeigte. Der zelluläre Ursprung der Zelllinien spielte bei der Proteinexpression keine Rolle (s. Tabelle 15).

Tabelle 15: Expressionslevel des NIS Proteins im Western Blot. Schematische Darstellung der untersuchten Zelllinien und ihrer jeweiligen Mutationen. Untersuchungszeitpunkt: Nach 48h Behandlung mit 10nM Panobinostat, 10µM SAHA und 1µM TSA, sowie der jeweils unbehandelten Kontrolle in voneinander unabhängigen Versuchen.

↑ = Expression signifikant erhöht ( $p < 0,05$ ); ↓ = Expression signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ); - = Expression stabil

Zelllinie	Tumortyp	NIS Protein Level			
		Kontrolle	10nM Pano	10µM SAHA	1µM TSA
TPC1	PTC	-	-	-	-
BCPAP	PTC	-	↑	↑	↑
8505C	PDTC	-	-	-	-
C643	ATC	-	↑	↑	↑
FTC133	FTC	-	↑	↑	↑

### 3.4 Ergebnisse des Radiojoduptake

Die Funktion des NIS wurde in den Zellen der ZL TPC1 (PTC), BCPAP (PTC), 8505C (PDTC), C643 (ATC) und FTC133 (FTC) durch die Messung des Radiojoduptake nach der Behandlung mit den HDACi Panobinostat 10nM, SAHA 10 $\mu$ M und TSA 1 $\mu$ M gegen eine unbehandelte Kontrolle analysiert. Die Messung erfolgte jeweils nach 24h und nach 48h Behandlungsdauer.

#### NIS Funktion in TPC1:

Nach der Behandlung mit 10nM Panobinostat war zu beiden Messzeitpunkten die NIS Funktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle stabil. Die Radiojodaufnahme in den TPC1 Zellen durch NIS blieb auch nach der Behandlung mit 10 $\mu$ M SAHA stabil. Ebenso zeigte sich in diesen Zellen auch nach 1 $\mu$ M TSA an beiden Messpunkten keine signifikante Veränderung der Radiojodaufnahme (*Abb. 23a*).

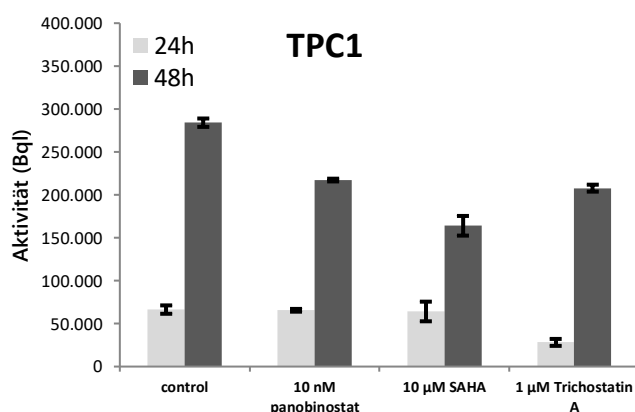


Abbildung 23a: Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi. TPC1 (PTC) wurde für 24h und 48h mit Panobinostat 10nM, SAHA 10 $\mu$ M und TSA 1 $\mu$ M, sowie 1MBq I<sup>131</sup> behandelt. Die Radioaktivität der Zellen wurde mittels Gamma counter gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM der in dreifacher Ausfertigung durchgeführten Experimente.

### NIS Funktion in BCPAP:

Abb. 23b zeigt die Radioaktivitätsmessung in der ZL BCPAP (PTC) nach 24h und nach 48h Inkubation mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA. Eine signifikante Änderung der Radiojodaufnahme und somit der NIS Funktion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte sich nicht.

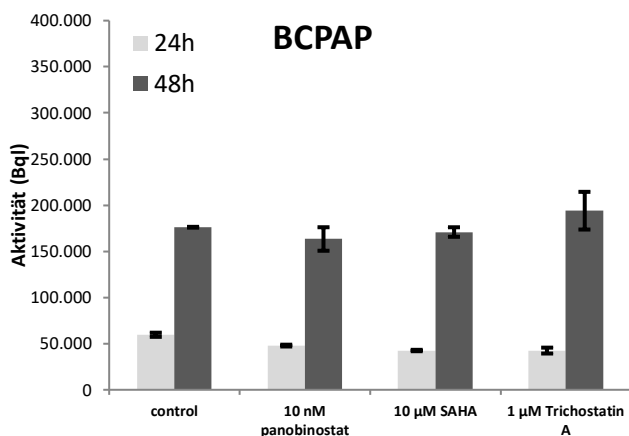


Abbildung 23b: Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi. BCPAP (PTC) wurde für 24h und 48h mit Panobinostat 10nM, SAHA 10 $\mu$ M und TSA 1 $\mu$ M, sowie 1MBq I<sup>131</sup> behandelt. Die Radioaktivität der Zellen wurde mittels Gamma counter gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM der in dreifacher Ausfertigung durchgeführten Experimente.

### NIS Funktion in 8505C:

Die NIS Funktion in Zellen der PDTC ZL 8505C blieb nach der Behandlung mit HDACi stabil. Nach 24h und 48h Inkubationszeit mit 10nM Panobinostat, 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA zeigte sich kein signifikanter Abfall oder Anstieg der Radiojodaufnahme der Zellen (Abb. 23c).

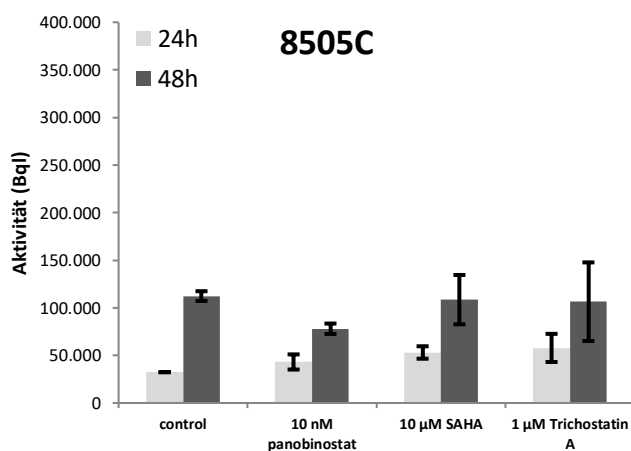


Abbildung 23c: Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi. 8505C (PDTC) wurde für 24h und 48h mit Panobinostat 10nM, SAHA 10 $\mu$ M und TSA 1 $\mu$ M, sowie 1MBq I<sup>131</sup> behandelt. Die Radioaktivität der Zellen wurde mittels Gamma counter gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM der in dreifacher Ausfertigung durchgeführten Experimente.

### NIS Funktion in C643:

Die Behandlung mit 10nM Panobinostat zeigte in C643 Zellen (ATC) zum Messpunkt nach 24h keine Änderung der NIS Funktion verglichen mit der unbehandelten Kontrolle. Nach 48h zeigte sich jedoch eine signifikante Zunahme der Radiojodaufnahme. 10µM SAHA verursachte zu keinem der beiden Messpunkte eine signifikant messbare Änderung der NIS Funktion. Unter der Behandlung mit 1µM TSA zeigte sich nach 24h eine stabile Aufnahme, nach 48h jedoch ein signifikanter Anstieg der Radiojodaufnahme (Abb. 23d).

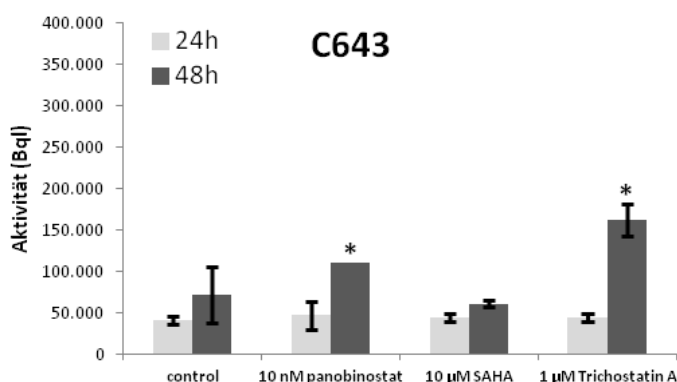


Abbildung 23d: Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi. 8505C (PDTC) wurde für 24h und 48h mit Panobinostat 10nM, SAHA 10µM und TSA 1µM, sowie 1MBq I<sup>131</sup> behandelt. Die Radioaktivität der Zellen wurde mittels Gamma counter gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM der in dreifacher Ausfertigung durchgeführten Experimente. \* $p < 0,05$  gilt als signifikante Änderung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

### NIS Funktion in FTC133:

Die NIS Funktion blieb im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nach 24h und 48h Behandlung mit 10nM Panobinostat in der ZL FTC133 (FTC) stabil. Sie blieb auch stabil nach 24h Behandlung mit 10µM SAHA, zeigte jedoch unter 10µM SAHA einen signifikanten Anstieg nach 48h. 1µM TSA veränderte die Radiojodaufnahme in FTC133 nicht signifikant, weder nach 24h noch nach 48h (Abb. 23e).

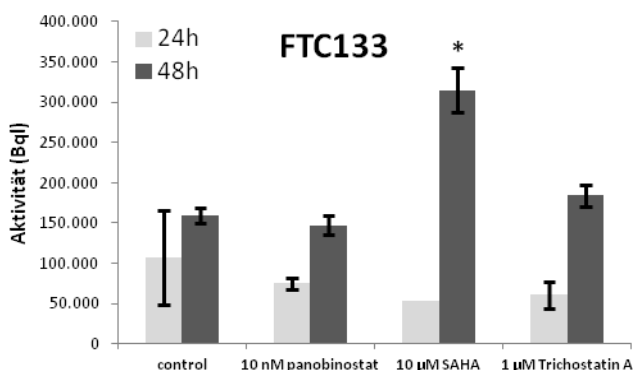


Abbildung 23e: Aktivitätsmessung von Radiojod nach Behandlung mit HDACi. 8505C (PDTC) wurde für 24h und 48h mit Panobinostat 10nM, SAHA 10µM und TSA 1µM, sowie 1MBq I<sup>131</sup> behandelt. Die Radioaktivität der Zellen wurde mittels Gamma counter gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert +/- SEM der in dreifacher Ausfertigung durchgeführten Experimente. \* $p < 0,05$  gilt als signifikante Änderung zwischen behandelten und unbehandelten Zellen.

## 4 Diskussion

Karzinome allgemein bestehen aus Zellen, die u.a. aufgrund von Mutationen ihre Fähigkeit zur Differenzierung verloren haben und stattdessen Eigenschaften wie veränderte Zellalterung, Kontrollverlust von Tumorsuppressorgen, Verlust der Verankerung im Gewebeverband u.ä. aufweisen.

Zu den bislang häufig verwendeten Therapieoptionen gehören operative Therapien, Chemotherapie und Bestrahlung. Die aktuellen Chemotherapeutika beinhalten Substanzen, die zum Beispiel als Antimetabolite, Zellspindelgift oder Topoisomeraseinhibitoren fungieren. Auch monoklonale Antikörper und Tyrosinkinaseinhibitoren werden zur Therapie eingesetzt. Diese Substanzen sind nicht immer erfolgreich. Häufige Probleme sind Resistenzentwicklung und ungenügende Spezifität sowie starke Nebenwirkungen. Alternativen oder auch Adjuvantien, die in Kombination mit den herkömmlichen Chemotherapeutika eingesetzt werden können, werden benötigt, um die Wirkung zu verbessern, Nebenwirkungen zu lindern und somit die Lebensqualität der Patienten zu steigern (Souza und Chatterji 2015).

Eine unkontrollierte Proliferation von Zellen ist ein wichtiger Aspekt in der Entstehung und Progression von malignem Zellwachstum und somit der Entstehung von Tumoren (Souza und Chatterji 2015). Die unterschiedlichen Schilddrüsenkarzinome weisen zum Teil erhebliche Unterschiede in ihrem Malignitätsverhalten und ihrer Prognose auf. So beeinflusst der Differenzierungsgrad von Tumorgewebe entscheidend das Verhalten des entarteten Gewebes. Differenzierte Schilddrüsenkarzinome (DTC) haben durch etablierte Therapieoptionen wie Operation und Radiojodtherapie eine gute Prognose. Bei schlecht differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (PDTC) und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen (ATC) bleiben die therapeutischen Möglichkeiten dagegen bisher eingeschränkt. Diese Tumoren zeigen ein schnelles Wachstum, metastasieren früh und haben die Fähigkeit zur Radiojodaufnahme häufig verloren. Neue Substanzen sind bereits in Erprobung, deren Effizienz ist allerdings noch Bestandteil aktueller Forschung. Epigenetische Veränderungen spielen in der Karzinogenese eine wichtige Rolle. Über die Modulation epigenetischer Prozesse stellen HDACi eine potentiell wichtige Substanzklasse in der Karzinomtherapie dar (Ngamphaiboon et al. 2015). Manche HDACi haben in den vergangenen Jahren bereits Verwendung zur Behandlung anderer Tumoren gefunden. Im Jahre 1990 wurde Trichostatin A als erster HDACi entdeckt. Der erste durch die FDA zugelassene HDACi war SAHA (Vorinostat) im Jahr 2006 zur Behandlung von progredienten T-Zell Lymphomen der Haut. Im Jahr 2009 folgte

Romidepsin zur Behandlung von kutanen T-Zell Lymphomen (CTCL) sowie peripheren T-Zell Lymphomen (Souza und Chatterji 2015). Panobinostat ist ein HDACi, der bereits im geringen nanomolaren Konzentrationsbereich potente inhibitorische Aktivität gegenüber HDAC Enzymen aller Klassen hat. Dies rechtfertigt entsprechend die Zugehörigkeit zur Klasse der pan-HDACi, also einem gegen alle HDAC Klassen wirksamen Inhibitor. Mit Ausnahme der HDAC4, HDAC7 und HDAC8, welche erst in mittleren nanomolaren Konzentrationen gehemmt wurden, konnte für alle anderen HDAC Enzyme eine Hemmung bereits bei Konzentrationen  $\leq 13,2$  nm erreicht werden. Damit war Panobinostat deutlich potenter als andere pan-HDACi wie Vorinostat und Belinostat und scheint aktuell der potenteste Vertreter dieser Klasse zu sein (Atadja 2009). Seit 2015 ist Panobinostat in der Behandlung des multiplen Myeloms als Drittlinientherapie zugelassen (Yee und Raje 2018).

Das Wissen über die genaue Wirkweise dieser Substanzen und deren Effekt auf solide Tumoren ist bisher noch lückenhaft. In dieser Studie wurde die Wirkung der o.g. HDACi Panobinostat, SAHA und Trichostatin A auf Zelllinien unterschiedlicher Schilddrüsenkarzinome in vitro untersucht. Zur Messung wurde dafür eine Echtzeit Zellwachstumsanalyse mittels xCELLigence durchgeführt. Es war von besonderem Interesse das Redifferenzierungspotential der HDACi in Zellen von Schilddrüsenkarzinomen zu untersuchen sowie das Zusammenspiel von für die Schilddrüsenfunktion notwendiger Gene, typischer Onkogene und Tumorsuppressoren in Schilddrüsenkarzinomen besser zu verstehen. Hierfür standen neben den etablierten Zelllinien auch Gewebe von Patienten mit Schilddrüsenkarzinomen zur Untersuchung zur Verfügung. Nach Behandlung mit den HDACi wurde mittels RT-qPCR die Expression der Gene NIS, HMGA2, TTF1, der miRNAs Let7b und Let7f sowie die der lncRNA H19 in den Schilddrüsenkarzinomzellen untersucht. Zur weiteren Evaluierung des Redifferenzierungspotentials der HDACi, vor allem im Hinblick auf einen potentiellen klinischen Einsatz dieser Substanzen, wurde schließlich mittels Western Blot und Radiojodaufnahmeversuchen die Proteinexpression von NIS und das Potential der Zellen Radiojod zu speichern getestet. Die Ergebnisse dieser Arbeit können die Grundlage für weitergehende in vitro und in vivo Studien legen.

#### 4.1 Effekte von HDACi in Zelllinien des Schilddrüsenkarzinoms

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der drei pan-Deacetylase Inhibitoren Panobinostat, SAHA und Trichostatin A in fünf Schilddrüsenkarzinomzelllinien unterschiedlicher Entität (FTC, PTC, PDTC und ATC) untersucht. Alle Zellen wurden hierbei in voneinander unabhängigen Versuchen mit jeder der drei Substanzen jeweils in den Konzentrationen 1nM bis 10 $\mu$ M behandelt. Es ist bemerkenswert, dass unabhängig vom Tumortyp, der Tumorherkunft und dem vorliegenden Mutationsstatus in allen ZL ein durch die HDACi induzierter starker Abfall der Zellindexkurven zu beobachten war. In Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration waren alle drei Substanzen in der Lage, das Wachstum der ZL zu beeinflussen. Gemessen an den ermittelten Konzentrationen zeigte Panobinostat hierbei die höchste Effektivität in allen histologischen Typen der Zelllinien. Diese lag bei Panobinostat bei einer Konzentration von 10nM. TSA bewirkte einen vergleichbaren Effekt auf den Zellindex bei einer Konzentration von 100nM (BCPAP und 8505C) und 1 $\mu$ M (TPC1, C643, FTC133). Die im Vergleich niedrigste Wirkpotenz hatte SAHA, welches das Zellwachstum in allen ZL bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M hemmte. Wie bereits veröffentlicht, konnte hier zum ersten Mal die höchste Wirkpotenz von Panobinostat im Vergleich mit anderen HDACi wie SAHA und TSA gezeigt werden (Wächter et al. 2018). Die zytotoxische Potenz von SAHA und Panobinostat zeigen vorangegangene Studien bereits in Zellen anderer Tumoren, zum Beispiel Bernhart et al. in Zellen des Synovialsarkoms und des Chondrosarkoms. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Wächter et al. zeigten auch die von Bernhart et al. ermittelten IC<sub>50</sub> Werte von 8,6 $\mu$ M für SAHA und 100nM Panobinostat einen deutlichen Potenzunterschied in der Zytotoxizität beider Substanzen. (Bernhart et al. 2017). Wie oben erwähnt, konnte hier bemerkenswerterweise für Zellen von Schilddrüsenkarzinomen eine Wirkung von Panobinostat auf das Zellwachstum schon bei 10nM nachgewiesen werden (Wächter et al. 2018). Eine effektive Hemmung des Zellwachstums durch SAHA und Panobinostat wurde auch in ZL des Kolorektalen Karzinoms (CRC) beobachtet, wobei auch hier Panobinostat in deutlich niedrigeren Konzentrationen als SAHA wirksam war. Interessanterweise entwickelte sich in CRC Zellen bereits nach kurzer Zeit eine Reversibilität der durch SAHA hervorgerufenen Effekte. Im Gegensatz dazu zeigte bereits eine kurze Behandlung mit Panobinostat messbare Effekte in diesen Zellen über einen längeren Zeitraum (Wilson et al. 2013). Dieser Aspekt wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht explizit untersucht, liefert jedoch möglicherweise Anlass für weitere Untersuchungen in zukünftigen



Arbeiten. Panobinostat wies auch in Zellen des kutanen T-Zell Lymphoms (CTCL) bereits in niedrigen Konzentrationen zytotoxische Effekte auf. Selbst gegen SAHA resistente ZL reagierten noch empfindlich auf Panobinostat (Shao et al. 2010).

Trichostatin A hemmt Zellwachstum und induziert Apoptose in Karzinomzellen, was zum Beispiel in einer ZL vom Magenkarzinom nachgewiesen wurde. Die genauen molekularen Mechanismen dieser Wirkung müssen noch untersucht werden (Li et al. 2015). Entsprechend der Ergebnisse der eben genannten Studien konnte auch im Rahmen dieser Arbeit der hohe Wirkungsgrad der untersuchten HDACi gezeigt werden. Hervorzuheben ist hierbei vor allem die starke Potenz von Panobinostat, welches in vielen unterschiedlichen Tumoren bereits im niedrigen nanomolaren Bereich wirksam ist. Limitierend bleibt zu erwähnen, dass die hier durchgeführten xCELLigence Versuche Impedanzmessungen lediglich an 2D Zellkulturen darstellen. Änderungen der Impedanz und damit ein Abfall des Zellindex können durch unterschiedlichste Ursachen, wie Änderungen der Zellgröße, -zahl, -morphologie oder auch Zelltod hervorgerufen werden (Yan et al. 2018). Ohne ergänzende Untersuchungen an 3D-Zellkulturen bzw. an in vivo Modellen kann daher keine genaue Aussage darüber getroffen werden, welche Veränderungen zum beobachteten Abfall der Messkurve geführt haben. Ob der in dieser Arbeit gezeigte Abfall des Zellindex also möglicherweise auf zytotoxischen Wirkungen der HDACi beruht, sollte in Zukunft noch durch ergänzende Experimente geklärt werden.

Ein Grund dafür, dass HDACi trotz ihres allgemein anerkannten großen antineoplastischen Potentials bisher nur wenig klinisch eingesetzt werden, hängt mit der großen Komplexität der Wirkmechanismen dieser Substanzen zusammen. In den letzten Jahren sind bereits einige gute Arbeiten zur Funktion der HDACi in der Literatur erschienen (Bose et al. 2014). Catalano et al. untersuchte den Wirkmechanismus von Panobinostat in ATC Zellen. Verstärkte Acetylierung ist ein bekannter Faktor zur Stabilisierung der Mikrotubuli, was die Dynamik des Spindelapparates in der Mitose behindert und zur Blockade des Mitosevorganges am Übergang der Meta- zu Anaphase führt. Dieser Mechanismus führte auch in den von Catalano et al. untersuchten Zellen zur Induktion von Apoptose (Catalano et al. 2012).

Einige Autoren stellten die Vermutung auf, dass die Zukunft der vielversprechenden Substanzklasse der HDACi in der Kombinationstherapie mit anderen Medikamenten liegt (Bose et al. 2014; Grant und Dai 2012; Bernhart et al. 2017). Die primären

therapeutischen Maßnahmen sind Operation und Radiojodtherapie, insbesondere bei DTC (vgl. 1.1.5.1. *Therapie differenzierter Schilddrüsenkarzinome*). Fortgeschrittene Karzinome entwickeln jedoch nicht selten eine Radiojod-Refraktärität, weshalb Chemotherapie in diesen Fällen die einzige verbleibende systemische Therapieoption darstellt. Zum Beispiel Doxorubicin und Cisplatin sind für die Therapie von Schilddrüsenkarzinomen zugelassen, wenngleich die Ansprechraten mit 20-30% niedrig sind (Hussein et al. 2013). In Chondrosarkomzellen konnte zum ersten Mal ein synergistischer Effekt der HDACi SAHA, Panobinostat und PXD101 mit Doxorubicin beobachtet werden (Bernhart et al. 2017). Auf Grundlage des in Bernhart et al. dargestellten synergistischen Effekts von HDACi und Doxorubicin scheint es plausibel, in zukünftigen Studien auch in Schilddrüsenkarzinomzellen die Wirksamkeit von HDACi gemeinsam mit weiteren Chemotherapeutika zu testen, um das Potential einer möglichen Kombinationstherapie besser abschätzen zu können. Zu beachten ist in diesem Zusammenhang zudem, dass epigenetische Genregulation über den Acetylierungsstatus von Histonen hinausgeht (vgl. 1.1.6.2. *Epigenetische Veränderungen in Schilddrüsenkarzinomen*). Insbesondere die Methylierung bestimmter DNA-Abschnitte wie z.B. Promotorregionen von Genen nimmt Einfluss auf die Transkriptionsrate und beeinflusst außerdem den Acetylierungsgrad von Histonen (Irvine et al. 2002). Sicherlich ist ein interessanter Aspekt für weitergehende Experimente, wie über diese Interaktionen die Methylierung bestimmter Promotorregionen hier untersuchter Gene Einfluss auf die Wirksamkeit von HDACi nimmt. Da hier nur einige Schilddrüsendifferenzierungsmarker untersucht wurden, sollten die Experimente um Untersuchungen von weiteren für die Schilddrüsenfunktion wichtiger Gene ergänzt werden, um näheren Aufschluss über das Redifferenzierungspotential von HDACi zu bekommen (s.u.).

## **4.2 Redifferenzierungspotential der HDACi anhand der NIS Expression und der Radiojodaufnahme**

Es war Teil dieser Arbeit das Redifferenzierungspotential von HDACi in Schilddrüsenkarzinomzellen zu untersuchen. Refraktärität gegenüber Radiojod in DTC ist assoziiert mit der Fehlfunktion des Natrium-Jodid Symporters (NIS), sowie anderer mit dem Jodstoffwechsel assoziierter Gene wie Tg, TPO oder TSHR. Eine verminderte NIS Expression in DTC Zellen kann Ursache für eine verminderte Jodspeicherkapazität sein (Jin et al. 2018; Hong und Ahn 2017). Auch in ATC liegt die Resistenz gegenüber

der Behandlung mit Radiojod an der fehlenden Funktionalität des NIS (Hsu et al. 2014). Es ist weithin akzeptiert, dass Inhibitoren von Histondeacetylasen die Redifferenzierung und Apoptose entarteter Zellen induzieren (Richon et al. 2000) und sogar in radiojodrefraktären differenzierten Schilddrüsenkarzinomen (RR-DTC) die Radiojodaufnahme erhöhen (Hong und Ahn 2017). Auch zeigte Furuya et al. in entdifferenzierten Zellen einer PDTC und einer ATC ZL, dass die HDACi Depsipeptide (auch FK228) und TSA die Re-Expression von NIS, sowie TPO und Tg mRNA induzieren und sogar die Jodaufnahme in diesen Zellen erhöhen können (Furuya et al. 2004). Auch in der Studie von Hong und Ahn erhöhte sich durch den Einsatz von HDACi in Schilddrüsenkarzinomen die Expression schilddrüsenpezifischer Gene wie Thyreoperoxidase und NIS (Hong und Ahn 2017).

In dieser Arbeit wurde die NIS Expression auf der Transkriptions- und auf der Proteinebene untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die HDAC Inhibitoren Panobinostat, SAHA und TSA in fünf unterschiedlichen Schilddrüsenzelllinien eine starke Induktion des NIS Gens hervorrufen. In drei ZL (BCPAP, C643, FTC133) zeigte sich zudem ein Anstieg des NIS Protein Levels. Diese ZL hatten unbehandelt kein oder nur ein minimal messbares Level an NIS Protein. Herauszufinden, welche Signalwege genau durch die HDACi beeinflusst werden, die zur Wiedererlangung der NIS Funktion in den entarteten Zellen führen, ist anhand dieser Studie nicht zu beantworten, könnte aber ein interessanter Aspekt für zukünftige Studien sein. Basierend auf Beschreibungen früherer Studien, dass ein aktiver Jodtransport in Schilddrüsenzellen nur mithilfe eines an der basolateralen Membran der Follikelzellen lokalisierten NIS vonstatten gehen kann (Hingorani 2010; Galrao et al. 2014), stellten wir die Vermutung auf, dass HDACi nicht nur die Expression von NIS wiederherstellen, sondern auch dessen Funktion modulieren können. Diese Annahme fand Bestätigung im Anstieg der Radiojodaufnahme in Schilddrüsenkarzinomzellen nach der Behandlung mit HDACi, wenngleich dieser Effekt nur in zwei der fünf untersuchten ZL gefunden wurde. In der anaplastischen ZL C643 erhöhte sich die Aufnahme von Radiojod durch Behandlung mit 10nM Panobinostat sowie durch 1µM TSA. In der follikulären ZL FTC133 bewirkte 10µM SAHA einen Anstieg der Radiojodkonzentration. In den genannten Zellen zeigte sich ebenfalls eine Hochregulierung der NIS Protein Level. Es kann daher die Annahme gemacht werden, dass Zellen mit einer niedrigen oder fehlenden NIS Expression am sensibelsten auf die HDACi vermittelte Steigerung der Radiojodaufnahme reagieren. Im Einklang mit dieser Annahme zeigte sich bei TPC1 Zellen und 8505C Zellen weder eine

Steigerung des NIS Protein Levels noch der Radiojodaufnahme. In BCPAP Zellen zeigte sich trotz einer Steigerung des NIS Protein Levels, vornehmlich unter TSA  $1\mu\text{M}$ , keine Änderung der Radiojodaufnahme. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse der oben angeführten Studien und zeigen das Potential der HDACi in der Redifferenzierungstherapie von Schilddrüsenkarzinomen. Hervorzuheben ist hierbei vor allem die Wirkung von Panobinostat im nanomolaren Konzentrationsbereich. Es bleibt die Frage, warum lediglich in manchen ZL die Aufnahme von Radiojod wiederherstellbar war und ob möglicherweise Kombinationen mit anderen Substanzklassen diesbezüglich übergreifendere Ergebnisse zeigen könnten.

Nichtsdestotrotz haben HDACi in klinischen Studien mit dem Ziel der Redifferenzierung von radiojodrefraktärem Gewebe bisher enttäuscht. Was diesen Studien fehlte, war eine genaue Charakterisierung des Tumorprofils wie der vorliegenden Mutationen und die entsprechende Auswahl einer geeigneten Redifferenzierungssubstanz. Die Effizienz von Redifferenzierungsversuchen könnte durch die Nutzung neuerer Erkenntnisse über genetische und biologische Charakteristika von Schilddrüsenkarzinomen verbessert werden (Hong und Ahn 2017).

Der NIS spielt in der Schilddrüse eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme und Konzentration von Jod in den Follikelzellen (Hou et al. 2010). Daher wurde im Rahmen dieser Studie das Augenmerk insbesondere auf die Expression und Funktion des NIS gelegt und anhand dessen Rückschlüsse auf einen möglichen Redifferenzierungsaspekt durch die HDACi gezogen. Wie oben bereits erwähnt, sind für die korrekte Funktion ausdifferenzierter Schilddrüsenzellen weitere Gene und Proteine essentiell. Da im Rahmen dieser Arbeit viele weitere Differenzierungsmarker nicht untersucht wurden, kann in dieser Hinsicht nur bedingt eine Aussage über das Redifferenzierungspotential der untersuchten HDACi getroffen werden. Allerdings zeigten Hou P. et al bereits 2010 anhand des Expressionsprofils mehrerer am Jodmetabolismus beteiligter Gene sowie wichtiger Transkriptionsfaktoren das therapeutische und redifferenzierende Potential von SAHA sowie weiterer Substanzen mit Wirkung auf die im Schilddrüsenkarzinom häufig dysregulierten MAPK- und PI3K/AKT/mTOR Signalwege (vgl. 1.1.6.1. *Genetische Veränderungen in Schilddrüsenkarzinomen*) (Hou et al. 2010).

Vorliegende Mutationen in den zu behandelnden Zellen sind ein weiterer Faktor, der die Wirksamkeit von Substanzen beeinflussen kann. Der Tumorsuppressor p53 ist ein wichtiger Regulator von Zelldifferenzierung und epigenetischer Genregulation (Levine und Berger 2017). Mit Ausnahme der ZL TPC1 (PTC) tragen alle in dieser Arbeit

verwendeten ZL eine TP53 Mutation. Eine Beeinflussung der Wirkung der HDACi durch die TP53 Mutation ist daher nicht auszuschließen und stellt einen weiteren limitierenden Aspekt zur Beurteilung des Redifferenzierungspotentials der Substanzen dar.

### **4.3 Inverse Korrelation von HMGA2 und miRNAs der Let7 Familie in Schilddrüsenkarzinomen**

Die miRNAs der Let7 Familie bilden aktuell die größte bekannte Familie von miRNAs mit multiplen Funktionen in der Entwicklung sowie der Entstehung verschiedener Erkrankungen und der Karzinogenese. In Bezug auf die Tumorentstehung nimmt die Let7 Familie tumorsuppressive Funktionen ein, indem sie mit der Expression verschiedener Onkogene und onkogener Faktoren interferiert (Busch et al. 2016). Mittels in silico Analyse konnte gezeigt werden, dass SLC5A5 eine Zielstruktur von hsa-let-7f-5p ist (Damanakis et al. 2016). Damanakis und Kollegen fanden in Tumorproben von FTC und PTC eine inverse Korrelation zwischen der Suppression von NIS und der Überexpression von hsa-let-7f-5p. In ATC Tumorgewebe ließ sich hingegen kein eindeutiger Zusammenhang zwischen NIS und hsa-let-7f-5p feststellen (Damanakis et al. 2016). Zur weiteren Abklärung der Beziehung zwischen hsa-let-7f-5p und der NIS Expression wurde in dieser Arbeit mittels RT-qPCR die Expression beider Gene in Zelllinien unterschiedlicher Schilddrüsenkarzinome nach Behandlung mit HDACi untersucht. Die Expression der miRNA hsa-let-7f-5p war, bei gleichzeitiger Überexpression von NIS, stabil oder überexprimiert. Entgegen der ursprünglichen Vermutung ist daher unwahrscheinlich, dass Let7f die NIS-Expression in diesen Zelllinien hemmt.

Desweiteren wurde die Expression der miRNA hsa-let-7b-5p (Let7b) untersucht. Bis auf eine signifikante Suppression von Let7b in TPC1 Zellen durch 10 $\mu$ M SAHA, sowie Überexpression in BCPAP durch 10 $\mu$ M SAHA und 1 $\mu$ M TSA und durch 1 $\mu$ M TSA in 8505C, war Let7b in allen Zellen nach der Behandlung mit HDACi stabil exprimiert (vgl. 3.2.5.1. *Expression von hsa-let-7b-5p*). Ergebnisse einer in silico Analyse zeigen HMGA2 als Ziel von hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p (Damanakis et al. 2016). Die oben beschriebene stabile oder hochregulierte Expression der miRNAs Let7f und Let7b in den untersuchten ZL könnte invers korreliert sein mit der signifikanten Herunterregulierung des HMGA2 Gens, welches ein architektonischer Transkriptionsfaktor mit wohlbekanntem onkogenen Eigenschaften ist. Tatsächlich enthält die 3' UTR

(Untranslated Region) des HMGA2 Gens Zielsequenzen für mehrere miRNAs, u.a. auch für miRNAs aus der Let7 Familie. Verschiedene Studien belegen, dass durch den Verlust der 3' UTR im HMGA2 Gen zur onkogenen Aktivität von HMGA2 beigetragen wird, da dadurch die hemmende Kontrolle auf die HMGA2 Expression durch diese miRNAs aufgehoben wird. Somit resultiert in diesem Fall eine Überexpression von HMGA2 (Fedele et al. 2010). Di Fazio et al. stellte fest, dass Let7b eine Suppression von HMGA2 in Zelllinien des hepatozelluläres Karzinoms (HCC) verursacht, welches der gleiche Effekt war, den auch die Behandlung mit Panobinostat in diesen Zellen verursachte (Di Fazio et al. 2012). Auch in Hypophysentumoren zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen HMGA2 und Let7 miRNAs. Die Herunterregulierung von Let7 wird als wahrscheinliche Ursache für HMGA2 Überexpression und mögliche Ursache für unkontrollierte Proliferation von Hypophysenzellen betrachtet (Fedele et al. 2010). Darüber hinaus liefert die Studie von Busch et al. Evidenz, dass die tumorsuppressive Rolle der Mitglieder der Let7 miRNA Familie durch das Zusammenspiel der drei Faktoren, IGF-2BP1, LIN28B und HMGA2 antagonisiert wird. Diese Ergebnisse stützen sich auf Untersuchungen an der Ovarialzelltumor-Zelllinie ES-2. Es gibt bereits Hinweise, dass dieses Zusammenspiel aus sich gegenseitig fördernden Faktoren gegen Let7 miRNAs in einer Vielzahl von Tumoren aktiv sein könnte und entsprechend als mögliches Ziel antitumoraler Therapien dienen könnte (Busch et al. 2016).

In Gewebeproben von Patienten mit FTC oder PTC zeigte sich Let7f in allen Proben hochreguliert. In Anbetracht der inversen Korrelation der tumorsuppressiven Let7 miRNAs und des onkogen aktiven HMGA2 entstand die Vermutung, dass Let7f die Tumoraggressivität der untersuchten Proben mildern kann (Damanakis et al. 2016). Diese Studie konnte die inverse Korrelation von Let7 miRNAs und HMGA2 bestätigen und zusätzlich zeigen, dass unter dem Einfluss von HDACi die Expression von HMGA2 in Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien supprimiert wird bei gleichzeitiger Überexpression schilddrüsenpezifischer Differenzierungsmarker wie NIS. Dies zeigt erneut das Redifferenzierungspotential der HDACi in Schilddrüsenkarzinomen und legt die Grundlage für weitere in vitro und in vivo Studien dieser Substanzklasse an Tumoren der Schilddrüse.

#### **4.4 Rolle der lncRNA H19 in Schilddrüsenkarzinomen**

H19, das Produkt eines 2.7kb großen Gens auf dem maternal vererbten Allel, ist eine long non-coding RNA, welche an fast allen Aspekten der Tumorentstehung beteiligt ist

(Raveh et al. 2015). Die Rolle von H19 in Tumoren ist kontrovers. Einige Autoren vermuten, dass die Funktion von H19 abhängig vom Karzinomtyp, des Entwicklungsgrads sowie des molekularen Hintergrundes ist (Wang et al. 2017a, S. 1103). So werden der lncRNA H19 in unterschiedlichen Arbeiten teils onkogene wie auch tumorsuppressive Eigenschaften zugeordnet (Liu et al. 2016b). Mehrere Studien der letzten Jahre berichten über die onkogene Wirkung von H19 in unterschiedlichen Tumoren, darunter Blasen-, Brust- und Zervixkarzinomen (Berteaux et al. 2005; Luo et al. 2013; Kim et al. 2002). Die Überexpression von H19 in diesen Tumoren ging einher mit gesteigertem Invasionsverhalten, der Neigung zur Metastasierung und einer schlechteren Prognose (Liu et al. 2016a). Liu, Yang et al. zeigten in PTC Schilddrüsenkarzinomzelllinien, u.a. BCPAP und TPC1 eine Überexpression der lncRNA H19, welche die Zellproliferation, Migration und Invasion in vitro förderte. H19 fungierte in diesen Zelllinien als Bindestelle für miRNA-17-5p zur Regulierung der YES1 Expression und begünstigte dadurch Zellwachstum und Metastasierungsverhalten. In einem Xenograft Modell induzierte die Überexpression von H19 Tumorwachstum, Hemmung von H19 ging dagegen mit vermindertem Tumorwachstum einher (Liu et al. 2016b). Anhand der Untersuchung von 131 Gewebeproben von Patienten mit einem Schilddrüsenkarzinom zeigte sich eine inverse Korrelation zwischen der miRNA Let7a und der lncRNA H19. Überexpression von H19 und Suppression von Let7a waren mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert (Liu et al. 2017).

Zhang, Yang et al. hingegen wiesen tumorsuppressive Funktionen der lncRNA H19 in HCC durch Hemmung von Metastasierungsverhalten nach (Zhang et al. 2013). In Schilddrüsenkarzinomzellen der ZL TPC1 (PTC) und SW579 (T-SCC = engl. Thyroid Squamous Cell Carcinoma) hemmte lncRNA H19 die Zellproliferation und förderte Apoptose mittels Herunterregulierung von IRS-1 (engl. Insulin receptor substrate 1) (Wang et al. 2017a, S. 1111). In PTC Gewebeproben führte die Überexpression von H19 zur Reduktion der Proliferation und Migration der Zellen und erfüllte dadurch eine tumorsuppressive Rolle. Die Autoren schlagen H19 zudem als diagnostisches Werkzeug für PTC vor (Lan et al. 2018). In der vorliegenden Studie wurde H19 in Patientengewebe von follikulären, papillären und anaplastischen Schilddrüsenkarzinomen nachgewiesen. Die H19 Expression in diesen Geweben war nicht einheitlich. In den follikulären Geweben kam eine generelle Supprimierung der H19 Expression zur Darstellung, PTC Proben zeigten eine uneinheitliche H19 Expression. Speziell in anaplastischen Geweben war H19 überexprimiert. Auch in der anaplastischen ZL C643 war die H19 Expression

nach der Behandlung mit HDACi signifikant erhöht. In den anderen Zelllinien mit Ausnahme der ZL BCPAP wurde nach Behandlung mit den HDACi Panobinostat, SAHA und TSA eine H19 Expression gefunden, die unabhängig vom Tumortyp stabil und/oder signifikant erhöht war (vgl. 3.2.4. *Expression von lncRNA H19*). In den anaplastischen Gewebeproben, sowie der anaplastischen Zelllinie C643, war in dieser Studie die Expression von H19 am höchsten.

Diese sehr heterogenen Ergebnisse lassen keine konkrete Aussage über den Einfluss der HDACi Wirkung auf die Expression und Funktion von H19 in den untersuchten Zellen zu. Um mehr über eine tumorsuppressive oder onkogene Funktion dieser lncRNA herauszufinden, wäre es interessant in Zukunft mittels eines H19-Knockout oder -Knockdown Versuches unter sonst gleichen Bedingungen zu beobachten, ob sich hierdurch das Differenzierungsverhalten der Zellen verändert. Insbesondere im Zusammenhang mit der Expression weiterer Differenzierungsmarker, die zusätzlich untersucht werden könnten oder auch anhand der Radiojodaufnahmekapazität könnte dies entsprechend anschaulich gemacht werden (vgl. 4.2 *Redifferenzierungspotential von HDACi anhand der NIS-Expression und der Radiojodaufnahme*).

#### **4.5 Auswirkungen von HDACi auf den Differenzierungsmarker TTF1**

TTF1 ist ein für die Entwicklung der Schilddrüse essentieller Transkriptionsfaktor (Akagi et al. 2008), welcher nicht nur in der Embryogenese sondern auch in der Karzinogenese verschiedener Gewebe inklusive der Schilddrüse eine Rolle spielt (Kimura 2011; Yamaguchi et al. 2013). In dieser Studie wurde die Expression von TTF1 in zwölf ATC Gewebeproben untersucht. In sieben der zwölf Proben konnte eine TTF1 Expression festgestellt werden, davon war TTF1 in vier Proben überexprimiert, zweimal supprimiert und einmal stabil. In der anaplastischen ZL C643 zeigte sich TTF1 nach der Behandlung mit Panobinostat überexprimiert und stabil nach der Behandlung mit SAHA und TSA. Dieses sehr heterogene Expressionsmuster deckt sich mit den Ergebnissen der Studie von Takano, Ito et al., die feststellten, dass der Verlust der TTF1 Expression kein festes Charakteristikum von ATC Zellen darstellt, da manche Zelllinien TTF1 hoch exprimieren, in anderen wiederum keine Expression detektierbar ist (Takano et al. 2007). Deeken Draisey et al. beschrieben allerdings den Verlust der TTF1 Expression in allen von ihnen untersuchten ATC (Deeken-Draisey et al. 2018). Die stark variierenden zellulären Eigenschaften einzelner ATC aufgrund der starken Entdifferenzierung dieser Entität sind wahrscheinlich die Ursache dafür, dass bisher über die Expression von TTF1



in ATC keine einheitlichen Ergebnisse gefunden werden konnten. Bei den in dieser Studie untersuchten PTC Gewebeproben konnte keine TTF1 Expression gefunden werden. Dies steht im Kontrast zu den Ergebnissen von Zhang, Zuo et al., die unterschiedlich starke TTF1 Expression in allen Subtypen des Schilddrüsenkarzinoms fanden (Zhang et al. 2006). Nichtsdestotrotz konnte im Gegensatz zu den PTC Gewebeproben in den untersuchten PTC Zelllinien auch in dieser Studie TTF1 nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der TTF1 Expression in den Zelllinien TPC1 und BCPAP (beide PTC) zeigte sich TTF1 durch die Behandlung mit HDACi überexprimiert in TPC1 Zellen, aber supprimiert in BCPAP Zellen. Den Ergebnissen in diesen Zelllinien zufolge scheint demnach die TTF1 Expression in verschiedenen PTC nicht einheitlich zu sein. Interessant ist hierbei die Beobachtung von Endo et al. die eine mögliche Interaktion von RET/PTC1 Mutationen und TTF1 in PTC zeigten und postulierten, dass diese Interaktion die Eigenschaften der Karzinomzellen beeinflussen könnte (Endo und Kobayashi 2013). Die vorliegende RET/PTC Mutation in den TPC1 Zellen könnte somit eine Erklärung für die Überexpression von TTF1 im Gegensatz zur TTF1 Suppression in den BCPAP Zellen sein. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass BRAF Mutationen in Schilddrüsenkarzinomen invers mit der TTF1 Expression korreliert sind. In einem Maus-Experiment entwickelten Mäuse mit homozygoter TSHR D633H Mutation nach etwa einem Jahr große PTC. Diese Tumoren zeigten erhöhte TTF1 Konzentrationen, waren aber negativ für BRAF Mutationen (Jaeschke et al. 2018). Die BRAFV600E Mutation könnte also ein weiterer Grund für die Suppression von TTF1 in BCPAP Zellen sein, was durch die gefundene TTF1 Suppression in den ebenfalls BRAFV600E mutierten 8505C Zellen zusätzlich gestützt wird. Da alle untersuchten Zelllinien eine TP53 Mutation tragen, scheint diese keinen Einfluss auf die TTF1 Expression zu haben. TTF1 war supprimiert in acht von acht FTC Geweben. In unserer follikulären Beispielzelllinie FTC133 induzierten Panobinostat, SAHA und Trichostatin A jeweils eine Suppression von TTF1. Dies lässt die vage Hypothese zu, dass die Suppression von TTF1 den Zelltodmechanismus der HDACi in FTC Zellen unterstützt. In Anbetracht der komplexen Regulation von TTF1, die vielleicht abhängig vom Mutationsstatus der einzelnen Tumoren ist und der bisher unklaren Rolle von TTF1 in Schilddrüsenkarzinomen sollten hierzu weitere klärende Studien folgen. Kondo et al. zeigten eine positive Korrelation zwischen der Acetylierung von Histon H3-lys9 und der TTF1 Expression in Schilddrüsenkarzinomzelllinien. Demethylierende Substanzen konnten die Expression von TTF1 in Zelllinien mit TTF1-Expressionsverlust

wiederherstellen, was auf eine epigenetische Regulation von TTF1 hinweist und TTF1 als mögliches Ziel einer Redifferenzierungstherapie in den Fokus rückt. In der epigenetischen Regulation von TTF1 könnte jedoch die DNA-Methylierung entscheidender sein als die Acetylierung von Histonen (Kondo et al. 2009). Dies geht konform mit den Ergebnissen in dieser Studie, wo die verwendeten HDACi keinen richtungsweisenden Effekt auf die Expression von TTF1 hatten. Nichtsdestotrotz induzierten sie in Zelllinien unterschiedlicher Schilddrüsenkarzinome Zelltod und, sichtbar an der Re-Expression des NIS in allen Zelllinien sowie der wiederhergestellten Radiojodaufnahme in zwei Zelllinien, auch Redifferenzierung. Die Kombination acetylierender und methylierender Substanzen könnte möglicherweise die redifferenzierenden Effekte in künftigen Studien verstärken.

## 4.6 Ausblick

Es ist bekannt, dass die Karzinogenese ein Zusammenspiel genetischer und epigenetischer Ereignisse ist. Mithilfe aktueller Forschung gelingt nicht nur die Offenlegung immer detaillierteren Wissens über die Vorgänge, die zur Entstehung verschiedener Tumorerkrankungen führen, es offenbart sich gleichzeitig die enorme Komplexität der darin involvierten zellulären Prozesse. Darüber hinaus verhelfen neu entschlüsselte Zusammenhänge auch dabei neue therapeutische Optionen zu finden. HDACi stellen eine vielversprechende Substanzklasse dar, die durch die Beeinflussung epigenetischer Vorgänge in der Karzinogenese das Feld antineoplastischer Medikamente/Substanzen erweitern. Diese Studie zeigt die gute Wirksamkeit dreier HDACi in Zelllinien mehrerer Schilddrüsenkarzinome in Bezug auf ihren Effekt hinsichtlich des Zellwachstums und ihres Redifferenzierungspotentials. Insbesondere der HDACi Panobinostat zeigte bereits in niedrigen nanomolaren Konzentrationen eine effektive Wirkung. Die für die Effekte von Panobinostat notwendigen Konzentrationen können sowohl durch intravenöse als auch durch orale Applikation auch im Menschen erreicht werden, wie verschiedene Phase I Studien bereits zeigen konnten. (Catalano et al. 2012). In den vergangenen Jahren hat die Forschung eine vielversprechende Wirkung verschiedener HDACi an vielen unterschiedlichen Tumoren gezeigt. Hierzu gehören neben hämatologischen Malignomen z.B. auch das Pankreas-, Prostata-, Leber- sowie das Schilddrüsenkarzinom (Giles et al. 2006; Minjie et al. 2015; Choi et al. 2013; Chen et al. 2016; Catalano et al. 2012). Trotz der bereits erfolgten Zulassung einzelner HDACi zur Behandlung bestimmter hämatologischer Malignome gestaltet sich die Erweiterung ihres Einsatzgebietes schwierig. Dies liegt unter anderem an ihrer komplexen und dadurch noch unzureichend verstandenen Wirkweise. Die Wirkung eines HDACi scheint als alleinige Therapieoption häufig unzureichend zu sein, weshalb die Kombination mit weiteren antineoplastischen Medikamenten einen möglichen sinnvollen Ansatz darstellt (Grant und Dai 2012). Auch hierzu gibt es bereits Arbeiten, die die synergistische Wirkung von HDACi mit anderen Substanzen zeigen (Lee et al.; Gray et al. 2014). Zum Beispiel zeigte die Kombination von HDACi und Poly-ADP-Ribose-Polymerase Inhibitoren (PARP-Inhibitoren) in Zelllinien des HCC, bei Leukämie, beim Mammakarzinom- und Ovarialkarzinom eine synergistische Wirkung u.a. in Form einer Inhibition des Zellwachstums und einer Steigerung der Apoptoselevel. Auch in der anaplastischen ZL SW1736 zeigten sich in vitro synergistische Effekte auf die Zellproliferation durch die Kombination des PARP Inhibitors PJ34 und des HDACi

SAHA (Baldan et al. 2015). Einen Überblick über eine Vielzahl bereits getesteter Kombinationen gibt Miller et al. (Miller et al. 2011). Nach der Beobachtung von Synergismen zwischen unterschiedlichen Substanzklassen sollte der Fokus auch auf dem Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen liegen, um individualisierte Therapien entsprechend des jeweiligen Mutations- und Dysregulationsprofils der Tumoren erstellen zu können. In Anbetracht der großen Heterogenität von Tumoren/Karzinomen, selbst in Karzinomen der gleichen Ursprungsgewebe, stellt diese Anforderung die Forschung vor eine umfangreiche Aufgabe. Gerade am Beispiel des Schilddrüsenkarzinoms mit seinen vielen Subtypen wird dies besonders deutlich. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Faktoren, die in der Pathophysiologie des Schilddrüsenkarzinoms eine Rolle spielen, unter dem Einfluss von HDACi auf ihre Expression und Wechselwirkungen hin untersucht. Um die molekularen Auswirkungen solch komplexer Substanzen wie HDACi in Malignomen verstehen zu können, wird weitere Forschung nötig sein. Diese Arbeit kann als ein Puzzleteil in diesem vielschichtigen Gerüst angesehen werden, welches hoffentlich einen Beitrag dazu leisten kann in Zukunft sinnvolle Therapiekonzepte zu erarbeiten. Dies ist besonders relevant für die Therapie des schlecht differenzierten und des anaplastischen Schilddrüsenkarzinoms, da für diese, im Gegensatz zu den differenzierten Schilddrüsenkarzinomen, trotz intensiver Forschung bisher keine adäquaten Therapieoptionen existieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit ermutigen zu Studien der untersuchten Substanzen an in vivo Modellen von Schilddrüsenkarzinomen. HDACi haben sich in den vergangenen Jahren als Bereicherung für die Therapien multipler Malignome erwiesen. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen die Hoffnung, dass sie in Zukunft auch in der Therapie von insbesondere entdifferenzierten Schilddrüsenkarzinomen erfolgreich eingesetzt werden können.

## 5 Zusammenfassung und Abstract

### 5.1 Zusammenfassung

Das Schilddrüsenkarzinom ist der häufigste Tumor der endokrinen Organsysteme mit einer seit Jahrzehnten steigenden Inzidenz weltweit. Aufgrund etablierter Therapieverfahren, die primär die operative Behandlung und Radiojodtherapie beinhalten, haben differenzierte Schilddrüsenkarzinome in der Regel eine sehr gute Prognose, während diese weitaus schlechter ist für schlecht- und undifferenzierte Karzinome, die häufig frühzeitig invasiv wachsen, metastasieren und auf eine Radiojodtherapie nicht mehr adäquat ansprechen. Dementsprechend bedarf es dringend alternativer innovativer Therapieoptionen zur Behandlung letzterer. Neben genetischen Mutationen haben auch epigenetische Veränderungen einen großen Einfluss auf die maligne Entartung von Schilddrüsengewebe. Die potentielle Reversibilität epigenetischer Dysregulationen macht die Epigenetik zu einem wichtigen Angriffspunkt moderner Karzinomforschung.

In der vorliegenden Arbeit wurden mithilfe einer Zellwachstumsanalyse die Effekte der drei Histondeacetylaseinhibitoren Panobinostat (LBH589), SAHA und Trichostatin A, sowie mittels qRT-PCR, Western Blot und Gammakamera deren Einfluss auf den Natrium-Jodid-Symporter (NIS), HMGA2, die miRNAs hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p, die lncRNA H19 und TTF1 in vitro evaluiert. Die Auswirkungen der Behandlung der HDACi wurde an den fünf etablierten Zelllinien TPC1 (PTC), BCPAP (PTC), 8505C (PDTC), C643 (ATC) und FTC133 (FTC) untersucht. Alle HDACi hatten auf die Zellproliferation der untersuchten Zelllinien einen starken inhibitorischen Effekt, wobei Panobinostat mit 10nM inhibitorischer Wirkkonzentration der potenteste Vertreter der untersuchten Substanzen war. SAHA inhibierte die Zellproliferation effektiv bei einer Konzentration von 10µM, TSA zwischen 100nM und 1µM. In allen Zelllinien zeigte sich durch die Behandlung mit HDACi eine starke Induktion der NIS mRNA. In den Zelllinien BCPAP, C643 und FTC133 stellte sich nach der HDACi Behandlung darüber hinaus eine verstärkte Expression von NIS auf Proteinebene dar und in C643 und FTC133 konnte anhand einer verstärkten Radiojodaufnahme eine intakte Funktion des NIS Proteins nachgewiesen werden.

Beide Mitglieder der Let7 miRNA Familie hsa-let-7b-5p und hsa-let-7f-5p waren nach Behandlung mit den HDACi stabil oder überexprimiert, was die vermutete Rolle der beiden miRNAs als Inhibitoren der NIS Expression unwahrscheinlich macht. Es

zeigte sich jedoch eine inverse Korrelation der Expression der miRNAs und dem übergreifend in allen Zelllinien supprimierten Onkogen HMGA2, was neben der Wiederherstellung der NIS Funktion als weitere redifferenzierende Wirkung der HDACi angesehen werden kann.

Auch die Rolle der sonst kontrovers diskutierten lncRNA H19 wurde analysiert. In den Tumorgeweben von Patienten mit PTC, FTC und ATC war die Expression der lncRNA H19 unterschiedlich. In den etablierten Zelllinien hingegen zeigte sich H19 nach Behandlung mit den HDACi überexprimiert. Die Heterogenität der H19 Expression lässt ohne weitere Untersuchungen keine direkte Aussage über eine tumorsuppressive oder onkogene Rolle sowie über einen kausalen Zusammenhang der Expression dieser lncRNA mit der HDACi Behandlung zu.

Sowohl in den humanen Tumorgeweben als auch in den untersuchten Zelllinien kam eine sehr heterogene Expression des Differenzierungsmarkers TTF1 zur Darstellung, die sich nicht mit den zugrunde liegenden histologischen Eigenschaften der Karzinome korrelieren ließ. Interessanterweise haben hingegen die RET/PTC und BRAF Mutationen möglicherweise einen Einfluss auf die TTF1 Expression.

Anhand der vorliegenden in vitro Analyse wird die potentiell zytotoxische Effektivität dreier unabhängig voneinander getesteter HDACi in der Behandlung von Schilddrüsenkarzinomen, sowie deren Potential zur Redifferenzierung entarteten Schilddrüsegewebes deutlich. Dies befürwortet künftige in vivo Experimente zur weiterführenden Evaluation des möglichen Einsatzes von HDACi in der Therapie von Schilddrüsenkarzinomen.

## **5.2 Abstract**

Thyroid cancer is the most common malignancy of the endocrine glands with a globally increasing incidence since decades. With the help of entrenched therapeutical regimes, differentiated thyroid carcinomas usually have an excellent prognosis, whereas those therapies fail in poorly differentiated and anaplastic thyroid carcinomas. New therapeutical options to ameliorate the prognosis of these very de-differentiated tumors, that could improve their responsiveness to conventional therapies, are needed. In addition to genetic mutations, also epigenetic aberrations have a great influence on the malignant degeneration of thyroid tissue. The potential reversibility of epigenetic changes highlights its importance for the future of cancer treatment.

In the present study, the effects of the HDACi Panobinostat, SAHA and Trichostatin A (TSA) were investigated by using a cell viability analysis, furthermore their influence on NIS, HMGA2, the miRNAs hsa-let-7b-5p and hsa-let-7f-5p, the lncRNA H19 and TTF1 was analysed by qRT-PCR, Western blot and gamma counter in vitro. The effects of the treatment with HDACi were analysed in five established thyroid cancer cell lines: TPC1 (PTC), BCPAP (PTC), 8505C (PDTC), C643 (ATC) and FTC133 (FTC). All HDACi had a strong inhibitory effect on the cell proliferation in all of the cell lines tested. Panobinostat, with an inhibitory concentration of 10nM, was the most potent agent among the substances evaluated. SAHA inhibited the cell proliferation at a concentration of 10µM, TSA between 100nM and 1µM. In all of the cell lines, a strong over-expression of NIS mRNA was observed. Moreover, an induction of NIS protein was found in the cell lines BCPAP, C643 and FTC133 and increased Radioiodine uptake characterised the cells FTC133 and C643, proving an intact function of the NIS protein in these cells.

Both members of the miRNA let7 family, hsa-let-7b-5p and hsa-let-7f-5p, were stable and/or over-expressed after treatment with the HDACi and did not inversely correlate with their predicted target NIS. However, an inverse correlation between let7 miRNAs and the HMGA2 oncogene was shown, since HMGA2 was overall suppressed in the cell lines. Together with the increased Radioiodine uptake, HMGA2 suppression could reflect the redifferentiation of the cells mediated by treatment with HDACi.

The role of the controversially discussed lncRNA H19 was analysed, too. In the cancerous tissues of patients with PTC, FTC and ATC, the expression of lncRNA H19 was heterogeneous. H19 was over-expressed in the cell-lines after the treatment with the HDACi. Without further investigations a specific statement about a tumorsuppressive or oncogene function as well as about a causal connection regarding its expression and the treatment with HDACi cannot be made.

The differentiation marker TTF1 displayed a very heterogeneous expression in both the human cancer tissues and the cell lines. Interestingly, RET/PTC mutations and BRAF mutations have a possible influence on the TTF1 expression.

Based on this in vitro analysis, the potential cytotoxic efficacy of three independently investigated HDACi in thyroid carcinomas, as well as their potential to redifferentiate degenerated thyroid tissue becomes evident. Thus, future in vivo experiments for further evaluation of the possible use of HDACi in thyroid cancer therapy are urgently needed.

## 6 Anhang

### 6.1 Literaturverzeichnis

- Akagi, T.; Luong, Q. T.; Gui, D.; Said, J.; Selektar, J.; Yung, A. et al. (2008): Induction of sodium iodide symporter gene and molecular characterisation of HNF3 beta/FoxA2, TTF-1 and C/EBP beta in thyroid carcinoma cells. In: *British journal of cancer* 99 (5), S. 781–788. DOI: 10.1038/sj.bjc.6604544.
- Atadja, Peter (2009): Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589). Successes and challenges. In: *Cancer letters* 280 (2), S. 233–241. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.02.019.
- Avruch, J.; Khokhlatchev, A.; Kyriakis, J. M.; Luo, Z.; Tzivion, G.; Vavvas, D.; Zhang, X. F. (2001): Ras activation of the Raf kinase. Tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade. In: *Recent progress in hormone research* 56, S. 127–155.
- Baldan, Federica; Mio, Catia; Allegri, Lorenzo; Puppini, Cinzia; Russo, Diego; Filetti, Sebastiano; Damante, Giuseppe (2015): Synergy between HDAC and PARP Inhibitors on Proliferation of a Human Anaplastic Thyroid Cancer-Derived Cell Line. In: *International journal of endocrinology* 2015, S. 978371. DOI: 10.1155/2015/978371.
- Belge, Gazanfer; Meyer, Anke; Klemke, Markus; Burchardt, Käte; Stern, Corinna; Wosniok, Werner et al. (2008): Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. In: *Genes, chromosomes & cancer* 47 (1), S. 56–63. DOI: 10.1002/gcc.20505.
- Bernhart, Eva; Stueendl, Nicole; Kaltenecker, Heike; Windpassinger, Christian; Donohue, Nicholas; Leithner, Andreas; Lohberger, Birgit (2017): Histone deacetylase inhibitors vorinostat and panobinostat induce G1 cell cycle arrest and apoptosis in multidrug resistant sarcoma cell lines. In: *Oncotarget* 8 (44), S. 77254–77267. DOI: 10.18632/oncotarget.20460.
- Berteaux, Nathalie; Lottin, Séverine; Monté, Didier; Pinte, Sébastien; Quatannens, Brigitte; Coll, Jean et al. (2005): H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (33), S. 29625–29636. DOI: 10.1074/jbc.M504033200.
- Bingle, C. D. (1997): Thyroid transcription factor-1. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 29 (12), S. 1471–1473.
- Bose, Prithviraj; Dai, Yun; Grant, Steven (2014): Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action. Emerging insights. In: *Pharmacology & therapeutics* 143 (3), S. 323–336. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2014.04.004.
- Busch, Bianca; Bley, Nadine; Müller, Simon; Glaß, Markus; Misiak, Danny; Lederer, Marcell et al. (2016): The oncogenic triangle of HMGA2, LIN28B and IGF2BP1 antagonizes tumor-suppressive actions of the let-7 family. In: *Nucleic acids research* 44 (8), S. 3845–3864. DOI: 10.1093/nar/gkw099.
- Cabanillas, Maria E.; McFadden, David G.; Durante, Cosimo (2016): Thyroid cancer. In: *The Lancet* 388 (10061), S. 2783–2795. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)30172-6.
- Cantwell-Dorris, Emma R.; O'Leary, John J.; Sheils, Orla M. (2011): BRAFV600E. Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. In: *Mol Cancer Ther* 10 (3), S. 385–394. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0799.



Capdevila, J.; Mayor, R.; Mancuso, F. M.; Iglesias, C.; Caratù, G.; Matos, I. et al. (2018): Early evolutionary divergence between papillary and anaplastic thyroid cancers. In: *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 29 (6), S. 1454–1460. DOI: 10.1093/annonc/mdy123.

Catalano, Maria Graziella; Pugliese, Mariateresa; Gargantini, Eleonora; Grange, Cristina; Bussolati, Benedetta; Asioli, Sofia et al. (2012): Cytotoxic activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in anaplastic thyroid cancer in vitro and in vivo. In: *International journal of cancer* 130 (3), S. 694–704. DOI: 10.1002/ijc.26057.

Cellosaurus cell line 8505C (CVCL\_1054) (2020). Online verfügbar unter [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_1054](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1054), zuletzt aktualisiert am 19.08.2020, zuletzt geprüft am 19.08.2020.

Cellosaurus cell line B-CPAP (CVCL\_0153) (2020). Online verfügbar unter [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_0153](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_0153), zuletzt aktualisiert am 19.08.2020, zuletzt geprüft am 19.08.2020.

Cellosaurus cell line C-643 (CVCL\_5969) (2020). Online verfügbar unter [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_5969](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_5969), zuletzt aktualisiert am 19.08.2020, zuletzt geprüft am 19.08.2020.

Cellosaurus cell line FTC-133 (CVCL\_1219) (2020). Online verfügbar unter [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_1219](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_1219), zuletzt aktualisiert am 19.08.2020, zuletzt geprüft am 19.08.2020.

Cellosaurus cell line TPC-1 (CVCL\_6298) (2020). Online verfügbar unter [https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL\\_6298](https://web.expasy.org/cellosaurus/CVCL_6298), zuletzt aktualisiert am 19.08.2020, zuletzt geprüft am 19.08.2020.

Chen, Mei-Chuan; Huang, Hui-Hsuan; Lai, Chin-Yu; Lin, Yi-Jyun; Liou, Jing-Ping; Lai, Mei-Jung et al. (2016): Novel histone deacetylase inhibitor MPTOG009 induces cell apoptosis and synergistic anticancer activity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand against human hepatocellular carcinoma. In: *Oncotarget* 7 (1), S. 402–417.

Chiappetta, Gennaro; Ferraro, Angelo; Vuttariello, Emilia; Monaco, Mario; Galdiero, Francesca; Simone, Veronica de et al. (2008): HMGA2 mRNA expression correlates with the malignant phenotype in human thyroid neoplasias. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 44 (7), S. 1015–1021. DOI: 10.1016/j.ejca.2008.02.039.

Choi, Eun-Sun; Han, Gyoonee; Park, Song-Kyu; Lee, Kiho; Kim, Hyun-Jung; Cho, Sung-Dae; Kim, Hwan Mook (2013): A248, a novel synthetic HDAC inhibitor, induces apoptosis through the inhibition of specificity protein 1 and its downstream proteins in human prostate cancer cells. In: *Molecular medicine reports* 8 (1), S. 195–200. DOI: 10.3892/mmr.2013.1481.

Dal Maso, Luigino; Bosetti, Cristina; La Vecchia, Carlo; Franceschi, Silvia (2009): Risk factors for thyroid cancer. An epidemiological review focused on nutritional factors. In: *Cancer Causes & Control* 20 (1), S. 75–86. DOI: 10.1007/s10552-008-9219-5.

Damanakis, Alexander I.; Eckhardt, Sabine; Wunderlich, Annette; Roth, Silvia; Wisniewski, Thaddeus T.; Bartsch, Detlef K.; Di Fazio, Pietro (2016): MicroRNAs let7 expression in thyroid cancer: correlation with their deputed targets HMGA2 and SLC5A5. In: *Journal of cancer research and clinical oncology* 142 (6), S. 1213–1220. DOI: 10.1007/s00432-016-2138-z.

- Damaskos, Christos; Garmpis, Nikolaos; Valsami, Serena; Spartalis, Eleftherios; Antoniou, Efstathios A.; Tomos, Periklis et al. (2016): Histone Deacetylase Inhibitors: A Novel Therapeutic Weapon Against Medullary Thyroid Cancer? In: *Anticancer research* 36 (10), S. 5019–5024. DOI: 10.21873/anticancer.11070.
- Deeken-Draisey, Audrey; Yang, Guang-Yu; Gao, Juehua; Alexie, Borislav A. (2018): Anaplastic thyroid carcinoma. An epidemiologic, histologic, immunohistochemical and molecular single institution study. In: *Human Pathology*. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.07.027.
- Denaro, Nerina; Lo Nigro, Cristiana; Russi, Elvio G.; Merlano, Marco C. (2013): The role of chemotherapy and latest emerging target therapies in anaplastic thyroid cancer. In: *OncoTargets and therapy* 9, S. 1231–1241. DOI: 10.2147/OTT.S46545.
- Di Fazio, Pietro; Montalbano, Roberta; Neureiter, Daniel; Alinger, Beate; Schmidt, Ansgar; Merkel, Anna Lena et al. (2012): Downregulation of HMGA2 by the pan-deacetylase inhibitor panobinostat is dependent on hsa-let-7b expression in liver cancer cell lines. In: *Experimental cell research* 318 (15), S. 1832–1843. DOI: 10.1016/j.yexcr.2012.04.018.
- Dietlein, M.; Eschner, W.; Grünwald, F.; Lassmann, M.; Verburg, F. A.; Luster, M. (2015): Radioiodtherapie beim differenzierten Schilddrüsenkarzinom (Version 4). Stand 10/2015 - AWMF Registriernummer 031-002. Online verfügbar unter [https://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/docs/031-002l\\_S1\\_Radioiodtherapie\\_differenziertes\\_Schilddruesenkarziom\\_2015-10.pdf](https://www.nuklearmedizin.de/leistungen/leitlinien/docs/031-002l_S1_Radioiodtherapie_differenziertes_Schilddruesenkarziom_2015-10.pdf), zuletzt geprüft am 20.01.2020.
- Dralle, Henning; Musholt, Thomas J.; Schabram, Jochen; Steinmuller, Thomas; Frilling, Andreja; Simon, Dietmar et al. (2013): German Association of Endocrine Surgeons practice guideline for the surgical management of malignant thyroid tumors. In: *Langenbeck's archives of surgery* 398 (3), S. 347–375. DOI: 10.1007/s00423-013-1057-6.
- Endo, T.; Kaneshige, M.; Nakazato, M.; Ohmori, M.; Harii, N.; Onaya, T. (1997): Thyroid transcription factor-1 activates the promoter activity of rat thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter gene. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 11 (11), S. 1747–1755. DOI: 10.1210/mend.11.11.0012.
- Endo, Toyoshi; Kobayashi, Tetsuro (2013): Concurrent overexpression of RET/PTC1 and TTF1 confers tumorigenicity to thyrocytes. In: *Endocrine-related cancer* 20 (6), S. 767–776. DOI: 10.1530/ERC-13-0310.
- Esquela-Kerscher, Aurora; Slack, Frank J. (2006): Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. In: *Nature reviews. Cancer* 6 (4), S. 259–269. DOI: 10.1038/nrc1840.
- Esteller, Manel (2007): Epigenetic gene silencing in cancer. The DNA hypermethylome. In: *Human molecular genetics* 16 Spec No 1, R50-9. DOI: 10.1093/hmg/ddm018.
- Fedele, Monica; Palmieri, Dario; Fusco, Alfredo (2010): HMGA2: A pituitary tumour subtype-specific oncogene? In: *Molecular and cellular endocrinology* 326 (1-2), S. 19–24. DOI: 10.1016/j.mce.2010.03.019.
- Friedman, Robin C.; Farh, Kyle Kai-How; Burge, Christopher B.; Bartel, David P. (2009): Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. In: *Genome research* 19 (1), S. 92–105. DOI: 10.1101/gr.082701.108.

- Furuya, Fumihiko; Shimura, Hiroki; Suzuki, Hideyo; Taki, Katsumi; Ohta, Kazuyasu; Haraguchi, Kazutaka et al. (2004): Histone deacetylase inhibitors restore radioiodide uptake and retention in poorly differentiated and anaplastic thyroid cancer cells by expression of the sodium/iodide symporter thyroperoxidase and thyroglobulin. In: *Endocrinology* 145 (6), S. 2865–2875. DOI: 10.1210/en.2003-1258.
- Fuziwara, Cesar Seigi; Kimura, Edna Teruko (2017): MicroRNAs in thyroid development, function and tumorigenesis. In: *Molecular and cellular endocrinology* 456, S. 44–50. DOI: 10.1016/j.mce.2016.12.017.
- Galrao, Ana Luiza; Camargo, Rosalinda Y.; Friguglietti, Celso U.; Moraes, Lais; Cerutti, Janete Maria; Serrano-Nascimento, Caroline et al. (2014): Hypermethylation of a New Distal Sodium/Iodide Symporter (NIS) enhancer (NDE) is associated with reduced NIS expression in thyroid tumors. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99 (6), E944-52. DOI: 10.1210/jc.2013-1450.
- Giles, Francis; Fischer, Thomas; Cortes, Jorge; Garcia-Manero, Guillermo; Beck, Joachim; Ravandi, Farhad et al. (2006): A Phase I Study of Intravenous LBH589, a Novel Cinnamic Hydroxamic Acid Analogue Histone Deacetylase Inhibitor, in Patients with Refractory Hematologic Malignancies. In: *Clin Cancer Res* 12 (15), S. 4628–4635. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0511.
- Golabek, Karolina; Strzelczyk, Joanna K.; Wiczowski, Andrzej; Michalski, Marek (2015): Potential use of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. In: *Contemporary oncology (Poznan, Poland)* 19 (6), S. 436–440. DOI: 10.5114/wo.2015.51824.
- Grant, Steven; Dai, Yun (2012): Histone deacetylase inhibitors and rational combination therapies. In: *Advances in cancer research* 116, S. 199–237. DOI: 10.1016/B978-0-12-394387-3.00006-9.
- Gray, Jhanelle E.; Haura, Eric; Chiappori, Alberto; Tanvetyanon, Tawee; Williams, Charles C.; Pinder-Schenck, Mary et al. (2014): A phase I, pharmacokinetic and pharmacodynamic study of panobinostat, an HDAC inhibitor, combined with erlotinib in patients with advanced aerodigestive tract tumors. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 20 (6), S. 1644–1655. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-13-2235.
- Hegedüs, Laszlo; Bonnema, Steen J.; Bennedbaek, Finn N. (2003): Management of simple nodular goiter. Current status and future perspectives. In: *Endocrine reviews* 24 (1), S. 102–132. DOI: 10.1210/er.2002-0016.
- Hingorani, M. (2010): The Biology of the Sodium Iodide Symporter and its Potential for Targeted Gene Delivery. In: *CCDT* 999 (999), S. 1–26. DOI: 10.2174/1568210202017840096.
- Hong, Chae Moon; Ahn, Byeong-Cheol (2017): Redifferentiation of Radioiodine Refractory Differentiated Thyroid Cancer for Reapplication of I-131 Therapy. In: *Frontiers in endocrinology* 8, S. 260. DOI: 10.3389/fendo.2017.00260.
- Hou, Peng; Bojdani, ERMAL; Xing, Mingzhao (2010): Induction of Thyroid Gene Expression and Radioiodine Uptake in Thyroid Cancer Cells by Targeting Major Signaling Pathways. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95 (2), S. 820–828. DOI: 10.1210/jc.2009-1888.

- Hsu, Kun-Tai; Yu, Xiao-Min; Audhya, Anjon W.; Jaume, Juan C.; Lloyd, Ricardo V.; Miyamoto, Shigeki et al. (2014): Novel approaches in anaplastic thyroid cancer therapy. In: *The oncologist* 19 (11), S. 1148–1155. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0182.
- Huarte, Maite (2015): The emerging role of lncRNAs in cancer. In: *Nature Medicine* 21 (11), S. 1253. DOI: 10.1038/nm.3981.
- Hussein, Osama; Karen, Drumea; Zidan, Jamal (2013): Cisplatin based chemotherapy in patients with advanced differentiated thyroid carcinoma refractory to I131 treatment. In: *Indian Journal of Medical and Paediatric Oncology : Official Journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology* 34 (4), S. 234–237. DOI: 10.4103/0971-5851.125233.
- Hutvágner, G.; McLachlan, J.; Pasquinelli, A. E.; Bálint, E.; Tuschl, T.; Zamore, P. D. (2001): A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. In: *Science (New York, N.Y.)* 293 (5531), S. 834–838. DOI: 10.1126/science.1062961.
- Hutvágner, György; Zamore, Phillip D. (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. In: *Science (New York, N.Y.)* 297 (5589), S. 2056–2060. DOI: 10.1126/science.1073827.
- Irvine, Ryan A.; Lin, Iping G.; Hsieh, Chih-Lin (2002): DNA methylation has a local effect on transcription and histone acetylation. In: *Molecular and cellular biology* 22 (19), S. 6689–6696. DOI: 10.1128/mcb.22.19.6689-6696.2002.
- Jaeschke, Holger; Undeutsch, Henriette; Patyra, Konrad; Lof, Christoffer; Eszlinger, Markus; Khalil, Moosa et al. (2018): Hyperthyroidism and papillary thyroid carcinoma in thyrotropin receptor D633H mutant mice. In: *Thyroid : official journal of the American Thyroid Association*. DOI: 10.1089/thy.2018.0041.
- Jin, Yuchen; van Nostrand, Douglas; Cheng, Lingxiao; Liu, Min; Chen, Libo (2018): Radioiodine refractory differentiated thyroid cancer. In: *Critical reviews in oncology/hematology* 125, S. 111–120. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2018.03.012.
- Kane, Shubhada V.; Sharma, Tanvi Paliwal (2015): Cytologic diagnostic approach to poorly differentiated thyroid carcinoma. A single-institution study. In: *Cancer cytopathology* 123 (2), S. 82–91. DOI: 10.1002/cncy.21500.
- Katoh, R.; Kawaoi, A.; Miyagi, E.; Li, X.; Suzuki, K.; Nakamura, Y.; Kakudo, K. (2000): Thyroid transcription factor-1 in normal, hyperplastic, and neoplastic follicular thyroid cells examined by immunohistochemistry and nonradioactive in situ hybridization. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 13 (5), S. 570–576. DOI: 10.1038/modpathol.3880098.
- Ke, Ning; Wang, Xiaobo; Xu, Xiao; Abassi, Yama A. (2011): The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 740, S. 33–43. DOI: 10.1007/978-1-61779-108-6\_6.
- Kelkar, Madhura G.; Senthikumar, Kalimuthu; Jadhav, Smita; Gupta, Sudeep; Ahn, Beyong-Cheol; De, Abhijit (2016): Enhancement of human sodium iodide symporter gene therapy for breast cancer by HDAC inhibitor mediated transcriptional modulation. In: *Scientific reports* 6, S. 19341. DOI: 10.1038/srep19341.

Kho, Dan; MacDonald, Christa; Johnson, Rebecca; Unsworth, Charles P.; O'Carroll, Simon J.; Du Mez, Elyce et al. (2015): Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. In: *Biosensors* 5 (2), S. 199–222. DOI: 10.3390/bios5020199.

Kim, Sung Jo; Park, Sang Eun; Lee, Chan; Lee, Sun Young; Jo, Jin Ho; Kim, Jung Mogg; Oh, Yu-Kyoung (2002): Alterations in promoter usage and expression levels of insulin-like growth factor-II and H19 genes in cervical carcinoma exhibiting biallelic expression of IGF-II. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1586 (3), S. 307–315. DOI: 10.1016/S0925-4439(01)00109-0.

Kimura, Shioko (2011): Thyroid-Specific Transcription Factors and Their Roles in Thyroid Cancer. In: *Journal of thyroid research* 2011. DOI: 10.4061/2011/710213.

Kondo, Tetsuo; Nakazawa, Tadao; Ma, Defu; Niu, Dongfeng; Mochizuki, Kunio; Kawasaki, Tomonori et al. (2009): Epigenetic silencing of TTF-1/NKX2-1 through DNA hypermethylation and histone H3 modulation in thyroid carcinomas. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 89 (7), S. 791–799. DOI: 10.1038/labinvest.2009.50.

Kozomara, Ana; Griffiths-Jones, Sam (2014): miRBase. Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. In: *Nucleic acids research* 42 (Database issue), D68-73. DOI: 10.1093/nar/gkt1181.

Lan, Xiabin; Sun, Wei; Dong, Wenwu; Wang, Zhihong; Zhang, Ting; He, Liang; Zhang, Hao (2018): Downregulation of long noncoding RNA H19 contributes to the proliferation and migration of papillary thyroid carcinoma. In: *Gene* 646, S. 98–105. DOI: 10.1016/j.gene.2017.12.051.

Lee, Hee Seung; Park, Soo Been; Kim, Sun A.; Kwon, Sool Ki; Cha, Hyunju; Lee, Do Young et al.: A novel HDAC inhibitor, CG200745, inhibits pancreatic cancer cell growth and overcomes gemcitabine resistance. In: *Scientific reports* 7, S. 41615. DOI: 10.1038/srep41615.

Levine, Arnold J.; Berger, Shelley L. (2017): The interplay between epigenetic changes and the p53 protein in stem cells. In: *Genes & development* 31 (12), S. 1195–1201. DOI: 10.1101/gad.298984.117.

Li, Yun-Long; Cui, Wu; Gao, Feng; Cao, Zhi-Gang; Li, Xiao-Lin; Zhou, Wen-Xue (2015): Downregulation of growth differentiation factor-15 in trichostatin A-induced apoptosis could play a role in progression of gastric cancer. In: *International journal of clinical and experimental pathology* 8 (7), S. 8136–8142.

Liu, Fang-teng; Pan, Hua; Xia, Guang-feng; Qiu, Cheng; Zhu, Zheng-ming (2016a): Prognostic and clinicopathological significance of long noncoding RNA H19 overexpression in human solid tumors: evidence from a meta-analysis. In: *Oncotarget* 7 (50), S. 83177–83186. DOI: 10.18632/oncotarget.13076.

Liu, Lin; Yang, Jian; Zhu, Xuchao; Li, Dan; Lv, Zhongwei; Zhang, Xiaoping (2016b): Long noncoding RNA H19 competitively binds miR-17-5p to regulate YES1 expression in thyroid cancer. In: *The FEBS journal* 283 (12), S. 2326–2339. DOI: 10.1111/febs.13741.

Liu, Na; Zhou, Qi; Qi, Yan-Hua; Wang, Hua; Yang, Li; Fan, Qing-Yu (2017): Effects of long non-coding RNA H19 and microRNA let7a expression on thyroid cancer prognosis. In: *Experimental and molecular pathology* 103 (1), S. 71–77. DOI: 10.1016/j.yexmp.2017.06.004.

Lu, Jun; Getz, Gad; Miska, Eric A.; Alvarez-Saavedra, Ezequiel; Lamb, Justin; Peck, David et al. (2005): MicroRNA expression profiles classify human cancers. In: *Nature* 435 (7043), S. 834–838. DOI: 10.1038/nature03702.

Luo, Ming; Li, Zuowei; Wang, Wei; Zeng, Yigang; Liu, Zhihong; Qiu, Jianxin (2013): Upregulated H19 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating ID2 expression. In: *The FEBS journal* 280 (7), S. 1709–1716. DOI: 10.1111/febs.12185.

Luster, M.; Clarke, S. E.; Dietlein, M.; Lassmann, M.; Lind, P.; Oyen, W. J. G. et al. (2008): Guidelines for radioiodine therapy of differentiated thyroid cancer. In: *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 35 (10), S. 1941–1959. DOI: 10.1007/s00259-008-0883-1.

Mahmood, Tahrin; Yang, Ping-Chang (2012): Western blot. Technique, theory, and trouble shooting. In: *North American journal of medical sciences* 4 (9), S. 429–434. DOI: 10.4103/1947-2714.100998.

Marini, Francesca; Luzi, Ettore; Brandi, Maria Luisa (2011): MicroRNA Role in Thyroid Cancer Development. In: *Journal of thyroid research* 2011, S. 407123. DOI: 10.4061/2011/407123.

Marotta, Vincenzo; Guerra, Anna; Sapio, Maria Rosaria; Vitale, Mario (2011): RET/PTC rearrangement in benign and malignant thyroid diseases. A clinical standpoint. In: *European journal of endocrinology* 165 (4), S. 499–507. DOI: 10.1530/EJE-11-0499.

Miller, Claudia P.; Singh, Melissa M.; Rivera-Del Valle, Nilisa; Manton, Christa A.; Chandra, Joya (2011): Therapeutic Strategies to Enhance the Anticancer Efficacy of Histone Deacetylase Inhibitors. In: *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011. DOI: 10.1155/2011/514261.

Minjie, Shang; Defei, Hong; Zhimin, Hu; Weiding, Wu; Yuhua, Zhang (2015): Targeting pancreatic cancer cells by a novel hydroxamate-based histone deacetylase (HDAC) inhibitor ST-3595. In: *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 36 (11), S. 9015–9022. DOI: 10.1007/s13277-015-3537-5.

Morris, Lilah F.; Ragavendra, Nagesh; Yeh, Michael W. (2008): Evidence-based assessment of the role of ultrasonography in the management of benign thyroid nodules. In: *World journal of surgery* 32 (7), S. 1253–1263. DOI: 10.1007/s00268-008-9494-z.

Murugan, Avaniyapuram Kannan; Munirajan, Arasambattu Kannan; Alzahrani, Ali S. (2018): Long noncoding RNAs: emerging players in thyroid cancer pathogenesis. In: *Endocrine-related cancer* 25 (2), R59-R82. DOI: 10.1530/ERC-17-0188.

Nakamura, Nobuki; Miyagi, Eri; Murata, Shin-ichi; Kawaoi, Akira; Katoh, Ryohei (2002): Expression of thyroid transcription factor-1 in normal and neoplastic lung tissues. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 15 (10), S. 1058–1067. DOI: 10.1097/01.MP.0000028572.44247.CF.

Newton, Clive R.; Graham, Alex (1997): PCR. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. (Labor im Fokus).

Ngamphaiboon, Nuttapong; Dy, Grace K.; Ma, Wen Wee; Zhao, Yujie; Reungwetwattana, Thanyanan; DePaolo, Dawn et al. (2015): A phase I study of the histone deacetylase (HDAC) inhibitor entinostat, in combination with sorafenib in patients with advanced solid tumors. In: *Investigational new drugs* 33 (1), S. 225–232. DOI: 10.1007/s10637-014-0174-6.

- Peiling Yang, Samantha; Ngeow, Joanne (2016): Familial non-medullary thyroid cancer: unraveling the genetic maze. In: *Endocrine-related cancer* 23 (12), R577-R595. DOI: 10.1530/ERC-16-0067.
- Pellegriti, Gabriella; Frasca, Francesco; Regalbuto, Concetto; Squatrito, Sebastiano; Vigneri, Riccardo (2013): Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. In: *Journal of cancer epidemiology* 2013, S. 965212. DOI: 10.1155/2013/965212.
- Proteinbestimmung. Online verfügbar unter <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/proteinbestimmung/54131>, zuletzt geprüft am 11.06.2018.
- Pubchem: Panobinostat. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Panobinostat#section=Top>, zuletzt geprüft am 07.06.2018.
- Pubchem: Trichostatin. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/444732#section=Top>, zuletzt geprüft am 07.06.2018.
- Pubchem: Vorinostat. Online verfügbar unter <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5311#section=Top>, zuletzt geprüft am 07.06.2018.
- Raman, Priyadarshini; Koenig, Ronald J. (2014): Pax-8-PPAR- $\gamma$  fusion protein in thyroid carcinoma. In: *Nature reviews. Endocrinology* 10 (10), S. 616–623. DOI: 10.1038/nrendo.2014.115.
- Raveh, Eli; Matouk, Imad J.; Gilon, Michal; Hochberg, Abraham (2015): The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis - a proposed unifying theory. In: *Molecular cancer* 14, S. 184. DOI: 10.1186/s12943-015-0458-2.
- Ricarte-Filho, Júlio Cezar Marques; Fuziwara, Cesar Seigi; Yamashita, Alex Shimura; Rezende, Eloiza; da-Silva, Marley Januário; Kimura, Edna Teruko (2009): Effects of let-7 microRNA on Cell Growth and Differentiation of Papillary Thyroid Cancer. In: *Translational Oncology* 2 (4), S. 236–241.
- Richon, V. M.; Sandhoff, T. W.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. (2000): Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (18), S. 10014–10019. DOI: 10.1073/pnas.180316197.
- Robert-Koch-Institut (2017): Krebs in Deutschland | 2013/2014 | Schilddrüse C73.
- Ruijter, Annemieke J. M. de; van Gennip, Albert H.; Caron, Huib N.; Kemp, Stephan; van Kuilenburg, André B. P. (2003): Histone deacetylases (HDACs). Characterization of the classical HDAC family. In: *The Biochemical journal* 370 (Pt 3), S. 737–749. DOI: 10.1042/BJ20021321.
- Russo, Diego; Durante, Cosimo; Bulotta, Stefania; Puppini, Cinzia; Puxeddu, Efisio; Filetti, Sebastiano; Damante, Giuseppe (2013): Targeting histone deacetylase in thyroid cancer. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 17 (2), S. 179–193. DOI: 10.1517/14728222.2013.740013.

- S Dizdarevic; M Tulchinsky; VR McCready; J Mihailovic; S Vinjamuri; JR Buscombe et al. (2019): The World Association of Radiopharmaceutical and Molecular Therapy position statement on the initial radioiodine therapy for differentiated thyroid carcinoma. In: *World Journal of Nuclear Medicine* 18 (2), S. 123. DOI: 10.4103/wjnm.WJNM\_117\_18.
- Schneider, David F.; Chen, Herbert (2013): New developments in the diagnosis and treatment of thyroid cancer. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 63 (6), S. 374–394. DOI: 10.3322/caac.21195.
- Shao, Wenlin; Growney, Joseph D.; Feng, Yun; O'Connor, Gregory; Pu, Minying; Zhu, Wenjing et al. (2010): Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance. In: *International journal of cancer* 127 (9), S. 2199–2208. DOI: 10.1002/ijc.25218.
- Smith, Neal; Nucera, Carmelo (2015): Personalized Therapy in Patients With Anaplastic Thyroid Cancer. Targeting Genetic and Epigenetic Alterations. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 100 (1), S. 35–42. DOI: 10.1210/jc.2014-2803.
- Souza, Cristabelle; Chatterji, Biswa (2015): HDAC Inhibitors as Novel Anti-Cancer Therapeutics. In: *PRA* 10 (2), S. 145–162. DOI: 10.2174/1574892810666150317144511.
- Swierniak, Michal; Wojcicka, Anna; Czetwertynska, Malgorzata; Stachlewska, Elzbieta; Maciag, Monika; Wiechno, Wieslaw et al. (2013): In-depth characterization of the microRNA transcriptome in normal thyroid and papillary thyroid carcinoma. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 98 (8), E1401-9. DOI: 10.1210/jc.2013-1214.
- Takano, Toru; Ito, Yasuhiro; Matsuzuka, Fumio; Miya, Akihiro; Kobayashi, Kaoru; Yoshida, Hiroshi; Miyauchi, Akira (2007): Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase, thyroglobulin and thyroid transcription factor 1 mRNAs in anaplastic thyroid carcinoma tissues and cell lines. In: *Oncology Reports* 18 (3), S. 715–720. DOI: 10.3892/or.18.3.715.
- Thiagalingam, Sam; Cheng, Kuang-Hung; Lee, Hyunjoo J.; Mineva, Nora; Thiagalingam, Arunthathi; Ponte, Jose F. (2003): Histone deacetylases. Unique players in shaping the epigenetic histone code. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 983, S. 84–100.
- Trocchi, Pietro; Kluttig, Alexander; Dralle, Henning; Sekulla, Carsten; Biermann, Martin; Stang, Andreas (2012): Thyroid cancer surgery in Germany: an analysis of the nationwide DRG statistics 2005-2006. In: *Langenbeck's archives of surgery* 397 (3), S. 421–428. DOI: 10.1007/s00423-011-0897-1.
- Valerio, L.; Pieruzzi, L.; Giani, C.; Agate, L.; Bottici, V.; Lorusso, L. et al. (2017): Targeted Therapy in Thyroid Cancer. State of the Art. In: *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 29 (5), S. 316–324. DOI: 10.1016/j.clon.2017.02.009.
- Vu-Phan, Dang; Koenig, Ronald J. (2014): Genetics and epigenetics of sporadic thyroid cancer. In: *Molecular and cellular endocrinology* 386 (1-2), S. 55–66. DOI: 10.1016/j.mce.2013.07.030.
- Wächter, Sabine; Damanakis, Alexander I.; Elxnat, Moritz; Roth, Silvia; Wunderlich, Annette; Verburg, Frederik A. et al. (2018): Epigenetic Modifications in Thyroid Cancer Cells Restore NIS and Radio-Iodine Uptake and Promote Cell Death. In: *Journal of clinical medicine* 7 (4). DOI: 10.3390/jcm7040061.



- Wan, Paul T. C.; Garnett, Mathew J.; Roe, S. Mark; Lee, Sharlene; Niculescu-Duvaz, Dan; Good, Valerie M. et al. (2004): Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. In: *Cell* 116 (6), S. 855–867.
- Wang, Peng; Liu, Guoqing; Xu, Weimin; Liu, Haixia; Bu, Qingao; Sun, Diwen (2017a): Long Noncoding RNA H19 Inhibits Cell Viability, Migration, and Invasion Via Downregulation of IRS-1 in Thyroid Cancer Cells. In: *Technology in cancer research & treatment* 16 (6), S. 1102–1112. DOI: 10.1177/1533034617733904.
- Wang, Shou-Chieh; Wang, Shou-Tsung; Liu, Hung-Te; Wang, Xiang-Yu; Wu, She-Ching; Chen, Lei-Chin; Liu, Yi-Wen (2017b): Trichostatin A induces bladder cancer cell death via intrinsic apoptosis at the early phase and Sp1-survivin downregulation at the late phase of treatment. In: *Oncology Reports* 38 (3), S. 1587–1596. DOI: 10.3892/or.2017.5795.
- Wilson, Peter M.; Labonte, Melissa J.; Martin, Shelby C.; Kuwahara, Stephanie T.; El-Khoueiry, Anthony; Lenz, Heinz-Josef; Ladner, Robert D. (2013): Sustained inhibition of deacetylases is required for the antitumor activity of the histone deacetylase inhibitors panobinostat and vorinostat in models of colorectal cancer. In: *Investigational new drugs* 31 (4), S. 845–857. DOI: 10.1007/s10637-012-9914-7.
- Xing, Mingzhao; Haugen, Bryan R.; Schlumberger, Martin (2013): Progress in molecular-based management of differentiated thyroid cancer. In: *Lancet (London, England)* 381 (9871), S. 1058–1069. DOI: 10.1016/S0140-6736(13)60109-9.
- Yamaguchi, Tomoya; Hosono, Yasuyuki; Yanagisawa, Kiyoshi; Takahashi, Takashi (2013): NKX2-1/TTF-1. An enigmatic oncogene that functions as a double-edged sword for cancer cell survival and progression. In: *Cancer cell* 23 (6), S. 718–723. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.04.002.
- Yan, Guojun; Du, Qian; Wei, Xuchao; Miozzi, Jackelyn; Kang, Chen; Wang, Jinnv et al. (2018): Application of Real-Time Cell Electronic Analysis System in Modern Pharmaceutical Evaluation and Analysis. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 23 (12). DOI: 10.3390/molecules23123280.
- Yang, Xiang-Jiao (2004): The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. In: *Nucleic acids research* 32 (3), S. 959–976. DOI: 10.1093/nar/gkh252.
- Yee, Andrew J.; Raje, Noopur S. (2018): Panobinostat and Multiple Myeloma in 2018. In: *The oncologist* 23 (5), S. 516–517. DOI: 10.1634/theoncologist.2017-0644.
- Zhang, Ling; Yang, Fu; Yuan, Ji-hang; Yuan, Sheng-xian; Zhou, Wei-ping; Huo, Xi-song et al. (2013): Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. In: *Carcinogenesis* 34 (3), S. 577–586. DOI: 10.1093/carcin/bgs381.
- Zhang, Ping; Zuo, Hui; Nakamura, Yasushi; Nakamura, Misa; Wakasa, Tomoko; Kakudo, Kennichi (2006): Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. In: *Pathology international* 56 (5), S. 240–245. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2006.01959.x.

## 6.2 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrenden waren in Marburg die Damen und Herren:

Im ersten Studienabschnitt: Adamkiewicz, Baranovski Sergei, Baranovski Svetlana, Bauer, Baum, Becker, Berger, Bertoune, Bette, Brehm, Cetin, Decher, Del Rey, Feuser, Grundmann, Grzeschik, Hemmeter, Jerrentrup, Kill, Kinscherf, Koolman, Lill, Mueller, Mutters, Müller, Neumüller, Oberthür, Oberwinkler, Oliver, Preisig-Müller, Quint, Reese, Renz, Rivera Gil, Rost, Sahmland, Schäfer, Schratt, Seitz, Schütz, Stahl, Steiniger, Steinmetzer, Thieme, Weihe, Westermann, Wilhelm, Wrocklage, Wulf

Im zweiten Studienabschnitt: Adarkwah, Albers, Arhelger, Baum, Bäumlein, Bartsch, Becker, Berger, Birk, Bliemel, Bösner, Bücking, Burchert, Carl, Cassebaum, Czubayko, Dettmeyer, Dodel, Donner- Banzhoff, Duda, Eberhardt, Eggert, Ehlenz, Eickmann, Ermisch, Fuchs-Winkelmann, Franz, Frink, Fritz, Geks, Geraedts, Gousias, Grgic, Hartinger, Häußermann, Hemmeter, Hertl, Hoch, Holst, Hoß, Hoyer, Hundt, Irsusi, Jansen, Jaques, Jerrentrup, Josephs, Kalder, Kann, Kanngießer, Kerl, Kircher, Kirschbaum, Klose, Kluge, Knake, Knipper, Knöppel, Koehler, Köhler, Kolb-Niemann, Kortus-Götze, Kühnert, Kruse, Leonhardt, Lohoff, Lübbe, Luster, Maier, Maier, Maisner, Menzler, Metzelder, Mirow, Moll, Neubauer, Neubert, Nimsky, Nockher, Oberkircher, Oertel, Pagenstecher, Pankuweit, Pehl, Peterlein, Pfaar, Pfeiffer, Pfestroff, Pfützner, Plant, Printz, Reese, Renz, Richter, Riße, Roeßler, Rose, Röttgers, Ruchholtz, Schäfer, Schieffer, Schlößler, Schneider, Schreinert, Schu, Schulze, Schüttler, Schröder, Seifart, Seitz, Sekundo, Sevinc, Sommer, Stula, Tackenberg, Thiemer, Timmermann, Vogel, Völlger, Wagner, Waldthausen, Walter, Westhoff, Wittig, Worzfeld, Wulff, Zavorotnyy, Zeisberger, Ziller, Zink, Ziring, Zwiorek

### 6.3 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich herzlich bei Ihnen, Herr Prof. Dr. med. Waldmann, für die Überlassung des interessanten Themas und damit gleichzeitig für die Chance des Einblicks in das spannende Feld der klinisch-experimentellen Forschung. Gleichmaßen gilt mein Dank auch Ihnen, Frau Prof. Dr. med. K. Holzer, für die kurzfristige Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, ohne die deren Fertigstellung nicht möglich gewesen wäre.

Auch danke ich Herrn Prof. Dr. med. D. K. Bartsch, dem derzeitigen Direktor der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie in Marburg.

Silvia und Annette, dank eurer freundlichen Aufnahme ins Team und das geduldige Einarbeiten in die Künste der Laborarbeit habt ihr mir die Grundlage für einen guten Start in diese Arbeit gegeben. Nicht zu vergessen außerdem die geduldige Beantwortung meiner zahlreichen Fragen im Verlauf. Dafür vielen Dank.

Lieber Pietro, dir danke ich für deine Vielzahl an Ideen und deine Expertise, die meine Zeit im Labor sowie diese Arbeit bereichert haben. Danke auch für die viele Zeit, die du in unsere Treffen sowie in die Durchsicht meiner Arbeit investiert hast.

Neben vielen Stunden akribischen Korrekturlesens haben mir deine permanente Anprechbarkeit und fortwährende Freundlichkeit von Anfang bis Ende den Rücken gestärkt und somit maßgeblich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen. Deshalb gilt insbesondere auch dir, Sabine, ein herzlicher Dank.

Meiner Frau Nelli danke ich für die Hilfe beim Feinschliff des Layouts und nicht zuletzt für ihre moralische Unterstützung, mit deren Hilfe ich es auch in Stunden aufkommender Verzweiflung geschafft habe, meinen Blick auf das Ziel wieder zu fokussieren.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, die mich das ganze Studium der Humanmedizin über unterstützt und an mich geglaubt hat. Da ohne Euch das ganze Projekt nicht in dieser Form hätte zustande kommen können, ist diese Arbeit zu Recht euch gewidmet. Vielen Dank!